



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**“Actividad antioxidante de algunas
macroalgas del Sistema Arrecifal
Veracruzano, zona Sur.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

**CAROLINA CARRANZA
NESTITLA**



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

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.
2017.



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.

Agradecimientos

A la UNAM por brindarme la oportunidad de formar parte de ella y permitirme crecer académica y personalmente.

A mis sinodales por sus valiosas aportaciones a este trabajo, y por compartirme su sabiduría y conocimiento:

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado.

Dra. Ana María García Bores.

Dra. Rocio Serrano Parrales.

Dr. José Guillermo Avila Acevedo.

M. en C. Marisol Avila Romero.

A mi asesora, la M. en C. Marisol Avila Romero, gracias por su paciencia y por no rendirse conmigo. Gracias por permitirme aprender juntas, por compartir conmigo su experiencia y conocimiento académico y personal, por siempre estar dispuesta a escucharme y brindarme un consejo.

A Alfonso Ferrer, “Alf”, por ser mi compañero en esta aventura, por aguantar mi extraña personalidad y por todos los buenos momentos que disfrutamos juntos.

A Zulema Hernández, “bebota”, por impulsarme a seguir adelante. Gracias por esos momentos increíbles que vivimos dentro y fuera del laboratorio. Siempre serás la mejor “hermana académica” que alguien podrá tener.

A la Sra. Bety, porque siempre tenía una sonrisa para mí y por “malcriarme” en el laboratorio. Gracias por su amistad y buenos consejos. Siempre vivirá en mi mente.

A mis compañeros del laboratorio de Fito-Farma por tan divertidos momentos y por hacerme sentir como en casa: Alma, Cristi, Miguel, Fany, Gus, Ari, Caro, Jane y Danya.

A mis chachitos: Angie, Adri, Alex, Yare, Shari, Jacki y Miri.
Gracias por dejarme ser parte de esta extraña familia.

A la biología porque cada día me sorprende con alguna de sus
maravillas.

Dedicatoria

A mi familia,

*Porque siempre me han impulsado a ser una mejor
persona. Son mi mayor motor en la vida.*

Gracias por darme todo lo necesario y más.

*Todo lo que soy se los debo a ustedes, son mi mayor
ejemplo a seguir y espero que algún día pueda
retribuirles todo lo que me han dado.*

*Gracias por su amor, su confianza y su infinita
paciencia.*

Los amo muchísimo.

“La cosa más hermosa que podemos experimentar es el misterio. Es la fuente de toda arte y toda ciencia”.

Albert Einstein.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	15
ZONA DE COLECTA	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. <i>Colecta del material algal</i>	18
2. <i>Determinación del material algal</i>	18
3. <i>Obtención del extracto algal</i>	18
4. <i>Determinación cualitativa de metabolitos secundarios</i>	19
5. <i>Actividad antioxidante de los extractos algales</i>	19
6. <i>Contenido de fenoles totales</i>	21
ANÁLISIS Y RESULTADOS	22
1. <i>Colecta del material algal y determinación taxonómica</i>	22
2. <i>Rendimiento de los extractos</i>	25
3. <i>Determinación cualitativa de metabolitos secundarios</i>	26
4. <i>Actividad antioxidante</i>	28
5. <i>Contenido de fenoles totales</i>	35
DISCUSIÓN	36
1. <i>Determinación taxonómica del material algal</i>	36
2. <i>Rendimiento de los extractos y determinación cualitativa de metabolitos secundarios</i>	37
3. <i>Actividad antioxidante</i>	39
4. <i>Determinación antioxidante cuantitativa</i>	39
5. <i>Contenido de fenoles totales</i>	42
CONCLUSIONES	44
LITERATURA CITADA	45
APÉNDICES	51

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Pruebas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios	19
Cuadro 2. Determinación taxonómica del material algal	24
Cuadro 3. Rendimientos de los extractos algales	25
Cuadro 4. Determinación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios	26
Cuadro 5. Hemólisis ($\text{mm} \pm \text{SD}$) y tipo de los extractos algales.....	28
Cuadro 6. Determinación cualitativa y cuantitativa del porcentaje de reducción del radical DPPH.....	30
Cuadro 7. Actividad antioxidante de la reducción férrica (FRAP)	35
Cuadro 8. Cuantificación de fenoles totales	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de colecta en el Sistema Arrecifal Veracruzano	17
Figura 2. Porcentaje de especies algales por división	22
Figura 3. Porcentaje de especies algales por arrecife	23
Figura 4. Determinación cualitativa del radical DPPH' en los extractos hexánicos.....	29
Figura 5. Porcentaje de reducción del radical DPPH' del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	31
Figura 6. Porcentaje de reducción del radical DPPH' del extracto metanólico de <i>C. barbata</i>	31
Figura 7. Porcentaje de reducción del radical ABTS ⁺⁺ del extracto acetónico de <i>C. barbata</i>	32
Figura 8. Porcentaje de reducción del radical ABTS ⁺⁺ del extracto metanólico de <i>C. barbata</i>	33
Figura 9. Porcentaje de reducción del radical ABTS ⁺⁺ del extracto acetónico de <i>C. taylorii</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS⁺⁺	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)
CA₅₀	Capacidad antioxidante media
DPPH[·]	2,2-Difenil-1-picrilhidracilo
MS	Metabolitos secundarios
FRAP	Ferric reducing/antioxidant power (Poder antioxidante de la reducción férrica)
SAV	Sistema Arrecifal Veracruzano
TPTZ	Complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FDA	Food and Drug Administration (Administración de alimentos y medicamenos)

RESUMEN

Los metabolitos secundarios, conocidos comunmente como productos naturales son compuestos bioactivos que han sido utilizados para combatir diversas enfermedades. Estos compuestos son sintetizados por numerosos organismos como respuesta a las condiciones de estrés en las que se desarrollan. Las macroalgas son especies marinas que han demostrado ser una buena fuente de estos metabolitos que presentan diversas actividades biológicas como la antioxidante. Las algas son una interesante opción para la búsqueda de compuestos de naturaleza antioxidante por estar sometidas constantemente a estrés oxidativo y no presentar daños en su organismo. Es por eso que en este trabajo se evaluó la actividad antioxidante de 14 macroalgas colectadas en la zona Sur del Sistema Arrecifal Veracruzano. Las algas fueron identificadas por medio de claves taxonómicas, cortes histológicos y tinciones de este material; se determinaron 13 especies y un género. En el arrecife Giotte se colectó una especie, en Isla de Enmedio 9 especies y en Santiaguillo 4 especies; de las cuales 6 pertenecen al filo Rhodophyta (42.86%), 5 a Chlorophyta (35.71%) y 3 a Ochrophyta (21.43%). Los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de cada una de las 14 macroalgas fueron obtenidos a partir de la técnica de maceración y posteriormente se destilaron a presión reducida. Se determinó cualitativamente la presencia de alcaloides (Dragendorff y Mayer), fenoles (cloruro férrico), glicósidos (Molish), terpenos (vainillina-ácido sulfúrico) y saponinas (prueba de la espuma y hemólisis). La evaluación de la actividad antioxidante con la prueba de DPPH[•] se determinó en todos los extractos metanólicos y acetónicos, en los extractos hexánicos sólo se hizo de manera cualitativa. En la actividad reductora del radical ABTS^{•+}, del reactivo FRAP y el contenido de fenoles totales solo se trabajó con los extractos que sí mostraron actividad con el radical DPPH[•]. Los 42 extractos algales presentaron terpenos y saponinas, la corroboración de la presencia de saponinas (hemólisis) fue positiva en los tres extractos de las especies *Galaxaura rugosa*, *Tricleocarpa cylindrica*, *Caulerpa cupressoides*, *Cymopolia barbata* y *Dictyota sp.* En la prueba cualitativa de DPPH[•] diez especies presentaron actividad antioxidante. Los extractos acetónico y metanólico de *C. barbata* tuvieron una CA₅₀ frente al radical DPPH[•] de 127.66 y 637.78 y µg/mL, respectivamente, sin embargo también el extracto acetónico de *Codium taylorii* obtuvo uno de los mayores porcentajes de reducción del radical de 35.7% a 500 ppm. La

CA₅₀ de los extracto acetónico y metanólico de *C. barbata* que se obtuvo frente al radical ABTS^{•+} fue de 821.86 y 1244.08 µg/mL, respectivamente, y la del extracto acetónico de *C. taylorii* fue de 1053.88 µg/mL. Respecto al ensayo de FRAP, los extractos acetónico y metanólico de *C. barbata* presentaron valores de 12.04 y 46.00 µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto, respectivamente; el acetónico de *C. taylorii* obtuvo 11.34 µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto. Por último, el mayor contenido de fenoles totales se obtuvo en los extractos acetónicos de de *C. barbata* (6.13 %) y *C. taylorii* (40.06 %) y el menor en el metanólico *C. barbata* (35.89 %). Los resultados obtenidos en este trabajo, de manera específica en la especie *C. barbata*, sugieren que la actividad antioxidante de las macroalgas estudiadas esta relacionada con los compuestos fenólicos que contienen.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Estos han sido una fuente inagotable de compuestos activos que son utilizados para combatir muchas enfermedades con una gran efectividad (Rodríguez, 2003; Quesada, 2008). Dentro de estos compuestos activos se encuentran los que provienen del metabolismo secundario, a los cuales también se les conoce comúnmente como productos naturales (Pomilio, 2012).

Los metabolitos secundarios son de gran relevancia a nivel mundial en el tratamiento y la prevención de enfermedades humanas. Estas sustancias se originan de fuentes como las plantas, los animales y los microorganismos ya sean terrestres o marinos (Muñoz, 2010).

Tradicionalmente las plantas y los microorganismos de origen terrestre fueron las primeras fuentes de las que el hombre dispuso para ser utilizadas en la curación de dolencias y graves enfermedades tales como el cáncer. Debido a que en los océanos se encuentra la mayor biodiversidad del planeta se ha incrementado la búsqueda de compuestos químicos de origen marino; sin embargo esta exploración apenas ha tomado relevancia en los últimos años ya que escasamente se conocen aproximadamente unos quince mil productos naturales marinos que tan solo representa una décima parte de los que provienen de organismos terrestres (De la Calle, 2007; Rodríguez, 2003).

Los organismos marinos están expuestos a diversas condiciones que pudieran ser dañinas para su supervivencia, por ejemplo, el estrés halino o térmico, la radiación, superpoblación, la competencia, infección o la limitación de nutrientes (Pomilio, 2012; De Lara-Isassi, 1991). Como respuesta a todos estos estímulos, los especímenes biosintetizan metabolitos secundarios, a los que el ser humano les ha encontrado diferentes aplicaciones, algunos como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, citotóxicos, antiparasitarios, antivirales, antioxidantes, entre otros (De la Rosa y Gamboa, 2004).

Los antioxidantes naturales han adquirido importancia en estudios recientes debido a que pueden sustituir a los sintéticos en la prolongación de la vida útil de alimentos y cosméticos, esto se debe a que a pesar de la eficacia y bajo costo de los antioxidantes

sintéticos, estos han demostrado efectos tóxicos y actividad carcinogénica (Batista *et al.*, 2009); además de que los antioxidantes naturales actúan contra el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la exposición a la luz UV (Balboa *et al.*, 2013).

Dentro de los especímenes marinos que han llamado la atención por ser fuente de antioxidantes naturales se encuentran las macroalgas. Estos organismos al ser fotosintetizadores están expuestos a una alta incidencia de luz solar y altas concentraciones de oxígeno que pudieran conducir a la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes; sin embargo, estos organismos no muestran daños oxidativos en sus componentes estructurales y fisiológicos, lo que sugiere que presentan un eficiente sistema de defensas antioxidantes (Zubia *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2009; Balboa *et al.*, 2013).

Actualmente, la biota marina, incluidas las macroalgas, son tendencia en la investigación ya que poseen una gran variedad de compuestos bioactivos proporcionada por estructuras químicas complejas y novedosas que son difíciles de obtener sintéticamente (Vidal *et al.*, 2009).

ANTECEDENTES

En los últimos años diversos trabajos se han enfocado a buscar el efecto antioxidante de las macroalgas debido a los sistemas que han desarrollado para protegerse de la formación de agentes oxidantes causados por su constante exposición a la luz solar y las altas concentraciones de oxígeno en las que viven (Batista *et al.*, 2009). En algunas especies de algas se ha demostrado que su actividad antioxidante está relacionada con la presencia de diferentes compuestos como los clorofílicos, terpenoides, carotenoides y los polifenoles. Ciertos mecanismos que pudieran explicar las propiedades antioxidantes de las macroalgas son la capacidad que poseen como atraparoras de radicales libres, como donadores de hidrógeno o el potencial que tienen como agentes reductores y quelantes (Vidal *et al.*, 2001 y 2009; Batista *et al.*, 2009).

Pérez-Pérez y colaboradores (2009) en Venezuela determinaron la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos crudos de *Gracilaria* sp, *Laurencia* sp, *Gelidium* sp y *Bryothamnion* sp. Estos autores reportan que los cuatro extractos acuosos algales tuvieron la capacidad

de disminuir la generación de radicales libres como el anión superóxido y el radical hidroxilo. Los valores de la capacidad antioxidante de los extractos algales fueron de 0.38 a 0.61 mM equivalentes de ácido úrico y obtuvieron valores de 119 a 1138 mg/L de fenoles totales. Estos autores reportan una correlación directa entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de cada uno de los extractos.

Vidal y colaboradores (2006) estudiaron nuevamente la composición química y las propiedades antioxidantes del extracto acuoso del alga *B. triquetrum* encontrando una CA_{50} de 4.66 mg de una muestra liofilizada frente al radical DPPH[•], sin embargo consideraron que la actividad antioxidante podía ser explicada por un efecto sumatorio y/o sinérgico de compuestos presentes en la muestra como son ácidos fenólicos, minerales, carotenoides y ácido ascórbico. Estos autores en el 2009 estudiaron la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles de las macroalgas *Halimeda opuntia* y *H. monile* mediante el método de atrapamiento del radical DPPH[•], obteniendo como resultados una CA_{50} en las fracciones de ácidos fenólicos libres de 12.8 y 13.2 μ g, en las de ésteres solubles de ácidos fenólicos de 14.4 y 14.7 μ g, y de ésteres insolubles de ácidos fenólicos de 15.2 y 7.7 μ g; y también reportan un contenido de compuestos fenólicos de 74.25 mg/g de alga seca y 66.72 mg/g de alga seca para *H. opuntia* y *H. monile*, respectivamente.

En 2009, Echavarría y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante mediante el método de DPPH[•] y el contenido de compuestos fenólicos de cinco macroalgas Colombianas, estos autores reportaron la mayor actividad en el extracto metanólico de *Sargassum cymosum* con una CA_{50} de 0.261 mg/mL y un contenido total de fenoles de 0.822 mg/g de extracto como equivalentes de ácido gálico.

Para México existe el trabajo de Zubia y colaboradores en 2007 que evaluaron la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales de 48 extractos de macroalgas de las costas de Yucatán y Quintana Roo. Todas las macroalgas colectadas mostraron actividad contra el radical DPPH[•]; sin embargo, las especies *A. longicaulis*, *C. baileyana* y *L. variegata* fueron las que presentaron mayor actividad antioxidante con una CA_{50} de 1.44, 2.84 y 0.32 mg/mL, respectivamente. En cuanto al contenido de fenoles totales, reportan a *A. longicaulis* con 3.36%, *C. baileyana* con 7.30% y *L. variegata* con 29.18%.

Muñoz en el 2010 estudió los extractos etanólicos de 62 especies de macroalgas recolectadas en la península de Baja California Sur. La especie *Padina mexicana* mostró potencial antioxidante por lo que fue seleccionada por el autor para estudiar dicha actividad, por medio de extracción sólido-líquido obtuvo más de 90 fracciones y tres compuestos puros. De las 90 fracciones la más activa mostró una CA₅₀ de 45.5 µg/mL.

En 2011, Vargas-Betancourt y colaboradores evaluaron la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales en extractos de macroalgas de La Bahía de la Paz, Baja California Sur, encontrando una mayor actividad antioxidante en el extracto de *Padina concrenscens* con un valor de CA₅₀ de 0.29 mg/mL y 123.9 mg EAG/mg extracto de fenoles totales.

La investigación de Avila en 2016 constituye el primer trabajo en el que se ha determinado la actividad antioxidante de macroalgas colectadas en el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV). Este autor estudió la reducción del radical DPPH[•] y el contenido de fenoles totales de *Cymopolia barbata*, reportando en el extracto acetónico una CA₅₀ de 226.97 µg/mL y 15.81 µg EAG/mg de extracto de fenoles, y en el metanólico una CA₅₀ de 106.78 µg/mL y una cantidad de fenoles de 20.38 µg EAG/mg de extracto. Posteriormente, Hernández (2016) determinó la actividad antioxidante de 11 especies de algas colectadas en la zona Norte del SAV con los ensayos de DPPH[•], ABTS^{•+} y FRAP; este autor reporta un porcentaje de reducción de DPPH[•] a 500 ppm en los extractos metanólicos de *Caulerpa racemosa* de 38.21% y *Tricleocarpa cylindrica* de 36.42%, sin embargo, en sus resultados no obtuvo actividad sobre el radical ABTS^{•+} ni sobre la reducción del ión Fe^{*3}.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que en los últimos años se ha despertado un mayor interés por encontrar compuestos antioxidantes naturales esta búsqueda ha sido enfocada principalmente en organismos del medio terrestre, prestándose poca atención a los organismos marinos. En el medio marino, las macroalgas se muestran como candidatas ideales para encontrar compuestos antioxidantes debido a que utilizan estos como respuesta a las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidas como la radiación solar, el estrés térmico

o la limitación de nutrientes. En México, la investigación de antioxidantes en algas es escasa; en el caso particular del SAV hasta el momento sólo hay dos trabajos. Es por eso que en el presente estudio se pretende contribuir a la búsqueda de compuestos antioxidantes en las macroalgas del SAV.

Pregunta de investigación

¿Las macroalgas del SAV, zona Sur tendrán actividad antioxidante?

Hipótesis

Las macroalgas se encuentran sometidas constantemente a diversos factores de estrés, debido a esto sintetizan metabolitos secundarios con diferentes bioactividades, entre ellas la antioxidante, por lo tanto se espera que las macroalgas del presente estudio también contengan dichos metabolitos con actividad antioxidante.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la actividad antioxidante de algunas especies de macroalgas de la zona Sur del SAV.

Particulares

- Colectar diferentes macroalgas en tres arrecifes de la zona Sur del SAV.
- Determinar taxonómicamente las especies de macroalgas colectadas.
- Obtener extractos de diferente polaridad del material algal.
- Calcular el rendimiento de los extractos de las macroalgas del SAV.
- Determinar cualitativamente los principales grupos de metabolitos secundarios en los extractos algales.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos algales.

- Cuantificar el contenido de fenoles en los extractos que presenten actividad antioxidante.

ZONA DE COLECTA

En la parte suroeste del Golfo de México se localiza el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) (Fig. 1), en el polígono delimitado por los 19° 15' y 19° 16' N y los 95° 45' y 96° 12' O. Está constituido por 28 arrecifes coralinos y se encuentra dividido, de manera natural, en dos sectores debido a la desembocadura del río Jamapa. El sector Norte, ubicado frente al puerto de Veracruz, y el sector Sur, frente al poblado de Antón Lizardo. La temperatura promedio anual es de 26 °C y el clima esta definido como cálido-húmedo con lluvias en verano, presentándose tres épocas en el año: secas (marzo-mayo, mínima precipitación y temperatura promedio de 24° C), lluvias (junio-octubre, alta precipitación y altas temperaturas) y nortes (noviembre-febrero, escasa precipitación y bajas temperaturas) (Tunnell, 1988; Parra-Toriz *et al.*, 2011; Rodríguez, 2013).

Los arrecifes elegidos para realizar la colecta fueron Giote, Isla de Enmedio y Santiaguillo. Cada uno de estos fue seleccionado de acuerdo a la zonificación ecosistémica hecha en el SAV por Ortíz-Lozano *et al.* en 2009; el primer arrecife se eligió en la franja litoral, el segundo en arrecifes interiores y el último en los arrecifes exteriores.

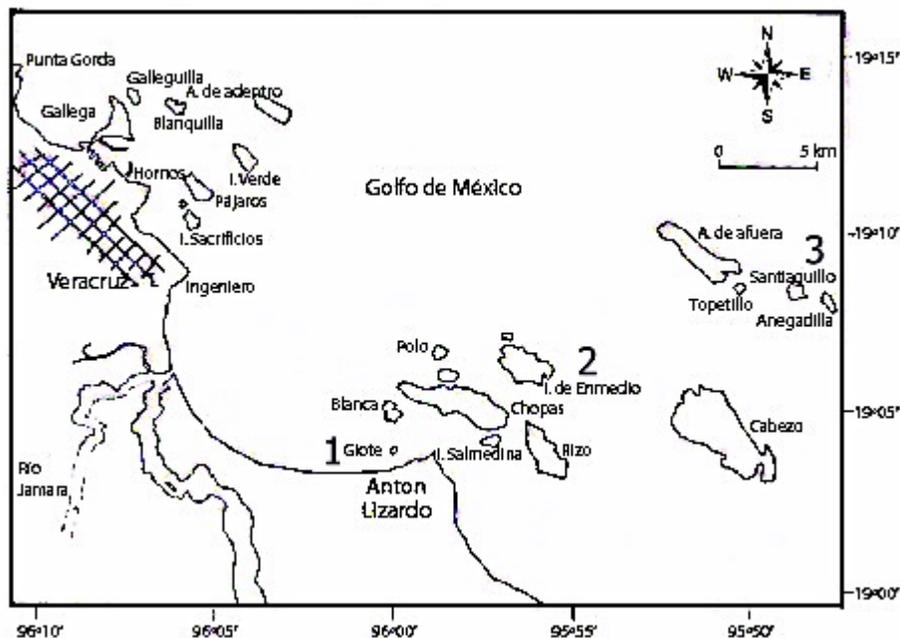


Figura 1. Zona de colecta en el Sistema Arrecifal Veracruzano. 1) Giote, 2) Isla de Enmedio y 3) Santiaguillo (Fuente: Parra-Toriz *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta del material algal

El muestreo de las macroalgas se realizó manualmente en tres arrecifes del sector Sur (Giote, Isla de Enmedio y Santiaguillo) del SAV. El muestreo se llevó a cabo los días 18 y 19 de Junio del 2014 que corresponde a la temporada de lluvias. Las macroalgas fueron colectadas y de éstas se tomó una parte la cual se enjuagó con agua de mar para eliminar el exceso de arena y organismos epífitos para su posterior registro en el herbario. Los datos de colecta anotados en la bitácora fueron: número de muestra, arrecife, hora, coordenadas y profundidad. Posteriormente se colocaron en bolsas de plástico y se depositaron en una hielera para su transporte al laboratorio de Farmacognosia en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala.

2. Determinación del material algal

Una parte del material algal colectado se conservó en formol y glicerol al 10%, preparados con agua de mar, para su posterior determinación taxonómica. La identificación se realizó, con ayuda de la M. en C. Gloria Garduño Solórzano, por medio de diversas claves taxonómicas mediante la observación de estructuras externas e internas, con ayuda de cortes y tinciones. La literatura utilizada fue: Brandão, 1967; Aviles, 1990; Littler y Litter, 2000; Ortega *et al.*, 2001; Senties y Dreckmann, 2002; Dawes y Mathieson, 2008. También se elaboraron ejemplares de herbario los cuales fueron depositados en el Herbario IZTA de la FES Iztacala y se obtuvo el número de registro.

3. Obtención del extracto algal

Las macroalgas fueron maceradas en solventes de diferente polaridad (hexano, acetona y metanol) por cuatro días. Los macerados obtenidos fueron filtrados y posteriormente destilados a presión reducida para la obtención del extracto algal. Finalmente, se calculó el rendimiento por diferencia de peso con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso seco del alga}} \times 100$$

4. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Los principales grupos de MS que se determinaron en los extractos algales fueron: alcaloides (Dragendorff y Mayer), fenoles (Cloruro férrico), glicósidos (Molish) y terpenos (Vainillina-ácido sulfúrico) (Domínguez, 1973). Para las saponinas se realizó la prueba de la espuma, sin embargo esta prueba no es concluyente, por lo que se corroboró la presencia con el ensayo de hemólisis en agar sangre (Rodríguez, 2010; Hernández y Hermosilla, 2014) (Cuadro 1) (Apéndice 1).

Cuadro 1. Pruebas cualitativas para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios.

Grupo	Reactivo	Resultado
Alcaloides	Dragendorff Mayer	Precipitado café Precipitado blanco
Fenoles	Cloruro férrico	Coloración azul o verde
Glicósidos	Molish	Anillo morado
Terpenos	Vainillina-ácido sulfúrico	Coloración azul, morada o roja
Saponinas	Agua caliente Agar sangre	Espuma por al menos un minuto Halos de hemólisis

5. Actividad antioxidante de los extractos algales

La actividad antioxidante se evaluó por los siguientes métodos:

- **Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo o DPPH[•].** La molécula 2,2 difenil-1-picrilhidracilo se caracteriza por ser un radical libre en virtud del desapareamiento de un par de electrones en su estructura confiriéndole un color violeta en solución metanólica, caracterizado por tener una absorción a 493 nm. Cuando la solución de DPPH[•] es mezclada con un sustrato capaz de donar átomos de hidrógeno, esta sustancia se reduce, cambiando de color a amarillo claro (Balboa *et al.*, 2013) (Anexo 2).

La prueba cualitativa se realizó en placas cromatográficas de sílica gel donde se colocó el extracto algal para ser revelado posteriormente con DPPH[•]. La actividad antioxidante se reporta como positiva al producirse el cambio de coloración de violeta a amarillo.

El ensayo cuantitativo se realizó en los extractos algales en concentraciones de 31.2 a 500 $\mu\text{g/mL}$. El control positivo fue ácido gálico (5-35 $\mu\text{g/mL}$). La prueba se realizó con ocho repeticiones. El porcentaje de reducción del radical se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de reducción del radical DPPH} = \frac{C - E}{C} \times 100$$

donde:

C= media aritmética de la absorbancia del DPPH'.

E= media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Los resultados fueron reportados por medio de la CA_{50} (capacidad antioxidante media), esta es determinada por el porcentaje de decoloración del DPPH' de cada una de las concentraciones de la muestra.

La CA_{50} expresa la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% al radical DPPH', esto calculado por medio de una regresión lineal. Valores bajos de CA_{50} indican un potencial antioxidante mayor (García-Bores, 2010; Avila, 2016).

- **Método de reducción del radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) o ABTS^{•+}**. Este método evalúa la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}, la cual se debe a su reducción al interaccionar con moléculas donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo color verde-azulado, absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS^{•+} con persulfato de potasio (Palomino *et al.*, 2009) (Apéndice 3).

El ensayo se realizó por triplicado en concentraciones de 200 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de extracto con una curva patrón de ácido gálico (5-35 $\mu\text{g/mL}$) como referencia. El porcentaje de reducción de ABTS^{•+} se calculo con siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = \frac{Ac - Am}{Ac} \times 100$$

donde:

Ac= media aritmética de la absorbancia del control.

Am= media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Los resultados se reportaron por medio de una CA₅₀ del extracto algal frente al radical ABTS^{•+}.

- **Método del poder antioxidante de la reducción férrica o FRAP.** El método FRAP determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar un electrón al Fe³⁺ (oxidado) para pasar a Fe²⁺ (reducido). El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Este método mide la absorbancia del Fe²⁺, de tal manera que cuánto más antioxidante es la sustancia mayor es la reducción y mayor es la concentración de Fe²⁺ y es más alta la absorbancia (Palomino *et al.*, 2009) (Apéndice 4).

La prueba se realizó por triplicado utilizando concentraciones de 200 a 1000 µg/mL del extracto algal. La absorbancia final de las muestras fue comparada con una curva de referencia de ácido gálico (5-35 µg/mL).

Los resultados del ensayo fueron reportados como µg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto (µg EAG/mg de extracto).

6. Contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. El cual mide la reacción colorimétrica de óxido reducción en la que el reactivo utilizado tiene una coloración amarilla que, en presencia de un fenol, se torna azul. La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 725 nm (Serrano, 2013) (Apéndice 5).

La prueba se hizo por triplicado usando una curva patrón de ácido gálico (5-35 µg/mL) en

las que se interpoló la absorbancia de los extractos algales (5 y 10 µg/mL). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico/mg de extracto (EAG/mg de extracto).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

1. Colecta del material algal y determinación taxonómica

El total de macroalgas colectadas fue de 14 organismos, de las cuales se identificaron 13 especies y un género. La mayor riqueza pertenece a la división Rhodophyta con el 42.86% (6 especies), seguido de Chlorophyta con 35.71% (5 especies) y la división Ochrophyta con 21.43% (3 especies) (Figura 2). El mayor número de especies se colectó en el arrecife Isla de Enmedio con 9 especies (64.29%), en el arrecife Santiaguillo se colectaron 4 especies (28.57%) y en Giote una especie (7.14%) (Figura 3).

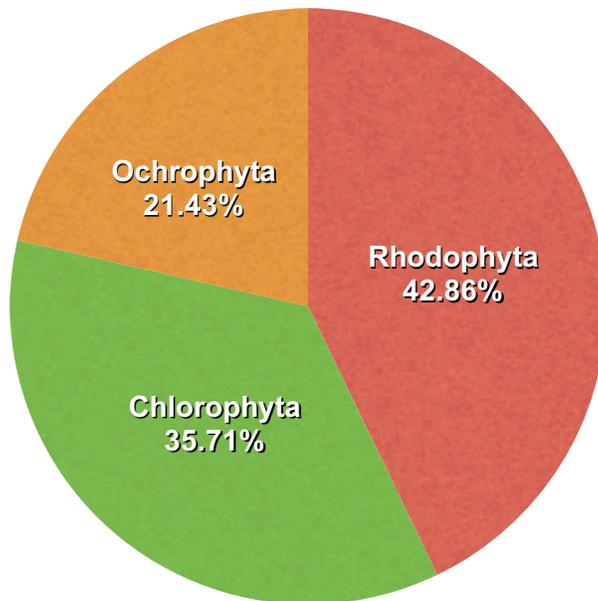


Figura 2. Porcentaje de especies algales por división.

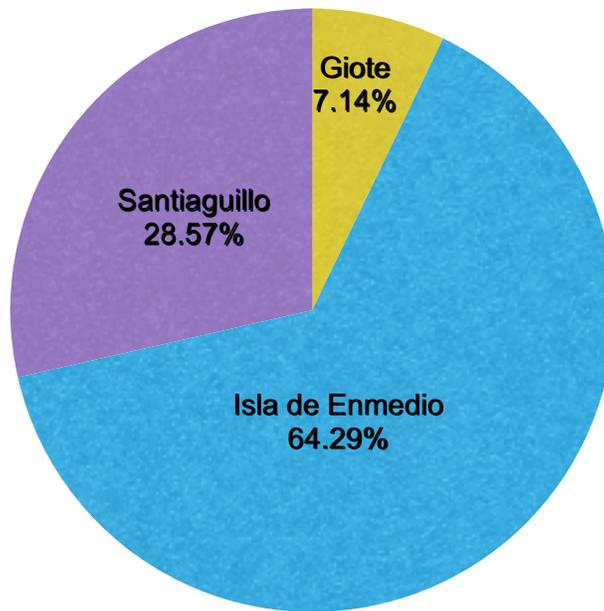


Figura 3. Porcentaje de especies algales por arrecife.

En el cuadro 2 se muestran las 14 especies determinadas y el número de herbario que les fue asignado. En el arrecife Giote la especie colectada corresponde a *Ceramium flaccidum* (Rhodophyta). Para Isla de Enmedio se determinaron cuatro especies de la división Chlorophyta, tres especies de Rhodophyta y dos de Ochrophyta. Por último, en Santiaguillo las especies identificadas corresponden a la división Chlorophyta y Ochrophyta, y dos especies de la división Rhodophyta.

Cuadro 2. Determinación taxonómica del material algal.

Arrecife	División	Especie/Descriptor	Nº de herbario IZTA	
Giote	Rhodophyta	<i>Ceramium flaccidum</i> (Harvey ex Kützinger) Ardissonne	1818	
		<i>Caulerpa cupressoides</i> (Vahl) C.Agardh	1865	
Isla de Enmedio	Chlorophyta	<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskål) J. Agardh	1863	
		<i>Codium taylorii</i> P.C.Silva	1866	
		<i>Cymopolia barbata</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	1864	
		<i>Padina sanctae-crucis</i> Børgesen	1868	
	Ochrophyta	<i>Sargassum natans</i> (Linnaeus) Gaillon	1867	
		<i>Galaxaura rugosa</i> (J.Ellis y Solander) J.V.Lamouroux	1862	
	Rhodophyta	<i>Tricleocarpa cylindrica</i> (J.Ellis y Solander) Huisman y Borowitzka	1860	
		<i>Digenea simplex</i> (Wulfen) C.Agardh	1861	
	Santiaguillo	Chlorophyta	<i>Halimeda opuntia</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	1872
		Ochrophyta	<i>Dictyota sp.</i> J.V.Lamouroux	1871
Rhodophyta		<i>Centroceras clavulatu</i> (C.Agardh) Montagne	1870	
		<i>Ceramium nitens</i> (C. Agardh) J. Agardh	1869	

2. Rendimiento de los extractos

En el cuadro 3 se muestran los rendimientos de los extractos algales. En los extractos hexánicos el mayor rendimiento lo presenta *C. flaccidum* (Giote) con 10.07%, también destacan los rendimientos de *C. racemosa* con 2.51% y *S. natans* con 2.50%, ambas especies de Isla de Enmedio. En el arrecife de Santiaguillo el mayor rendimiento se obtuvo en *C. clavulatum* con 1.47%.

En los extractos acetónicos el mayor rendimiento fue de 4.20% en *C. flaccidum* (Giote) destacando también los rendimientos de *C. cupressoides* (Isla de Enmedio) con 2.34% y *Dictyota sp.* de arrecife Santiaguillo con 1.30%.

El mayor rendimiento en los extractos metanólicos fue de 15.62% en *C. flaccidum* (Giote), también se obtuvieron resultados notables en las muestras de *C. cupressoides* (2.55%), *C. racemosa* (3.45%) y *C. taylorii* (10.37%) de Isla de Enmedio, y del arrecife Santiaguillo de *C. clavulatum* y *Dictyota sp.* con 2.90% y 4.97%, respectivamente.

Cuadro 3. Rendimientos de los extractos algales (%).

Arrecife	Especie	Hexano (%)	Acetona (%)	Metanol (%)	
Giote	<i>C. flaccidum</i>	10.07	4.20	15.62	
	<i>C. barbata</i>	0.28	0.67	0.06	
Isla de Enmedio	<i>C. cupressoides</i>	0.87	2.34	2.55	
	<i>C. racemosa</i>	2.51	0.79	3.45	
	<i>C. taylorii</i>	0.36	0.11	10.37	
	<i>D. simplex</i>	0.24	0.17	0.44	
	<i>G. rugosa</i>	0.04	0.18	0.54	
	<i>P. sanctae-crucis</i>	0.35	1.19	1.60	
	<i>S. natans</i>	2.50	1.04	0.97	
	<i>T. cylindrica</i>	0.05	0.31	0.68	
	Santiaguillo	<i>C. clavulatum</i>	1.47	1.18	2.90
		<i>C. nitens</i>	0.17	0.17	0.63
<i>Dictyota sp.</i>		0.84	1.30	4.97	
<i>H. opuntia</i>		1.41	0.16	0.42	

3. Determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Los resultados de la determinación cualitativa de metabolitos secundarios de las macroalgas colectadas se muestra en el cuadro 4. Las 14 algas en sus tres extractos presentaron saponinas y terpenos. *D. simplex* (Isla de Enmedio) y *C. nitens* (Santiaguillo) fueron las únicas especies que mostraron alcaloides en sus extractos metanólicos.

Cuadro 4. Determinación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios.

Arrecife	Especie	Hexano				Acetona				Metanol										
		Alcaloides		F	G	S	T	Alcaloides		F	G	S	T	Alcaloides		F	G	S	T	
		D	M					D	M					D	M					
Grote	<i>C. flaccidum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	<i>C. barbata</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	<i>C. cupressoides</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	<i>C. racemosa</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	<i>C. taylorii</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	Isla de Enmedio	<i>D. simplex</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
		<i>G. rugosa</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
		<i>P. sanctae-crucis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
		<i>S. natans</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
		<i>T. cylindrica</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Santiaguillo	<i>C. clavulatum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	<i>C. nitens</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	
	<i>Dictyota sp.</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	
	<i>H. opuntia</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	

Simbología: - = ausencia, += presencia, F= fenoles, G= glicósidos, S= saponinas, T= Terpenos, D= Dragendorff y M= Mayer.

Determinación de saponinas por medio de hemólisis

La hemólisis β se presentó en la mayoría de los extractos algales (11 especies) y la hemólisis tipo α se obtuvo en nueve especies. En los extractos hexánicos, la hemólisis β se mostró en *G. rugosa* y *T. cylindrica* (Isla de Enmedio) y *Dictyota sp.* de Santiaguillo; la hemólisis α se obtuvo en *C. barbata* y *C. cupressoides* del arrecife Isla de Enmedio. En los extractos acetónicos y metanólicos de las macroalgas la hemólisis tipo β estuvo

presente en seis especies, seguida de la α con cinco y seis especies, respectivamente (Cuadro 5).

Los Hemólisis de extractos algal en los extractos hexánicos se presentaron en cinco especies: *G. rugosa*, *T. cylindrica*, *C. cupressoides*, *C. barbata* (Arrecife Isla de Enmedio), *Dictyota sp.* (Santiaguillo); el halo mas grande se obtuvo en *G. rugosa* (21.5 ± 0.70 mm) seguido de *T. cylindrica* 18.6 ± 0.5 mm.

En los extractos acetónicos 10 especies presentaron hemólisis. El halo mayor fue en *C. barbata* con 10.5 ± 0.70 mm seguido de *C. taylorii* con 8.3 ± 0.5 mm, ambas especies del arrecife Isla de Enmedio.

En los extractos metanólicos se presentó actividad en 12 especies, las halos de mayor tamaño se obtuvieron en *C. racemosa* (14 ± 4.35 mm), *G. rugosa* (10.3 ± 0.5 mm), *C. cupressoides* (9.6 ± 0.5 mm) de Isla de Enmedio y *H. opuntia* (9.6 ± 1.1 mm) de Santiaguillo.

Las especies algales en las que se observó hemólisis en sus tres extractos son *G. rugosa*, *T. cylindrica*, *C. cupressoides*, *C. barbata* de Isla de Enmedio y *Dictyota sp.* del arrecife Santiaguillo.

C. barbata fue la única especie de alga que presentó el mismo tipo de hemólisis (α) en sus tres extractos.

Cuadro 5. Hemólisis (mm \pm SD) y tipo de extractos algales.

Especie	Hexano		Acetona		Metanol	
	Halo	Tipo de hemólisis	Halo	Tipo de hemólisis	Halo	Tipo de hemólisis
<i>C. barbata</i>	6.0 \pm 0.0	α	10.5 \pm 0.7	α	6.0 \pm 0.0	α
<i>C. clavulatum</i>	0.0 \pm 0.0		0.0 \pm 0.0		6.3 \pm 0.5	β
<i>C. cupressoides</i>	7.0 \pm 0.0	α	6.3 \pm 0.5	β	9.6 \pm 0.5	α
<i>C. flaccidum</i>	0.0 \pm 0.0		0.0 \pm 0.0		0.0 \pm 0.0	
<i>C. nitens</i>	0.0 \pm 0.0		0.0 \pm 0.0		6.3 \pm 0.5	β
<i>C. racemosa</i>	0.0 \pm 0.0		6.6 \pm 0.5	β	14.0 \pm 4.3	β
<i>C. taylorii</i>	0.0 \pm 0.0		8.3 \pm 0.5	β	6.6 \pm 0.5	α
<i>D. simplex</i>	0.0 \pm 0.0		7.0 \pm 0.0	α	8.0 \pm 0.0	β
<i>Dictyota sp.</i>	9.0 \pm 0.0	β	6.6 \pm 0.5	α	8.0 \pm 0.0	α
<i>G. rugosa</i>	21.5 \pm 0.7	β	6.6 \pm 0.5	α	10.3 \pm 0.5	β
<i>H. opuntia</i>	0.0 \pm 0.0		8.0 \pm 0.0	β	9.6 \pm 1.1	β
<i>P. sanctae-crucis</i>	0.0 \pm 0.0		7.0 \pm 0.0	β	7.0 \pm 0.0	α
<i>S. natans</i>	0.0 \pm 0.0		0.0 \pm 0.0		0.0 \pm 0.0	
<i>T. cylindrica</i>	18.6 \pm 0.5	β	8.0 \pm 0.0	β	8.3 \pm 0.5	α

4. Actividad antioxidante

- **Método de reducción del radical DPPH'**

La determinación cualitativa de la actividad antioxidante de los extractos hexánicos se realizó en placas cromatográficas reveladas con DPPH'; dicha actividad se presenta como positiva al producirse una reducción que se observa como el cambio de color de violeta a amarillo. Este cambio se puede observar en la figura 4, donde se muestran las placas de las diez especies que dieron positivo a la prueba.

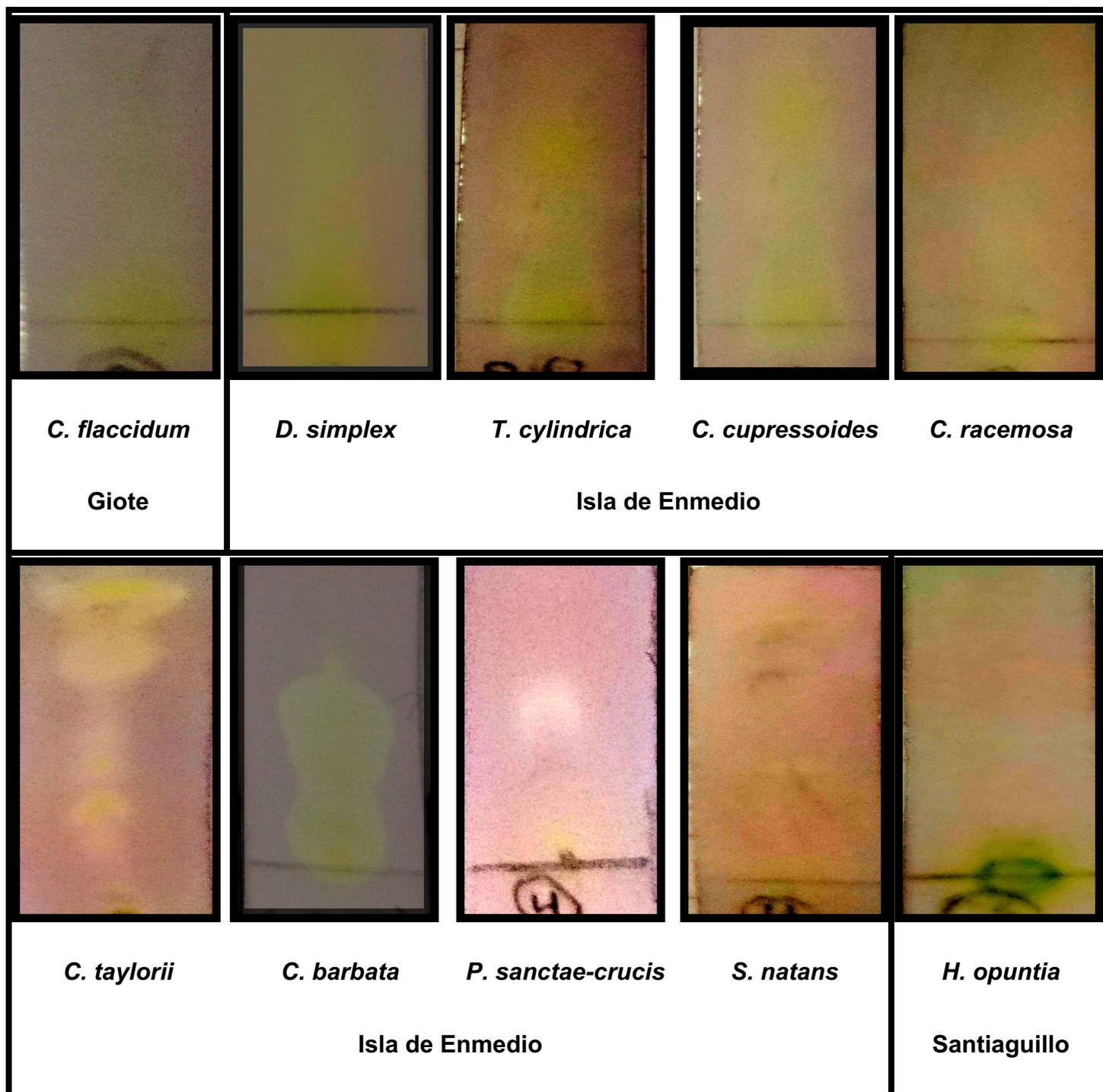


Figura 4. Determinación cualitativa del radical DPPH' en los extractos hexánicos.

En el cuadro 6 se muestra la determinación de la actividad antioxidante, en el que se observan tanto las pruebas cualitativas de DPPH' en los extractos hexánicos como el porcentaje de reducción de dicho radical a 500 µg/mL en los extractos algales acetónicos

y metanólicos. Para los extractos hexánicos diez especies fueron positivas a la prueba cualitativa de DPPH'. En los extractos acetónicos sólo tres especies (*G. rugosa*, *C. taylorii* y *C. nitens*) presentaron porcentaje de reducción a 500 µg/mL con valores de 0.627, 35.7 y 11.73%, respectivamente. En los extractos metanólicos dos especies, *D. simplex* y *C. nitens*, presentaron porcentaje de reducción a 500 µg/mL con valores de 6.58 y 1.82%, respectivamente.

Cuadro 6. Determinación cualitativa y cuantitativa del porcentaje de reducción del radical DPPH'.

Especie	Determinación cualitativa de DPPH'	% de reducción de DPPH' (500 µg/mL)	
		Hexano	Acetona Metanol
<i>C. flaccidum</i>	+	0	0
<i>D. simplex</i>	+	0	6.58
<i>G. rugosa</i>	-	0.627	0
<i>T. cylindrica</i>	+	0	0
<i>C. cupressoides</i>	+	0	0
<i>C. racemosa</i>	+	0	0
<i>C. taylorii</i>	+	35.7	0
<i>P. sanctae-crucis</i>	+	0	0
<i>S. natans</i>	+	0	0
<i>C. clavulatum</i>	-	0	0
<i>C. nitens</i>	-	11.73	1.82
<i>H. opuntia</i>	+	0	0
<i>Dictyota sp.</i>	-	0	0

El extracto acetónico y metanólico de la especie *C. barbata* presentó una CA₅₀ menor a los 500 µg/mL por lo que se evaluó la actividad antioxidante en concentraciones de 37.5 a 300 µg/mL. El extracto acetónico presentó una CA₅₀ de 127.66 µg/mL (Figura 5) y el metanólico una CA₅₀ de 637.78 µg/mL (Figura 6).

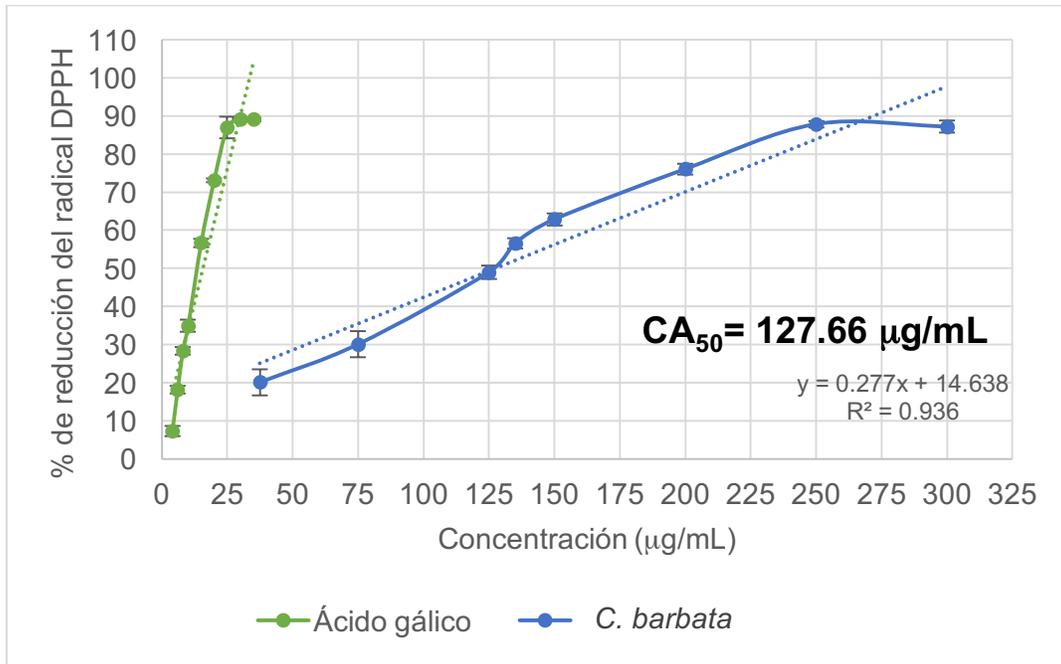


Figura 5. Porcentaje de reducción del radical DPPH' del extracto acetónico de *C. barbata*.

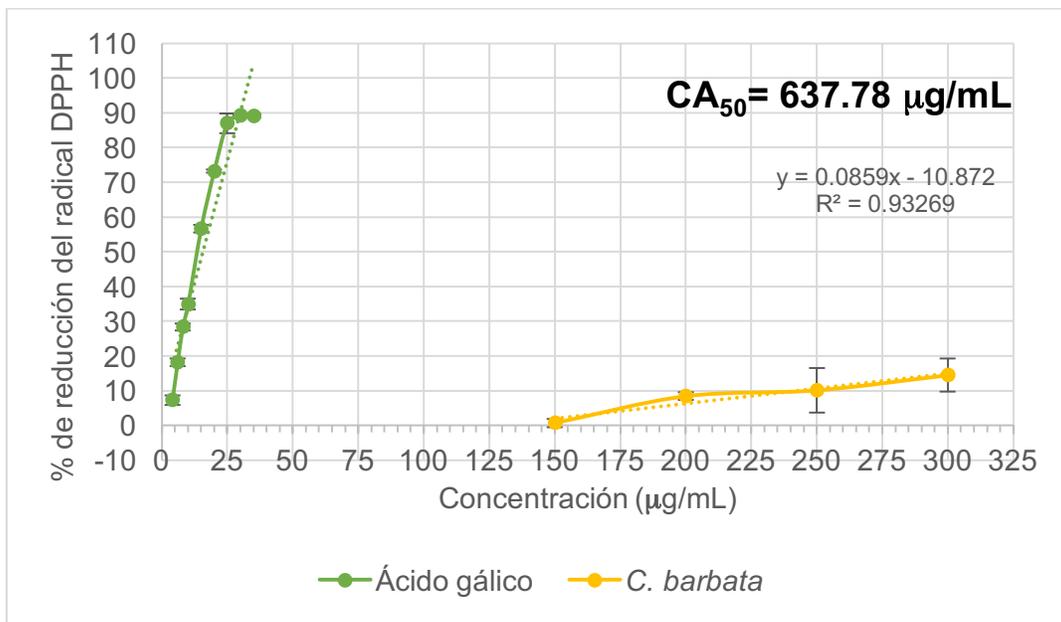


Figura 6. Porcentaje de reducción del radical DPPH' del extracto metanólico de *C. barbata*.

- **Método de reducción del radical ABTS^{•+}**

La actividad antioxidante por el método de reducción del radical ABTS^{•+} y FRAP se realizó en los tres extractos que presentaron una mayor reducción del radical DPPH[•], siendo estos el acetónico y metanólico de *C. barbata* y el extracto de acetona de *C. taylorii*.

La especie *C. barbata* obtuvo una CA₅₀ de 821.86 y 1244.08 µg/mL en el extracto de acetona (Figura 7) y metanol (Figura 8), respectivamente.

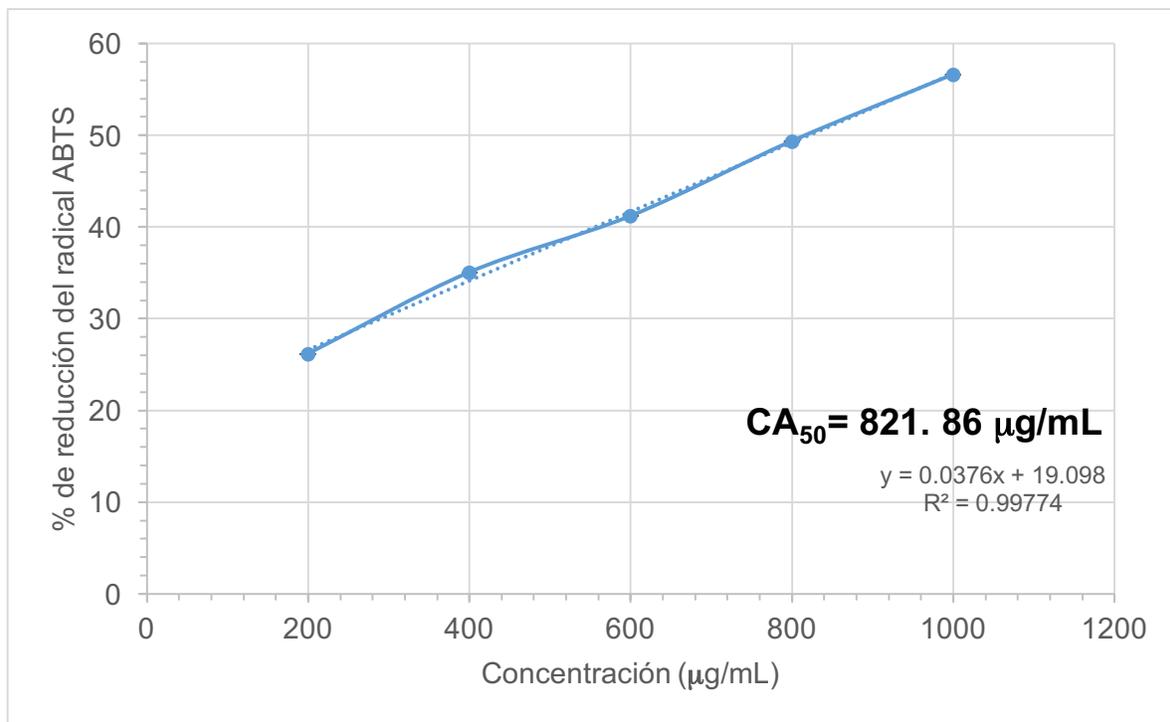


Figura 7. Porcentaje de reducción del radical ABTS^{•+} del extracto acetónico de *C. barbata*.

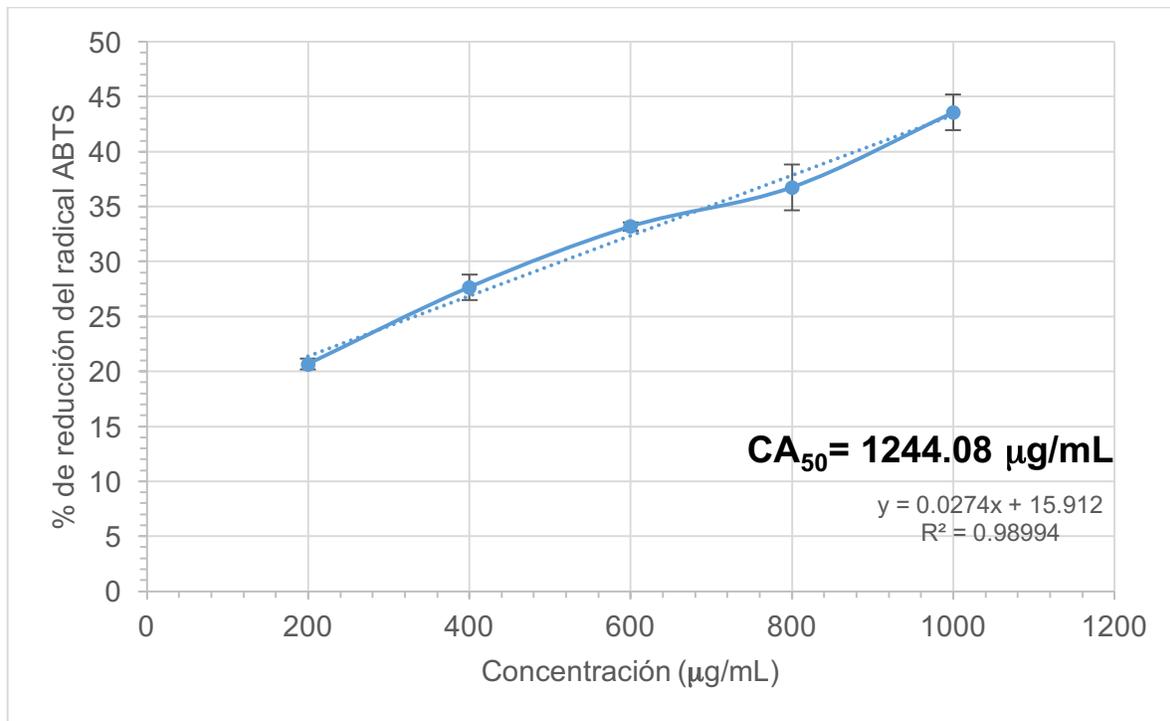


Figura 8. Porcentaje de reducción del radical ABTS^{•+} del extracto metanólico de *C. barbata*.

En el caso del extracto acetónico de *C. taylorii* se obtuvo una CA_{50} de 1053.88 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9).

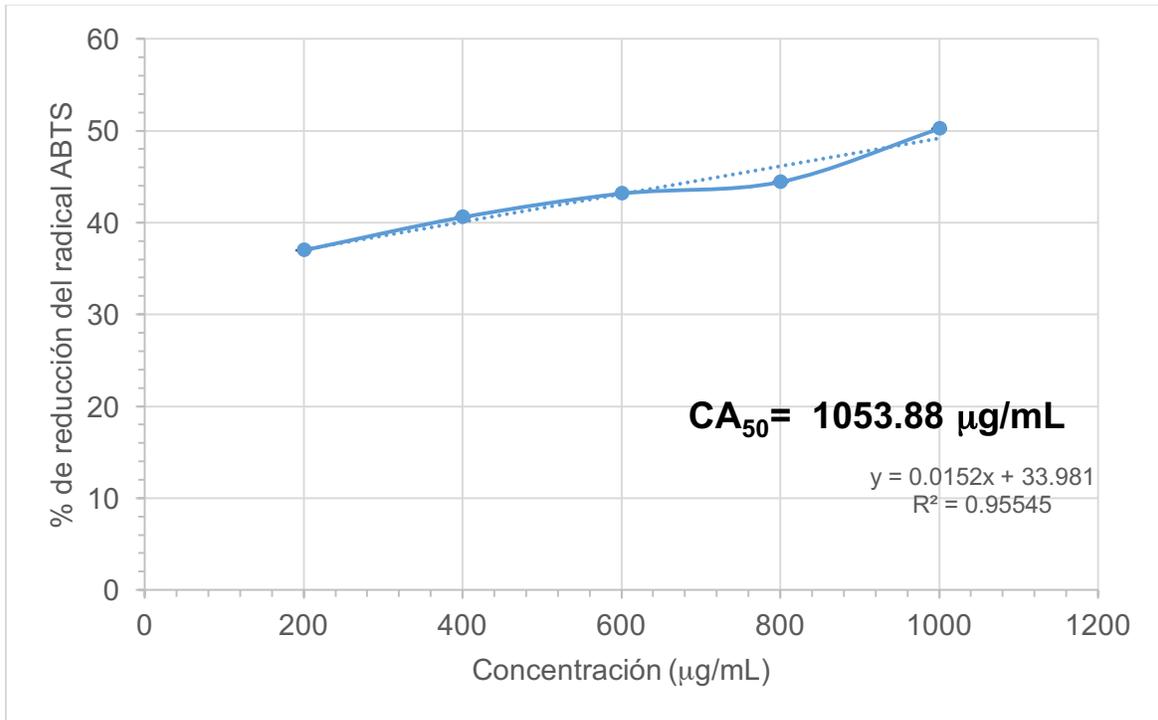


Figura 9. Porcentaje de reducción del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ del extracto acetónico de *C. taylorii*.

- **Método del poder reductor o FRAP.**

El poder reductor se determinó en el extracto acetónico y metanólico de *C. barbata* y el acetónico de *C. taylorii*, la curva patrón fue realizada con ácido gálico. Los resultados son expresados en μg (EAG)/mg de extracto (Cuadro 7). El extracto algal que obtuvo el mayor poder reductor fue el extracto metanólico de *C. barbata* seguido del acetónico de la misma especie con un valor de 46 y 12.04 μg EAG/mg de extracto, respectivamente. El extracto acetónico de *C. taylorii* fue el que presentó el valor mas bajo con 11.34 μg EAG/mg de extracto.

Cuadro 7. Actividad antioxidante de la reducción férrica (FRAP).

Especie	Extracto	μg equivalentes de ácido gálico / mg de extracto
<i>C. barbata</i>	Acetónico	12.04
	Metanólico	46.00
<i>C. taylorii</i>	Acetónico	11.34

5. Contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó en los extractos de acetona y metanol de *C. barbata*, y en el extracto acetónico de *C. taylorii*. La curva patrón utilizada fue con ácido gálico. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 8 expresados en μg EAG/mg de extracto. El mayor contenido de fenoles se obtuvo en los extractos acetónicos algales de *C. barbata* con 61.34 μg EAG/mg de extracto y de *C. taylorii* con 40.06 μg EAG/mg de extracto; el menor contenido de fenoles lo presentó el extracto metanólico del alga *C. barbata* con 35.89 μg EAG/mg de extracto.

Cuadro 8. Cuantificación de contenido de fenoles totales.

Especie	Extracto	μg equivalentes de ácido gálico / mg de extracto (%)
<i>C. barbata</i>	Acetónico	61.34 (6.13%)
	Metanólico	35.89 (3.58%)
<i>C. taylorii</i>	Acetónico	40.06 (4.00%)

DISCUSIÓN

1. Determinación taxonómica del material algal

La presencia de las 14 macroalgas (13 especies y un género) determinadas en este estudio ya ha sido reportada en el SAV. Autores como Ortega y colaboradores en 2001 reportan a estas especies en los mismos arrecifes en los que se encontraron en el presente estudio, excepto *C. flaccidum* que fue hallada en el arrecife Giotte y esta ha sido reportada en otros arrecifes como Isla de Enmedio y Santiaguillo.

En este trabajo se reporta la mayor diversidad de especies colectadas en el arrecife Isla de Enmedio (64.29%). Galicia y Morales en 2007 también reportaron una mayor diversidad en Isla de Enmedio, ya que cuenta con 161 especies (56%) de las 284 totales reportadas para el SAV, aunque esto lo atribuyeron al hecho de que es uno de los arrecifes más estudiados en el SAV debido a su cercanía a la costa.

De las 14 especies utilizadas en este trabajo se determinó que el 42.86% pertenecen a la división Rhodophyta, 35.71% a Chlorophyta y 21.43% a Ochrophyta. Respecto a esta tendencia en las divisiones algales, algunos autores como Galicia y Morales en 2007 realizaron un listado de las especies reportadas bibliográficamente para el SAV encontrando un total de 284 especies, las cuales están representadas por Rhodophyta con 55.3%, Chlorophyta con 30.6 % y Ochrophyta 14.1%. En 2003 Pedroche y Senties reportaron para el estado de Veracruz 177 especies (54.96%) para Rhodophyta, 94 especies (29.19%) para Chlorophyta y 51 especies (15.83%) para Ochrophyta. La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) reportó en 2004 para el SAV un total de 22 especies de Rhodophyceas, seguidas de las Chlorophyceas con 70 especies y sólo algunas Cyanophyceas y Phaeophyceas.

Otro estudio en el que se reportó una mayor abundancia en la división Rhodophyta es el realizado por Avila en 2016, en este trabajo se determinaron 22 especies de macroalgas del SAV, de las cuales el 43.3% pertenece a Rhodophyta, 26.6% a Chlorophyta y 13.3% a Ochrophyta.

Por último, Hernández en 2016 reportó resultados similares a los del presente trabajo. Este autor determinó 11 especies de macroalgas colectadas en la zona Norte del SAV reportando a la división Rhodophyta (57%) como la más abundante, seguida de Chlorophyta (36%) y al final a Ochrophyta (7%). Con estos datos y los reportados en este trabajo se puede decir que la tendencia es encontrar mayor diversidad en el grupo Rhodophyta, seguida de Chlorophyta y por último el grupo Ochrophyta. Esto puede ser explicado por lo mencionado por Ortegón y colaboradores en 2010, estos autores mencionaron que el sustrato duro calcáreo y coralino favorece el crecimiento de algas rojas (Rhodophyta) debido a su forma de fijación; además de otros factores como la temperatura (Avila, 2016). De igual forma Lozano en 2009 señaló que el sustrato predominante en algunos arrecifes del SAV es el rocoso-coralino.

2. Rendimiento de los extractos y determinación cualitativa de metabolitos secundarios

Los rendimientos de las especies trabajadas fueron menores al 5%, con tres excepciones, *C. flaccidum* con 10.07% (hexano), 15.62% (metanol) y *C. taylorii* con 10.37% (metanol). Flórez y Martínez en 2010 indican que la diferencia entre los porcentajes de extracto obtenidos se debe al tipo de compuestos presentes en la muestra, ya que estos son arrastrados de acuerdo a su polaridad. También Frikha y colaboradores en 2011 explicaron que los solventes empleados para la extracción son un factor importante para determinar la presencia de ciertos compuestos químicos.

Los MS encontrados en todos los extractos algales fueron saponinas y terpenos. Es muy común encontrar compuestos fenólicos, terpenos, saponinas, entre otros, en las algas independientemente de la especie o estación del año en la que se estudie; ya que son utilizados por estos organismos como sustancias de reserva o como protección química contra epífitos y herbívoros marinos (González-Giro *et al.*, 2015). Resultados similares a los de este trabajo los reportó Notarte en 2012 que encontró saponinas y terpenos en extractos de *Bornetella oligospora*, una especie de alga verde.

Los MS hallados en el presente estudio coinciden con lo mencionado por diversos autores que señalan que en las algas se pueden encontrar compuestos bioactivos como polisacáridos, derivados clorofilicos, esteroides, proteínas, carotenoides, terpenos, entre otros (Bhakuni y Rawat, 2005; Galicia y Morales, 2007; Batista *et al.*, 2009). En 2007 Zubia y colaboradores sugieren que las macroalgas marinas están compuestas por enzimas antioxidantes y moléculas como florotaninos, ácido ascórbico, tocoferoles, aminoácidos tipo micosporina, carotenoides, fosfolípidos, polisacáridos y compuestos relacionados con la clorofila. También Amsler en 2009 menciona que mas de la mitad de los compuestos reportados para las macroalgas son isoprenoides, entre los que se encuentran los terpenos.

Las saponinas tienen dos características principales, reducen la tensión superficial y alteran la permeabilidad de las membranas celulares (Rodríguez, 2010). En la determinación de saponinas, en la prueba de la espuma todos los extractos dieron positivo, sin embargo, en la corroboración con hemólisis solo 28 extractos de los 42 totales dieron positivo en ambos experimentos. Esto se podría deber a que la prueba para formar espuma no es concluyente, ya que existen otros MS como los taninos, que pueden formar espuma; además de que la falta de hemólisis se puede deber a factores como la naturaleza, el número de unidades de azúcares y la secuencia de estos en la saponina, además de la concentración de saponinas en los extractos (Hernández y Hermosilla, 2014).

La ausencia de fenoles, glicósidos y alcaloides (solo presente en dos especies) se puede deber a que estos metabolitos no pudieron ser detectados por la técnica ya que se encuentran en bajas concentraciones, debido a la variación estacional de los compuestos químicos en las algas (Castellanos *et al.*, 2012) o porque simplemente no son sintetizados por estas.

3. Actividad antioxidante

Determinación antioxidante cualitativa.

La mayor parte de los extractos algales que presentaron actividad antioxidante cualitativamente fueron los extraídos con hexano, un solvente no polar. La determinación cualitativa antioxidante de los extractos hexánicos se pudo observar que diez especies, divididas en las tres divisiones de macroalgas, dieron positivo. Respecto a esto, en 2009, Batista y colaboradores refieren que la actividad antioxidante en algas marinas se debe a compuestos poco polares entre los que se encuentran los terpenos, carotenoides y los derivados clorofilicos, especialmente la clorofila a. De igual forma, en este estudio se presentó actividad antioxidante en los extractos hexánicos de las tres divisiones (Rhodophyta, Chlorophyta y Ochrophyta), esto se puede atribuir a lo antes mencionado, ya que las tres divisiones presentan clorofila a.

4. Determinación antioxidante cuantitativa

- **Método de reducción del radical DPPH'**

La mayor actividad antioxidante fue presentada en los extractos metanólico y acetónico de *C. barbata* con una CA_{50} de 637.78 $\mu\text{g/mL}$ y 127.66 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Resultados cercanos a este estudio son los reportados por Avila en 2016 que obtuvo una CA_{50} de 226.97 $\mu\text{g/mL}$ y 106.78 $\mu\text{g/mL}$ en los extractos acetónicos y metanólicos de *C. barbata*, respectivamente, colectada en el SAV atribuyéndole dicha actividad antioxidante principalmente a los ácidos grasos insaturados, que la componen; aunque también reportó bromofenoles, que poseen actividad atrapadora del radical DPPH' los cuales posiblemente confieren a *C. barbata* dicha bioactividad.

Takamatsu y colaboradores en 2003 registraron una fuerte actividad antioxidante en dos compuestos aislados de *C. barbata*; estos autores le atribuyen esta propiedad a los polifenoles bromados encontrados en dicha especie.

Es importante mencionar que muchos autores reportan con una mayor actividad antioxidante a las algas pertenecientes al grupo de las Rhodophytas y Ochrophytas (Zubia *et al.*, 2009; Vidal *et al.*, 2006); sin embargo en este trabajo la mayor actividad antioxidante se presentó en algas verdes. Contrario a esto, Vargas-Betancourt en 2011 menciona que debido a la presencia de altos niveles del complejo clorofila-proteínas algunos géneros de algas verdes también han sido consideradas como un buen recurso de actividad antioxidante. Vidal *et al.*, en 2009 también determinó la actividad de dos Chlorophytas, estos autores reportan una buena actividad en las fracciones hidrofílicas de ácidos fenólicos de las dos especies (*Halimeda opuntia* y *H. monile*) encontrando valores de CA_{50} entre 7.7 y 15.2 μg de fenoles totales.

La actividad antioxidante de algas verdes frente al radical DPPH \cdot también fue evaluada por Hernández en 2016 en la zona Norte del SAV obteniendo el mayor porcentaje de reducción en los extractos metanólicos de *C. racemosa* y *T. cylindrica* con 38.21 y 36.42%, respectivamente, a una concentración de 500 ppm.

El extracto acetónico de *C. barbata* presentó una buena actividad antioxidante frente al radical DPPH \cdot , ya que la FDA (Food and Drug Administration) considera como buen antioxidante a aquellos que muestran actividad en valores menores a las 200 ppm (Gardziella *et al.*, 2000).

- **Método de reducción del radical ABTS $^{2+}$ y del poder de reducción férrica (FRAP).**

En el presente estudio se determinó el poder de reducción del radical ABTS $^{2+}$ solo en algas verdes obteniendo un 50% de reducción de ABTS $^{2+}$ en concentraciones mayores a 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los tres extractos examinadas (acetónico y metanólico de *C. barbata* y acetónico de *C. taylorii*).

Son pocos los trabajos que reportan la reducción del radical ABTS $^{2+}$ con extractos algales y los que están reportados se han enfocado principalmente en algas pardas, sin embargo

se puede destacar la publicación de Balboa y colaboradores en 2013 que hacen una revisión sobre las propiedades antioxidantes *in vitro* de extractos crudos y compuestos de macroalgas pardas. Estos autores reportan que existe actividad antioxidante frente al radical ABTS^{•+} de extractos acuosos y etanólicos de los géneros *Colpomenia*, *Dyctiota*, *Cystoseira*, *Undaria*, *Petalonia* y *Sargassum*.

Otro trabajo es el de Kavitha y colaboradores en 2015 que reportan resultados muy diferentes a los del presente estudio, estos autores obtuvieron un 48% de reducción del radical ABTS^{•+} a una concentración de 500 µg/mL en *Valoniopsis pachynema*, especie perteneciente a las algas verdes; también Kwon y cols. en 2013 reportan la actividad antioxidante de los florotaninos diecol y florofucofuroecol extraídos del alga parda *Eisenia bicyclis*, ellos observaron un 65.36% y 70.38% de reducción de ABTS^{•+} a una concentración de 50 µg/mL, respectivamente. La diferencia con los resultados presentados en este estudio se pudiera deber a que estos autores trabajaron con compuestos puros y no con extractos.

Movahedinia y Heydari en 2014 reportan que no registraron ninguna actividad frente ABTS^{•+} de las especies *Gracilaria corticata* (alga roja) y *Sargassum tenerrimum* (alga roja), atribuyen la falta de actividad a factores como la diferencia entre los solventes utilizados, la polaridad, el tiempo y temperatura de extracción así como la composición química de las muestras.

El mayor poder de reducción férrica se obtuvo en el extracto metanólico del alga verde *C. barbata* con un valor de 46 µg EAG/mg de extracto. Un valor mayor al obtenido es el descrito en la revisión hecha por Balboa y colaboradores en 2013 reportando que obtuvieron un valor de 355.4 µM/mg del alga verde *Caulerpa racemosa*. En algas rojas se encuentra el trabajo de Miranda en 2009 que estudio el poder reductor de *Gracilaria birdiae* y *G. domingensis*, sin embargo este trabajo no presentó actividad reductora, contrario al presente estudio.

Por último tenemos al estudio realizado en la zona Norte del SAV por Hernández en 2016, este autor determinó la actividad antioxidante de dos algas verdes (*C. racemosa* y *T.*

cylindrica) frente al radical ABTS^{•+} y FRAP; sin embargo reporta que no hubo actividad.

La diferencia de la actividad antioxidante entre los tres métodos evaluados puede ser explicado por el potencial redox que presentan cada uno de ellos, además de que dichos radicales solo pueden ser reducidos por compuestos o extractos que tengan un potencial redox menor que ellos. El DPPH[•] es un radical débil comparado con el ABTS^{•+} ya que presentan un potencial redox de 0.25V y 0.68V, respectivamente. En cuanto a FRAP, este presenta un potencial redox de 0.7V. Debido a que el potencial redox del complejo Fe³⁺-TPTZ es comparable con el del ABTS^{•+} se pueden analizar compuestos similares con ambos métodos aunque las condiciones de la reacción sean distintas (Vianna *et al.*, 2012; García, 2016; Hernández, 2016). Es por eso que posiblemente tuvieron una buena actividad antioxidante frente al radical DPPH[•] y no frente a ABTS^{•+} y FRAP.

5. Contenido de fenoles totales

Los extractos acetónico y metanólico de *C. barbata* y el acetónico de *C. taylorii* fueron en los que se cuantificó los fenoles mostrando valores de entre 3-6%. Resultados similares a los reportados en este estudio son los indicados por Zubia y colaboradores en 2007, que reportan el contenido de 17 especies de algas verdes con valores de 0.47 a 8.13 %. También Vidal y colaboradores en 2009 cuantificaron los compuestos fenólicos en dos algas verdes (*H. opuntia* y *H. Monile*) y reportan valores de entre 6.67 y 7.42% coincidiendo con los valores de este estudio en especies de algas verdes.

Diversos autores mencionan que existe una relación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante lo que pudiera explicar los resultados obtenidos en *C. barbata* en este estudio ya que a mayor cantidad de fenoles se presentó una mayor actividad antioxidante del extracto.

La diferencia entre los resultados presentados en este estudio y los de otros autores se podría deber a que la producción de compuestos antioxidantes, como los fenoles, es afectada por factores como la herbivoría, profundidad, salinidad, nutrientes, radiación, o el tipo, edad y etapa reproductiva del organismo estudiado (Zubia *et al.*, 2007).

La poca actividad antioxidante que mostraron las macroalgas de este trabajo se podría deber a que no han tenido la necesidad de producir MS para defenderse de factores que las estresen como patógenos, epibiontes, herbívoros (Amsler, 2009) o el almacenamiento de metales pesados debido a las actividades humanas que se desarrollan en el SAV y las zonas que lo rodean, ya que según lo reportado por Horta-Puga *et al.* en 2016 no se debe considerar actualmente a la zona Sur del SAV como un área contaminada.

CONCLUSIONES

- 14 macroalgas fueron colectadas en la zona sur del SAV de las cuales el 43% pertenece a la división Rhodophyta, 36% a Chlorophyta y 21% a Ochrophyta. El mayor número de especies de algas colectadas pertenecen al arrecife Isla de Enmedio con un 64%.
- Los tres extractos de *C. flaccidum* presentaron el mayor rendimiento con 10.07% (hexánico), 4.20% (acetónico) y 15.62% (metanólico).
- Los metabolitos secundarios presentes en los 42 extractos algales fueron terpenos y saponinas.
- De los 42 extractos algales sólo el metanólico y acetónico de *C. barbata*, y el acetónico de *C. taylorii* tuvieron actividad antioxidante.
- Las algas *C. barbata* y *C. taylorii* fueron las únicas especies en presentar actividad antioxidante frente al radical DPPH[•].
- Los extractos acetónico y metanólico de *C. barbata* presentaron una CA₅₀ de 127.69 µg/mL y 637.78 µg/mL, respectivamente, frente al radical DPPH[•].
- El extracto acetónico de *C. barbata* presentó una CA₅₀ de 821.86 µg/mL frente al radical ABTS^{•+}.
- El extracto metanólico de *C. barbata* presentó un poder reductor férrico de 46 µg EAG/mg de extracto.
- El extracto acetónico de *C. barbata* presentó 61.34 µg EAG/mg de extracto de fenoles totales.
- En la especie *C. barbata* a mayor cantidad de fenoles presentó una mayor actividad antioxidante.

LITERATURA CITADA

- Amsler, C. D. 2009. Algal chemical ecology. Editorial Springer. Alemania.
- Avila R. M. 2016. *Efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del sistema Arrecifal Veracruzano*. Tesis de Maestría. FES Iztacala. UNAM. 91 p.
- Aviles, J.M. 1990. *Contribución al estudio del género Caulerpa Lamoux en México*. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México. 121p.
- Balboa, M. E., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. y Domínguez, H. 2013. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from Brown algae. *Food chemistry*. 138: 1764-1785.
- Batista G. A. E., Charles M. B., Mancini-Filho J. y Vidal N. A. 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14 (2):1-18 .
- Bhakuni D. S. y Rawat D. S. 2005. Bioactive marine natural products. Editorial Springer. India.
- Brandão J. A. 1967. Géneros de algas marinas da Costa Atlántica. Latino-Americana. Universidad de São Paulo. Brasil. 353 y 354 pp.
- Benzie I. F. y Strain J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochemistry*. 239(1): 70-76.
- Castellanos G. M. E., Moreira G. A. R. y León P. A. R. 2012. Caracterización fitoquímica de las macroalgas marinas *Gracilaria caudata*, *Ulva lactuca* y *Ulva flexuosa* de la bahía de Cienfuegos, Cuba. *Boletín de la sociedad Española de Ficología*. Junio-Diciembre: 4-8.
- Dawes C. J. y Mathieson A. C. 2008. The seaweeds of Florida. University Press of Florida. USA. 591p.
- De la Calle, F. 2007. Fármacos de origen marino. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*. 58: 141-155.
- De la Rosa G. S. y Gamboa A. M. M. 2004. Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. *Ciencia Ergo Sum*. 11(2): 186-190.

- De Lara-Isassi G. 1991. Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas. *Hidrobiológica*. 1(2): 21-28.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. 281.
- Echavarría Z. B, Franco S. A. y Martínez M. A. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae*. 16 (1): 126-131.
- Flórez L. Y. y Martínez M. E. 2010. *Obtención de extractos bioactivos presentes en semillas de Annona muricata de la región cafetera*. Tesis de grado. Facultad de tecnológica química. Universidad tecnológica de Pereira. 87 p.
- Frikha F., Kammoun M., Hammami N., Mchirgui R. A., Belbahri L., Gargouri Y., Miled N. y Ben-Rebah F. 2011. Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez. *Ciencias Marinas*. 37 (2):113-124.
- Galicia G. C. y Morales G. A. 2007. Investigaciones sobre macroalgas realizadas en el sistema arrecifal veracruzano, p. 141-160. *In: Granados B. A., L. G. Abarca A. y J. M. Vargas H. (Eds.) Investigaciones Científicas en el Sistema Arrecifal Veracruzano*. Universidad Autónoma de Campeche. ISBN 968-5722-53-6. 304 p.
- García S. P. 2016. *Técnicas analíticas avanzadas para la determinación de compuestos bioactivos en muestras vegetales*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Granada. 467 p.
- García-Bores A. M. 2010. *Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de Yucca periculosa Baker*. Tesis de Doctorado. FES Iztacala. UNAM. México. 195 p.
- Gardziella, A., Pilato, L. A. y Knop. 2000. Phenolic resins. 2da. edición. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 560 p.
- González-Giro Z., Fuentes R. M., Batista C. P., Campos C. A. y Vera P. Y. 2015. Análisis fitoquímico preliminar de dos extractos del alga *Padina gymnospora*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. XVII (2): 26-29.
- Hernández G. A. C. y Hermosilla C. V. J. 2014. *Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal*

en Guatemala. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 73 p.

- Hernández R. Z. G. 2016. *Actividad antioxidante de diferentes macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano, zona Norte*. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México. 55 p.
- Horta-Puga G., Cházaro-Olvera S., Winfield I., Lozano-Aburto M.A. y Arenas-Fuentes V. 2016. Metales pesados en macroalgas del Sistema Arrecifal Veracruzano, sur del Golfo de México. *Revista Bio Ciencias*. 3 (4): 326-339.
- Kavitha K., Mahalakshmi K. y Vishnu K. M. 2015. Free radical scavenging activity of methanolic extract of green alga *Valoniopsis pachynema*. *World Journal Pharmaceutical Sciences*. 3 (10): 2074-2076.
- Kwon T. H., Kim T. W., Kim C. G. y Park N. H. 2013. Antioxidant activity of various solvent fractions from edible brown alga, *Eisenia bicyclis* and its active compounds. *Journal of Food Science*. 78 (5): 679-684.
- Littler, D.S. y Littler, M.M. 2000. Caribbean Reef Plants. Offshare Graphics. Inc. USA. 594p.
- Lozano A. M. A. 2009. *Taxocenosis de Octocorales del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano*. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías. Universidad Veracruzana. 91 p.
- Marcano D. y Hasegawa M. 2002. Fitoquímica orgánica. 2ª edición, Editorial Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Venezuela. Págs. 367-369.
- Miranda da S. P. 2009. *Atividades viológicas de extratos de algas marinhas brasileiras*. Tesis de Maestría. Instituto de Química. Universidad de Sao Paulo. Sao Paulo. 76 p.
- Movahedinia A. y Heydari M. 2014. Antioxidant activity and total phenolic content in two alga species from the Persian Gulf in Bushehr Province, Iran. *International Journal Science and Research*. 3 (5): 954-958.
- Muñoz O. M. 2010. *Potencial farmacológico de algas marinas de Baja California Sur, México*. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. 93 p.

- Murillo F. E. 2006. Actividad antioxidante <<in vitro>> de las bebidas de frutas. Alfa editores técnicos. pp. 20-27.
- Notarte K. I. R. 2012. *Phytochemical screening and bioactivity analyses of green alga, Bornetella oligospora Solms Laubach, metabolite fractions using sea urchin embryonic development and DPPH free radical scavenging assay*. Tesis de Licenciatura. Biology Department. Silliman University. 59 p.
- Ortega M. M., Godínez J.L. y Garduño S. G. 2001. Catálogo de algas bentónicas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe. Cuadernos del Instituto de Biología Núm. 34. UNAM. México. 594 p.
- Ortegón A. I., Freile P. Y. y Robledo R. D. 2010. Diversidad vegetal. Algas. En Durán G. R. y M. E. Méndez G. (ed.). *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán* (pp. 162-164). CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. Mérida, Yucatán. 496 pp.
- Ortiz-Lozano L., Granados-Barba A. y Espejel I. 2009. Ecosystemic zonation as a management tool for marine protected areas in the coastal zone: Applications for the Sistema Arrecifal Veracruzano National Park, Mexico. *Ocean & Coastal Management*. 52: 317-323.
- Palomino G. L. R., García P. C. M., Gil G. J. H., Rojano B. A. y Durango R. D. L. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 16(3): 388-395.
- Parra-Toriz D., Ramírez-Rodríguez M. L. A. y Hernández-Becerril D. U. 2011. Dinoflagelados (Dinophyta) de los órdenes Prorocentrales y Dinophysiales del sistema Arrecifal Veracruzano, México. *Revista de Biología Tropical*. 59(1): 501-514.
- Pedroche F. F. y Senties G. A. 2003. Ficología marina Mexicana. Diversidad y problemática actual. *Hidrobiológica*. 13 (1): 23-32.
- Pérez O. J. L. y Quitián M. L. A. 2009. *Evaluación de métodos de extracción de saponinas de los residuos del Beneficio del Fique*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Universidad Industrial de Santander. 46 p.

- Pérez-Pérez E. M., Rodríguez-Malaver A. J., Padilla N., Lapanna E. y Medina-Ramírez G. 2009. Estudio de la capacidad antioxidante de extractos crudos de varias especies de algas venezolanas. *Rev Fac Farm.* 51(2): 3-10.
- Pomilio A. B. 2012. Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* 46(1): 73-82.
- Quesada H. A. 2008. Las plantas medicinales. *Revista Biocenosis.* 21(1-2): 20-23.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine.* 26: 1231-1237.
- Rodríguez C. E., Gamboa C. M. del M., Hernández C. F. y García H. J. D. 2005. Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. Págs. 121-122.
- Rodríguez G. C. F. 2013. *Contribución de especies planctónicas formadoras de florecimientos algales nocivos a la biomasa del Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano.* Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Marinas y Pesquerías. Universidad Veracruzana. 66 p.
- Rodríguez G. J. 2003. Mirando a nuestro entorno. Productos naturales de origen marino, una perspectiva en el descubrimiento de nuevos fármacos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química.* 5-12.
- Rodríguez G. R. G. 2010. *Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de Fouquieria splendens (Engelmann), Ariocarpus retusus (Scheidweiler) y Ariocarpus kotschoubeyanus (Lemaire).* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. 108 p.
- Senties, G. A. y Dreckmann, M.K. 2002. Monografías Ficológicas. UAM-Iztapalapa. México. 192p.
- Serrano P. R. 2013. *Efecto cicatrizante de Bursera morelensis Ramirez (Buerseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.* Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 138 p.
- Singleton V. y Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture.* 144-153.

- Takamatsu S., Hodges T. W., Rajbhandari I., Gerwick W. H., Hamann M. T. y Nagle D. G. 2003. Marine natural products as novel antioxidante prototypes. *J. Nat. Prod.* 66: 605-608.
- The Ramsar Convention on Wetlands, CONANP. 2003. Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar “Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruz”.
- Tunnell, J. W. 1988. Regional comparison of southwestern Gulf of Mexico to Caribbean Sea coral reefs. *Proc. 6th. Int. Coral Reef Symp.* 3: 303-308.
- Vargas-Betancourt F., Hernández-Guerrero C. J. y González-Acosta B. 2011. *Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en extractos de macroalgas de La Bahía de la Paz, Baja California Sur, México.* XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, México.
- Vianna D. R., Bubols G., Meirelles G., Silva B. V., da Rocha A., Lanznaster M., Monserrat J. M., García S. G., von Poser G. y Eifer-Lima V. L. 2012. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 7260-7270.
- Vidal A., Fallarero A., Silva E., Oliveira A., Lima A. y Pavan R. 2006. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelin) Howe. *Rev Bras Cienc Farm.* 42(4): 589-598.
- Vidal A., Silvia de Andrade-Wartha E. R., de Oliveira e Silva A. M., Pavan R., Lima A., Fallarero A., Batista A. E. y Mancini-Filho J. 2009. Actividad antioxidante y polifenoles totales de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. *Rev ARS Pharm.* 50 (1): 24-31.
- Vidal N. A., Motidome M., Mancini-Filho J., Fallarero L. A., Midori T. M., Brandao T. L. M. y Lapa A. J. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe. *Rev Bras Cienc Farm.* 37 (3):373-380.
- Zubia M., Robledo D. y Freile-Pelegri Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol.* 19:449–458.

APÉNDICES

Apéndice 1.

Determinación cualitativa de saponinas.

- **Prueba de la espuma (Marcano y Hasegawa, 2002; Pérez y Quitián, 2009).**

Debido a su estructura las saponinas son surfactantes, es por eso que generan espumas resistentes al agitarlas en un medio acuoso.

Para determinar la presencia de saponinas, se agregan 5 mL del extracto en tubos de ensayo. El tubo debe de ser agitado manualmente durante 30 segundos, para resultados positivos se debe de observar espuma por al menos un minuto.

- **Prueba de hemólisis en agar sangre (Marcano y Hasegawa, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005; Rodríguez, 2010).**

Una de las características más conocidas de las saponinas es que poseen la capacidad de descomponer los glóbulos rojos (hemólisis).

Para este ensayo se impregnaron 2 mg de cada extracto en sensidiscos de 5 mm, se colocaron tres repeticiones de cada extracto en cajas Petri con agar sangre como medio de cultivo. La caja se dejó en incubación a 37° C por 24 horas. En presencia de saponinas la prueba da como resultado un halo de hemólisis en el medio. Se reporta como Alfa hemólisis (α) cuando se presenta una coloración verdosa o café en el medio, Beta hemólisis (β) cuando la apariencia es clara e incolora y como Gama hemólisis (γ) cuando no hay hemólisis.

Apéndice 2.

Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracilo (DPPH[•]) (Método modificado de Murillo, 2006).

La molécula 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) se caracteriza por ser un radical libre en virtud del desapareamiento de un par de electrones en la molécula. Este desapareamiento de electrones le confiere a la solución un color violeta, caracterizado por tener una absorción a 493 nm. Cuando la solución de DPPH[•] es mezclada con un sustrato capaz de donar átomos de hidrógeno, esta sustancia se reduce, perdiendo el color violeta.

Procedimiento:

A partir de una solución stock de 10 mg de extracto disuelto en 5 mL de metanol, se preparan diluciones a concentraciones de 31.2, 62.5, 125, 250 y 500 ppm. Cada concentración se multiplica por 4 y el resultado es la cantidad que se toma de la solución stock para llevar a 1 mL con MeOH. Como control positivo se utiliza ácido gálico (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 ppm) y como control negativo 200 µL de MeOH. La actividad antioxidante se medirá por espectrofotometría UV-VIS en lector de ELISA a 493 nm.

En una placa de 96 pozos se adicionan 50 µL de solución problema a las diferentes concentraciones, se añaden 150 µL de solución metanolica de DPPH[•] a una concentración de 10 µM, cuya concentración final es de 100 µM y se mantienen en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se lee a 493 nm. El porcentaje de reducción del radical DPPH[•] se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de reducción del radical DPPH} = \frac{C - E}{C} \times 100$$

donde:

C= media aritmética de la absorbancia del control.

E= media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Se reporta la CA_{50} (muestra que disminuye el 50% del radical DPPH') del compuesto antioxidante frente al radical DPPH'. La disminución de la coloración es expresada como el porcentaje de reducción de DPPH', la cual es comparada con una curva estándar del antioxidante de referencia, ácido gálico (2-35 ppm).

Apéndice 3.

Método de reducción del radical 2.2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS^{•+}) (Método modificado de Re et al., 1999).

Este método evalúa la decoloración del radical catiónico ABTS^{•+}, la cual se debe a su reducción al interactuar con moléculas donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo color verde-azulado, absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS^{•+} con persulfato de potasio.

Procedimiento:

El radical ABTS^{•+} es una mezcla de reacción que contiene solución de ABTS^{•+} (7 mM/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 diluye 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 prepararon concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm de la muestra de extracto, se toman 300 μ L de la muestra y se hacen reaccionar con 2700 μ L de la solución ABTS^{•+} para un volumen final de 3 mL. La mezcla resultante se agita y se mantiene en la oscuridad por 7 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lee la absorbancia a 734 nm (se mide el cambio de absorbancia a 734 nm de la solución ABTS^{•+} cuando alcanza el estado estacionario). El ácido gálico se usa como estándar de referencia. El porcentaje de reducción del radical ABTS^{•+} se calcula con la fórmula:

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

donde:

A_c= media aritmética de la absorbancia del control.

A_m= media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Se reporta la CA_{50} (muestra que disminuye el 50% del radical $ABTS^{\bullet+}$) del compuesto antioxidante frente al radical $ABTS^{\bullet+}$. La disminución de la coloración es expresada como el porcentaje de reducción de $ABTS^{\bullet+}$, la cual es comparada con una curva estándar del antioxidante de referencia.

Apéndice 4.

Método del poder antioxidante de la reducción férrica (FRAP) (Método modificado de Benzie y Strain, 1996).

El método FRAP determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de donar un electrón al Fe^{3+} (oxidado) para pasar a Fe^{2+} (reducido). El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. Este método mide la absorbancia del Fe^{2+} , de tal manera que cuánto más antioxidante es la sustancia mayor es la reducción y mayor es la concentración de Fe^{2+} y es más alta la absorbancia.

Procedimiento:

Se preparan las siguientes soluciones:

- 300 mM de amortiguador de acetato pH 3.6 (acetato de sodio trihidratado/ácido acético glacial).
- 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) en 40 mM de HCl.
- 20 mM FeCl_3 .

Las soluciones anteriores se mezclan en una relación 10:1:1 (v/v/v) para obtener la mezcla de reactivos FRAP, la cual debe mantenerse durante todo el proceso en un baño a 37° C. Se preparan concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm del extracto, se toman 284 μL de la muestra y se mezclan con 2714 μL del reactivo FRAP para un volumen final de 3 mL. Se incuba en la oscuridad por 10 minutos a temperatura ambiente y se lee a una absorbancia de 593 nm. La absorbancia final de las muestras se compara con una curva estándar de ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 ppm). Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto.

Apéndice 5.

Método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

El método de Folin-Ciocalteu se utiliza para determinar los fenoles totales en una muestra orgánica. El reactivo de Folin-Ciocalteu tiene una coloración amarilla que, en presencia de un fenol, se torna azul. La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente a 725 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico que es utilizado como estándar de referencia.

Se prepara una curva de calibración a partir de un stock de 10 mg de ácido gálico, 700 μL de agua destilada y 300 μL de MeOH. Se toman las alícuotas para obtener diferentes concentraciones (5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 ppm) para llegar a un volumen final de 1 mL.

Para determinar los fenoles en la muestra, se prepara un stock de 5 y 10 mg de la muestra en 1 mL de agua destilada y 1 mL de MeOH. Se toman alícuotas de 100 μL de cada muestra en tubos de ensayo y se agregan 900 μL de agua destilada para un volumen final de 1 mL. Posteriormente se transfiere cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) a tubos y se adicionan 500 μL del reactivo Folin-Ciocalteu a cada tubo. Después de cinco minutos de incubación, se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L). y agua, para un volumen final de 3 mL. Se incuban los tubos durante dos horas a temperatura ambiente. Cada concentración se hace por triplicado.

Después de la incubación, se determina la absorbancia a 725 nm y se grafica la concentración contra la absorbancia. Para la curva patrón de ácido gálico, se realiza una regresión lineal y se interpola la absorbancia de los extractos. Los resultados se expresan como microgramos equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto.