

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



# POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE ALGAS MARINAS DE BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA:

MAURICIO MUÑOZ OCHOA

LA PAZ, B. C. S., MÉXICO. DICIEMBRE DE 2010



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de Noviembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**“POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE ALGAS MARINAS DE  
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO”**

Presentada por el alumno:

**MUÑOZ**

Apellido paterno

**OCHOA**

materno

**MAURICIO**

nombre(s)

Con registro:

A	0	7	0	3	6	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

DR. EVGUENI CHOUMILINE NIKOLAYEVICH

DRA. SILVIE DUMAS

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 30 del mes Noviembre del año 2010  
el (la) que suscribe MC. MAURICIO MUÑOZ OCHOA alumno(a) del  
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS  
con número de registro A070368 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE ALGAS MARINAS DE  
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mmunozo@ipn.mx - jmurilloa@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

*nombre y firma*

*Para Pimpi:*

*gracias por tu incondicional apoyo, tu estímulo constante y comprensión, por darme un abrazo y un reconfortante beso en los momentos de desesperación, por estar presente cuando he caído en batallas perdidas, motivándome a levantarme e impulsarme a ganar la guerra.*

*Simplemente, Te Amo.*

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.*

*Mahatma Gandhi*

*La fortuna juega en favor de una mente preparada.*

*Louis Pasteur*

*La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.*

*Ruy Pérez Tamayo*

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez por su labor, paciencia, por su apoyo y sobre todo por su amistad, que fue fundamental para el desarrollo de este trabajo de tesis. Agradezco al comité revisor, Dra. Silvie Dumas, Dra. Christine Johanna Band Schmidt, Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, Dr. Gustavo Hernández Carmona y Dr. Evgueni Choumiline por el extraordinario trabajo de revisión y edición de este manuscrito. Agradezco al Grupo del Laboratorio de Química de Algas Marinas (CICIMAR-IPN), especialmente a la M. en C. Elizabeth Rodríguez Montesinos, a la M. en C. Dora Luz Arvizu Higuera y al Dr. Gustavo Hernández Carmona por el apoyo prestado en todo momento. Al Dr. Rafael Riosmena Rodríguez (UABCS), a la Dra. Luz Elena Mateo Cid (ENCB-IPN) y a la Biol. Catalina Mendoza González (ENCB-IPN) por la identificación taxonómica del material algal estudiado. Al Dr. Sergio Martínez Días (CICIMAR-IPN) por su apoyo en la parte microbiológica.

Nuestro agradecimiento también va dirigido a la Dra. Gloria María Molina Salinas (CIBIN-IMSS) y al Dr. Javier Vargas Villareal (CIBIN-IMSS) por la realización de los ensayos de actividad anti-mycobacterium y citotóxicos; a la Dra. Claire Helio (Universidad de Portsmouth, Inglaterra) por los ensayos de actividad anti-bioincrustrante; a la Dra. Mercedes Cueto Prieto (IPNA, España) por la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Agradezco al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional y a su plantilla de profesores. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención (No. 207014). Los agradecimientos son extensivos a las instituciones que financiaron esta investigación a través de los proyectos: “Búsqueda de Nuevos Quimiotipos Antibacterianos en Algas Colectadas en las Costas de Baja California Sur (SEP-2004-47942/A-1)”, “Estudio de dos algas pardas, *Eisenia arborea* y *Colpomenia* sp., como fuente de polisacáridos sulfatados con actividad anticoagulante (IPN-CGPI 20050324)”, “Establecimiento de las condiciones para la inducción de callos a partir de tejidos del alga marina *Gracilaria vermiculophylla* (SIP 20080216)”, “Actividad antibacteriana y antioxidante del alga café *Padina crispata* (SIP20090558)”,

“Estudio de la actividad antioxidante y antibacteriana del alga café *Padina crispata* (SIP20101182)”.

Un agradecimiento especial a los estudiantes de servicio social y residencias profesionales: Lina Angélica Zermeño Cervantes, Elena Stephanie Castro Silva, Maribel de León Torres y Lizeth Mariel Casarrubias Torres por su valiosa ayuda en el desarrollo de algunos experimentos.

A mí familia por supuesto: Gaby, Angelito, Benja (mi manito), Luly (mi cuñis), Gabriel y Liduvina (suegritos). A mis amigos: Iván, José Carlos (Macuaco), Filiberto y Paty.

A todos muchas gracias por su apoyo y estima.

## CONTENIDO

	Página
Glosario	iii
Abreviaturas	iv
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
Resumen	viii
Abstract	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Papel de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos	1
1.2. Condiciones geográficas y climáticas de la península de Baja California	5
1.3. El recurso algal de la Península de Baja California	5
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
2.1. Estudios de actividad biológica realizados en algas colectadas en el Pacífico peninsular y Golfo de California	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
4.1. Objetivo general	12
4.2. Objetivos particulares	12
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
5.1. Colecta del material algal e identificación taxonómica	13
5.2. Pruebas de actividad biológica	13
5.3. Selección de microorganismos de prueba	15
5.4. Ensayo de actividad antibacteriana y reversión de la resistencia	16
5.5. Evaluación de la actividad antimycobacteriana y citotóxica	17
5.6. Evaluación de la actividad anti-incrustante por el método de micro-dilución	17
5.7. Evaluación de la actividad secuestrante de radicales utilizando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picril-hidracilo	18
5.8. Selección de <i>Padina mexicana</i> y <i>Sargassum horridum</i>	18
5.9. Fraccionamiento y obtención de compuestos a partir de <i>P. mexicana</i> y <i>S. horridum</i>	19
5.10. Aislamiento de manitol, glicerol y el galactodiacilglicerol a partir de <i>P. mexicana</i>	21
5.11. Purificación del ácido mirístico, fucosterol y CC13F9Cr1 a partir de <i>S. horridum</i>	23
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
6.1. Reversión de la resistencia bacteriana a los antibióticos	26
6.2. Estudio de selección de actividad antibacteriana y citotóxica	29
6.3. Estudio selección de actividad anti-bioincrustante	32
6.3.1. Sobre el ensayo de la actividad antibacteriana contra bacterias terrestres	32
6.3.2. Sobre el ensayo de la actividad antibacteriana contra bacterias marinas	33

6.3.3. Sobre el ensayo de actividad anti-microalgal	33
6.4. <i>Padina mexicana</i> como fuente de compuestos con actividad antibacteriana y secuestrante de radicales libres	45
6.4.1. Actividad antimicrobiana	45
6.4.2. Actividad secuestrante de radicales libres	48
6.4.3. Determinación estructural de los compuestos aislados a partir de <i>P. mexicana</i>	52
6.4.3.1. Elucidación estructural del compuesto 1	52
6.4.3.2. Elucidación estructural del compuesto 2	53
6.4.3.3. Elucidación estructural del compuesto 3	53
6.5. <i>Sargassum horridum</i> como fuente de compuestos con actividad anti-tuberculosis	55
6.5.1. Actividad antimycobacteriana	55
6.5.2. Determinación estructural de los compuestos aislados de <i>S. horridum</i>	56
6.5.2.1. Elucidación estructural del compuesto 4	56
6.5.2.2. Elucidación estructural del compuesto 5	57
6.5.2.2. Elucidación estructural del compuesto 6	58
<b>7. CONCLUSIONES</b>	60
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	61

#### **Artículo publicado y manuscritos en preparación derivados de esta tesis**

Muñoz-Ochoa, M., J. I. Murillo-Álvarez, L. A. Zermeño-Cervantes, S. F. Martínez-Díaz & R. Rodríguez-Riosmena. 2010. Screening of extracts of algae from Baja California Sur, Mexico as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 14 (9): 739-747.

Muñoz-Ochoa, M., J. I. Murillo-Álvarez, G. M. Molina & V. J. Vargas. (En preparación) Antibacterial and Cytotoxic Screening of Algal Extracts from Baja California, Mexico.

Muñoz-Ochoa, M., J. I. Murillo-Álvarez, G. Quesseveur & C. Hellio (En preparación) Marine algae from Baja California Sur, Mexico as potential sources of antifouling compounds.

Muñoz-Ochoa, M., E. S. Castro-Stephanie, P. M. Cueto & J. I. Murillo-Álvarez. (En preparación). Antibacterial and antioxidant activity of brown seaweed *Padina mexicana* (Thivy).

Muñoz-Ochoa, M., G. M. Molina-Salinas, P. M. Cueto & J. I. Murillo-Álvarez. (En preparación) *Sargassum horridum* as sources of compounds with antitubercular activity

## **Glosario**

Antibacteriano	Compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias.
Biogeografía	La biogeografía es la disciplina que estudia la distribución de los seres vivos, tanto en el tiempo como en el espacio.
Biosíntesis	Conjunto de procesos bioquímicos de las células para construir, a partir de los nutrientes del medio, las sustancias de las cuales están constituidos los organismos.
Citotóxico	Que es tóxico para las células.
Esterol	Son compuestos químicamente relacionados con el colesterol, todos los esteroides poseen un núcleo básico de 4 anillos; el ciclopentanoperhidrofenantreno.
Extracto	Producto obtenido a partir de un organismo o parte de él, el cual es extraído con un disolvente, ya sea orgánico o a base de agua.
Fármaco	Sustancia química purificada que se utiliza para el tratamiento, la cura, la prevención o el diagnóstico de alguna enfermedad o también para inhibir la aparición de un proceso fisiológico no deseado.
Ficología	La ficología es la disciplina de la biología que estudia las algas.
Lípido	Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Tiene como característica principal el ser insolubles en agua y soluble en disolventes de baja polaridad como hexano, diclorometano.
Metabolito	Compuesto químico producido por un organismo
Metabolito secundario	Compuesto químico producido por un organismo sin función aparentemente involucrada en procesos primarios como la reproducción y el crecimiento, sin embargo puede darle una ventaja competitiva al organismo que lo produce.
Producto natural	Sea cualquier producto o sustancia producida u obtenida a partir de un organismo o parte de él, normalmente de naturaleza orgánica.
Sinérgico	Acción o efecto combinado de 2 o más compuestos.

## Abreviaturas

$\mu\text{L}$	microlitros
$^1\text{H}$ -RMN	resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$
$^{13}\text{C}$ -RMN	resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$
ATCC	American Type Culture Collection
CC	columna cromatográfica
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	diclorometano o cloruro de metileno
CMI	concentración mínima inhibitoria
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
$\text{EC}_{50}$	concentración efectiva media
ESL	extracción sólido-líquido
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
Hex	hexano
HPLC	siglas en inglés de cromatografía líquida de alta resolución
$\text{IC}_{50}$	concentración inhibitoria media
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
mg	miligramos
mL	mililitros
TB	tuberculosis
TLC	siglas en inglés de cromatografía de placa fina
VERO	células epiteliales de riñón de mono verde

## Lista de Tablas

**Tabla 1.** Interpretación de los resultados de actividad antibacteriana con respecto al halo de inhibición.

**Tabla 2.** Extractos con actividad antimycobacteriana y citotóxica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tabla 3.** Concentración mínima inhibitoria expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extractos algales contra bacterias marinas y terrestres implicadas en procesos de bioincrustación.

**Tabla 4.** Efecto de extractos algales sobre microalgas implicadas en procesos de bioincrustaciones. Se reporta la mínima concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a la cual los extractos mostraron un efecto inhibitorio (-) o inductor (+).

**Tabla 5.** Actividad antibacteriana y efecto sinérgico de agentes comerciales y las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *Padina mexicana*. Se reporta el promedio del diámetro del halo de inhibición en milímetros (n=2).

**Tabla 6.** Efecto sinérgico de antibióticos comerciales y las fracciones obtenidas de ESL1F3AM. Se reporta el promedio del diámetro del halo de inhibición en milímetros (n=2). El ensayo fue realizado de acuerdo al método de difusión en agar.

**Tabla 7.** Actividad antioxidante del extracto etanólico crudo y fracciones de *Padina mexicana*. Se reportan la EAAA y  $\text{EC}_{50}$  calculados por método gráfico de correlación lineal.

**Tabla 8.** Actividad antioxidante de las fracciones activas de ESL1F2. Se reportan la EAAA y  $\text{EC}_{50}$  calculados por método gráfico de correlación lineal.

**Tabla 9.** Comparación de los desplazamientos químicos de a) fucosterol\*, b) CC27F3 c) isofucosterol\*.  $\delta$  en ppm.

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Estructura de los nucleosidos antivirales: a) espongouridina, b) espongotimidina, c) ara C y d) ara A.

**Figura 2.** Estructura de algunos productos naturales que se encuentran en ensayos clínicos como agentes antitumorales o comercialmente disponibles: a) ecteinascidina 743, b) bryostatina 1, c) halicondrin B y d) dolastatina 10.

**Figura 3.** Estructura química de algunos compuestos aislados durante la “Alpha Helix Baja Expedition”: a) laurinterol aislado a partir de *Laurencia decidua* y b) cetonas bromadas aisladas de *Bonnemaisonia hamifera* y *Asparagopsis taxiformis*.

**Figura 4.** Estructura química de compuestos aislados a partir de *Dictyota undulada* y *D. flabellata*: a) zonarol, b) yahazunol, c) ácido zonaorico y d) epóxido de pachydictyol A.

**Figura 5.** Estructura química de derivados del chamigreno aislados a partir de *Laurencia pacifica*.

**Figura 6.** Zonas de colecta del material algal: 1) Ensenada; 2) Punta Eugenia; 3) Isla Natividad; 4) Bahía Tortugas; 5) Laguna San Ignacio; 6) Bahía Magdalena; 7) Playa Cerritos y 8) Bahía de la Paz.

**Figura 7.** Fraccionamiento general del extracto de *Padina mexicana* y aislamiento de manitol, glicerol y el galactolípido.

**Figura 8.** Purificación de manitol por cristalización a partir de la fracción ESL1F3Cr: AM = aguas madres, U-AM = unión de aguas madres, CR = cristales.

**Figura 9.** Diagrama de fraccionamiento de ESL1F2 y aislamiento del compuesto 3 (DDF1) a partir de *P. mexicana*.

**Figura 10.** Fraccionamiento general del extracto de *Sargassum horridum* y aislamiento del ácido misrítico y fucosterol

**Figura 11.** Actividad secuestrante por el método bioautográfico de las fracciones del extracto crudo de *P. mexicana*. Placa cromatográfica de fase normal desarrollada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (95:5), rociada con una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) al 0.2%.

**Figura 12.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 1 y estructura del manitol.

**Figura 13.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 2 obtenido de *P. mexicana* y estructura del glicerol.

**Figura 14.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 3 y estructura del (2S)-1-oleoil-2-palmitoil-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosilglicerol.

**Figura 15.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 4 obtenido de *Sargassum horridum* y estructura del ácido mirístico.

**Figura 16.** Estructura y espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del fucosterol obtenido de *Sargassum horridum*.

## Resumen

En este trabajo se estudiaron los extractos etanólicos de 62 especies de algas recolectadas a lo largo de la península de Baja California Sur, México, por su potencial como fuente de compuestos bioactivos. La actividad antibacteriana, antioxidante, citotóxica, anti-bioincrustante e inhibitoria de los mecanismo de resistencia bacteriana a los antibióticos fueron las actividades evaluadas en este trabajo de tesis. La primera parte de la tesis se centra en la identificación de las algas más prometedoras como fuente de compuestos con activos contra bacterias patógenas resistentes a antibióticos [*Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42), *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) y *Escherichia coli* (ATCC BAA-196)] con mecanismos de resistencia conocido, así mismo, contra *Mycobacterium tuberculosis*, los extractos activos contra el *M. tuberculosis* se analizaron por su actividad citotóxica contra la línea celular VERO. También, la primera parte comprende un estudio de selección de los extractos activos frente a microorganismos causantes de la bioincrustación en superficies sumergidas en agua (3 microorganismos terrestres, tres marinos y 3 microalgas). Los resultados más relevantes en cuanto al efecto de los extractos como inhibidores de los mecanismo de resistencia bacteriana, de los 62 extractos etanólicos probados, 12 (20%) de ellos en combinación con la ampicilina fueron capaces de revertir la resistencia de *S. aureus* y 8 (13%) con eritromicina la de *S. pyogenes*. El extracto de *Sargassum horridum* (04-003) fue el único que revirtió la resistencia de *S. aureus* y *S. pyogenes* a la ampicilina y eritromicina, respectivamente. Adicionalmente el 80% de los extractos fueron activos contra al menos uno de los microorganismos de prueba y el 51% contra dos microorganismos probados. En el ensayo contra *M. tuberculosis* solo 5 (8%) extractos mostraron actividad: *Laurencia johnstonii* (04-005) con una CMI = 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3.13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *Laurencia sp.*, *S. horridum* (04-003), *Pterosiphonia bipinnata* (07-003) y *Laurencia pacifica* con una CMI = 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las CMI de estos extractos en las pruebas de citotoxicidad fueron 19.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *S. horridum*, < 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *L. johnstonii* y *Laurencia sp.*, 26.77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *L. pacifica* y 30.76  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para *P. bipinnata*. En los ensayos de actividad anti-bioincrustrante, 54 extractos fueron

evaluados por su capacidad para inhibir el crecimiento de un grupo de microorganismos formadores de incrustaciones, entre ellos: *E. coli* (ATCC 23176), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *S. aureus* (ATCC 25923), *Pseudoalteromonas elyakovii* (ATCC 700519), *Polaribacter irgensii* (ATCC 700398) *Vibrio aestuarianus* (ATCC 35048), *Fragilaria crotonensis*, *Scenedesmus armatus* y *Cosmarium* sp. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de todos los extractos activos se encontró en el rango de 0,1 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . De todos los extractos probados, 4 (7.4%) fueron activos contra *E. coli*, 9 (16.6%) activos contra *E. aerogenes*, 3 (5.5%) activos frente a *S. aureus*, 5 (9.2%) frente a *P. irgensii*, 7 (12.9%) contra *P. elyakovii* y 43 (79.6%) frente a *V. aestuarianus*. *Padina mexicana* y *U. dactylifera* fueron las más activas frente a *E. coli* con una CMI = 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , los extractos de *Gelidium robustum*, *Ganonema farinosum* y *Ulva dactylifera* mostraron CMI = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en contra *E. aerogenes*. Sólo *Colpomenia sinuosa* (07-008) mostró CMI = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente a *S. aureus*. *Macrocystis pyrifera* (09-019) y *Cystoseira osmundacea* (06-023) tuvieron CMI = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contra de *P. irgensii* y *P. elyakovii*. *Vibrio aestuarianus* fue el microorganismo más sensible, habiendo sido inhibido por el 80% de los extractos, de los cuales el 56% de ellos mostró una CMI = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En el caso de las microalgas, se observó un efecto inhibitorio en algunos casos, mientras que en otros casos se observó un efecto activador del crecimiento. Siete (12.9%) extractos mostraron actividad inhibitoria contra *Fragilaria crotonensis*. Los más activos fueron el extracto del alga 06-014 (no identificada) y el de *Colpomenia tuberculata* a 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Por otra parte 8 (14. 8%) tuvieron un efecto activador sobre *F. crotonensis*, los extractos de *S. horridum* (04-003), *Codium amplivesiculatum* (04-004), *Rosenvingea intricata* (04-020) y *Macrocystis pyrifera* (06-019) fueron los más activos (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sobre *Cosmarium* sp., sólo 3 (5.5%) de los extractos mostraron actividad inhibitoria. *Rosenvingea intricata* (06-004), *Liagora californica* (06-008) y *Gelidium robustum* (06-033) mostraron un efecto inhibidor a 1.0, 0.1 y 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Cinco (9.2%), extractos tuvieron un efecto inductor sobre *Cosmarium* sp., *Porphyra perforata* (06-020) fue el extracto más activo (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). *Scenedesmus*

*armatus* fue inhibido por 11 (20.3%) extractos, *Rosenvingea intricata* (06-004), *Corallina vancouveriensis* (06-025) e *Hypnea johnstonii* (06-035) mostraron actividad a  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 7 (12.9 %) tuvieron un efecto inductor, de los cuales los extractos de *Laurencia johnstonii* (04-005), *Gelidium robustum* (04-008), *Padina concretsens* (06-018) y *Macrocystis pyrifera* (06-019) fueron activos a  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

La segunda parte de la tesis se centra en la obtención de compuestos bioactivos a partir de *Padina mexicana* y *Sargassum horridum*. El extracto etanólico de *P. mexicana* y sus fracciones se evaluaron por su capacidad para reducir el radical libre estable DPPH y su capacidad para inhibir el crecimiento de tres bacterias patógenas [*S. aureus* (ATCC BAA-42), *S. pyogenes* (ATCCBAA-946) y *E. coli* (ATCCBAA-196)] por el método de difusión en agar con discos. Nuestros resultados muestran una interesante actividad secuestrante en la fracción obtenida con EtOAc (ESL1F2) la cual mostró una  $EC_{50} = 45.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En el fraccionamiento de ESL1F2 por cromatografía en columna, se obtuvieron 13 fracciones de las cuales las fracciones polares CCAF10, CCAF11, CCAF12 Y CCAF13 mostraron una  $EC_{50} = 12.0, 200.0, 220.0, 130.0$  y  $23.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. Las fracciones ESL1F1, ESL1F2 y ESL1F3 mostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *S. pyogenes*, además la fracción ESL1F2 mostró actividad frente a *E. coli* a una concentración de  $2 \text{ mg disco}^{-1}$ . En este estudio se aislaron los compuestos conocidos glicerol, manitol y (2S)-1-oleoil-2-3-palmitoil-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-glicerol. El alga, *S. horridum* fue estudiada como fuente de compuestos con actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis*. El extracto de esta alga mostró una  $CMI = 6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente a *M. tuberculosis*. En el fraccionamiento del extracto activo se aislaron fucosterol, ácido mirístico y un compuesto cuya estructura actualmente se encuentra en proceso de elucidación. El ácido mirístico fue el único que mostró actividad contra *M. tuberculosis* con una  $CMI = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## Abstract

In this work we studied the ethanolic extracts of 62 species of algae collected along the peninsula of Baja California Sur, Mexico, for its potential as a source of bioactive compounds. The antibacterial, antioxidant, cytotoxic, anti-biofouling and inhibitory mechanisms of bacterial resistance to antibiotics were the activities evaluated in this thesis. The first part of the thesis focuses on identifying the most promising algae as a source of compounds active against antibiotic-resistant pathogenic bacteria [*Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42), *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) and *Escherichia coli* (ATCC BAA-196)] with known resistance mechanisms, likewise, against *Mycobacterium tuberculosis*, the active extracts against *M. tuberculosis* were analyzed for their cytotoxic activity against Vero cell line. Also, the first part comprises a study of selection of the active extracts against microorganisms that cause bio-fouling on surfaces submerged in water (three terrestrial, three marine microorganisms, and three freshwater microalgae). The most relevant results on the effect of the extracts as inhibitors of bacterial resistance mechanism of ethanol extracts of 62 tested, 12 (20%) of them in combination with ampicillin were able to reverse the resistance of *S. aureus* and 8 (13%) with erythromycin of *S. pyogenes*. *Sargassum horridum* extract (04-003) was the only one who reversed the resistance of *S. aureus* and *S. pyogenes* to ampicillin and erythromycin, respectively. Additionally, 80% of the extracts were active against at least one of the test organisms and 51% against two microorganisms tested. In the trial against *M. tuberculosis* only 5 (8%) extracts showed activity: *Laurencia johnstonii* (04-005) with a MIC = 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3.13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *Laurencia* sp., *S. horridum* (04-003), *Pterosiphonia bipinnata* (07-003) and *Laurencia pacifica* with a MIC = 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The MIC of these extracts on cytotoxicity tests were 19.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *S. horridum*, <2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *L. johnstonii* and *Laurencia* sp., 26.77  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *L. pacifica* and 30.  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for *P. bipinnata*. In trials of anti-biofouling 54 extracts were evaluated for their ability to inhibit the growth of a group of fouling microorganisms, including: *E. coli* (ATCC 23176), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *S. aureus* (ATCC 25923), *Pseudoalteromonas elyakovii* (ATCC 700519), *Polaribacter irgensii* (ATCC

700398) *Vibrio aestuarianus* (ATCC 35048), *Fragilaria crotonensis*, *Scenedesmus armatus* and *Cosmarium* sp. The minimum inhibitory concentration (MIC) of all active extracts was in the range from 0.1 to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Of all the extracts tested, 4 (7.4%) were active against *E. coli*, 9 (16.6%) active against *E. aerogenes*, 3 (5.5%) active against *S. aureus*, 5 (9.2%) against *P. ingensii*, 7 (12.9%) against *P. elyakovii* and 43 (79.6%) compared to *V. aestuarianus*. *Padina mexicana* and *U. dactylifera* were the most active against *E. coli* with a MIC = 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , extracts of *Gelidium robustum*, and *Ulva dactylifera*, *Ganonema farinosum* showed MIC = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  against *E. aerogenes*. Only *Colpomenia sinuosa* (07-008) showed MIC = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  against *S. aureus*. *Macrocystis pyrifera* (09-019) and *Cystoseira osmundacea* (06-023) had MIC = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  against *P. irgensii* and *P. elyakovii*. *Vibrio aestuarianus* was the microorganism more sensitive, being inhibited by 80% of the extracts, of which 56% of them showed a MIC = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . For microalgae, the inhibitory effect was observed in some cases, while in other cases there was growth promoter. Seven (12.9%) extracts showed inhibitory activity against *Fragilaria crotonensis*. Most active were the algae extract 06-014 (unidentified) and the *Colpomenia tuberculata* to 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Moreover 8 (14.8%) had an activating effect on *F. crotonensis*, extracts of *S. horridum* (04-003), *Codium amplivesiculatum* (04-004), *Rosenvingea intricata* (04-020) and *Macrocystis pyrifera* (06-019) were the most active (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). About *Cosmarium* sp., Only 3 (5.5%) of the extracts showed inhibitory activity. *Rosenvingea intricata* (06-004), *Liagora californica* (06-008) and *Gelidium robustum* (06-033) showed an inhibitory effect at 1.0, 0.1 and 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. Five (9.2%), extracts had an inductive effect on *Cosmarium* sp. *Porphyra perforata* (06-020) was the most active extract (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). *Scenedesmus armatus* was inhibited by 11 (20.3%) extracts, *Rosenvingea intricata* (06-004), *Corallina vancouveriensis* (06-025) and *Hypnea johnstonii* (06-035) were active at 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 7 (12.9%) had an inductive effect, which extracts of *Laurencia johnstonii* (04-005), *Gelidium robustum* (04-008), *Padina concrescens* (06-018) and *Macrocystis pyrifera* (06-019) were active at 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The second part of the thesis focuses on the production of bioactive compounds from *Padina mexicana* and *Sargassum horridum*. The ethanol extract

of *P. mexicana* and its fractions were evaluated for their ability to reduce the stable free radical DPPH and its ability to inhibit the growth of three pathogenic bacteria [*S. aureus* (ATCC BAA-42), *S. pyogenes* (ATCCBAA-946) and *E. coli* (ATCCBAA-196)] by the agar diffusion method with discs. Our results show an interesting scavenger activity in the fraction obtained with EtOAc (ESL1F2) which showed an  $EC_{50} = 45.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . In ESL1F2 fractionation by column chromatography, we obtained 13 fractions of which the polar fractions CCAF10, CCAF11, CCAF12 and CCAF13 showed an  $EC_{50} = 12.0, 200.0, 220.0, 130.0$  and  $23.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectively. ESL1F1, ESL1F2 and ESL1F3 fractions, showed inhibitory activity against *S. aureus* and *S. pyogenes*, also ESL1F2 fraction showed activity against *E. coli* at a concentration of  $2 \text{ mg disc}^{-1}$ . In this study, known compounds were isolated from glycerol, mannitol and (2S)-1-oleoyl-2-3-palmitoyl-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-glycerol. The alga, *S. horridum* was studied as a source of compounds with inhibitory activity against *M. tuberculosis*. The extract of the algae showed a MIC =  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  against *M. tuberculosis*. In the fractionation of active extract was isolated fucosterol, myristic acid and a compound whose structure is currently in the process of elucidation. Myristic acid was the only one that showed activity against *M. tuberculosis* with a MIC =  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 1. INTRODUCCIÓN

Los objetivos de este proyecto de tesis fueron el estudio de extractos de algas marinas de Baja California Sur, con el propósito de recabar datos de actividad biológica que demuestren la importancia de la diversidad algal de la península como fuente de compuestos con potencial utilización farmacológica. El estudio sobre los productos naturales marinos es relativamente reciente en México. Por lo que el conocimiento sobre el potencial bioactivo del recurso algal del estado permitirá la creación y establecimiento de líneas de investigación emergentes en nuestro centro.

### 1.1. Papel de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Los productos naturales han desempeñado un papel importante a nivel mundial en el tratamiento y la prevención de enfermedades humanas. Estos productos naturales derivan de fuentes tales como las plantas, los animales y los microorganismos ya sean marinos o terrestres. La importancia de los productos naturales ha sido ampliamente discutida en varios artículos (Faulkner, 2000; Blunt, 2006; Bernards, 2010) debido al impacto que tienen en la industria farmacéutica, prueba de ello es que en el periodo de 1981 al 2006 de las 1010 nuevas estructuras químicas de interés para la industria farmacéutica, 43 fueron productos naturales y 232 sirvieron como base para la semi-síntesis de nuevos fármacos de segunda generación, 107 sirvieron como modelo para la síntesis de análogos moleculares y 124 fueron pequeños péptidos y enzimas (Newman y Cragg, 2007). Un ejemplo de estos fármacos es el taxol (Paclitaxel<sup>®</sup>), un compuesto aislado a partir de plantas del género *Taxus*. En la actualidad el taxol es utilizado como fármaco antitumoral. Otro ejemplo es el antibiótico eritromicina (obtenida de *Streptomyces erythreus*) y sus derivados claritromicina (Biaxin<sup>®</sup>) y la azitromicina (Zithromax<sup>®</sup>) utilizados para el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias patógenas (McCullagh, 2009). La penicilina, la morfina, la quinina, la vincristina, vinblastina y la ciclosporina

son ejemplos de compuestos naturales que actualmente se encuentran en uso como medicamentos de primera línea para el tratamiento de diversas enfermedades y padecimientos (Clark, 1996). Hasta el 2006 se habían descubierto 109 nuevos compuestos con actividad anti-cancerígena y 100 con actividad antibacteriana (Newman y Cragg, 2007), el interés en estas dos actividades ha crecido enormemente ya que el cáncer y las enfermedades infecciosas se encuentran dentro de las primeras causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial (Anónimo, 2010; Ioannou *et al.*, 2010), agravándose el problema con el desarrollo del fenómeno de resistencia a los antibióticos que se presenta en estos dos tipos de enfermedades (Sharom, 1997; Daza-Pérez, 1998). Alrededor del 80% de los compuestos citotóxicos aislados tienen potencial como anticancerígenos y antitumorales. Más del 60% de los medicamentos actuales contra el cáncer, tienen su origen de una u otra manera a partir de fuentes naturales (Cragg *et al.*, 1997). El papel esencial desempeñado por los productos naturales en el descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos eficaces es preponderante y en los últimos veinte años el descubrimiento de fármacos se encuentra en constante crecimiento. Tan solo en la década pasada se reportaron alrededor de 2500 compuestos con actividad antiproliferativa, y alrededor de 70 se encuentran en pruebas clínicas como anticancerígenos (Mayer & Gustaveson, 2003), de los cuales varios son productos naturales de origen marino.

A partir de la década de los sesenta, el desarrollo de la tecnología del buceo permitió que el hombre tuviera acceso a muchos organismos marinos que anteriormente eran inalcanzables (Hay & Fenical, 1996). Actualmente, existe un gran número de publicaciones sobre investigaciones acerca de la química de los productos naturales de origen marino (Blunt *et al.*, 2006). Aunque a la fecha son pocos los compuestos de origen marino que han sido aprobados y se encuentran en el mercado, los productos naturales de origen marino han tenido impacto significativo en el desarrollo de nuevos fármacos, en la última década se han aislado y probado un sinnúmero de compuestos y algunos de estos compuestos se encuentran en pruebas preclínicas y clínicas como candidatos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Aplydina, bryostatina 1, didemina B, dolastatina 10, halicondrina 10 y el

kahalalido F son ejemplos de compuestos en pruebas clínicas (Bhatnagar & Se, 2010). El descubrimiento de los nucleósidos antivirales, espongotimidina y espongouridina, a partir de la esponja marina *Tethya crypta* (Bergmann *et al.*, 1955) fue lo que disparó el gran interés en los productos naturales marinos (Figura 1). La síntesis de los análogos Ara A (Vidarabina<sup>®</sup>) y Ara C (Citarabina<sup>®</sup>) fueron nuevas alternativas para la cura de enfermedades virales como el herpes, debido a su capacidad para inhibir la ADN polimerasa, implicada en los procesos de replicación. El Ara C se encuentra disponible y en uso hoy en día como fármaco anticancerígeno.

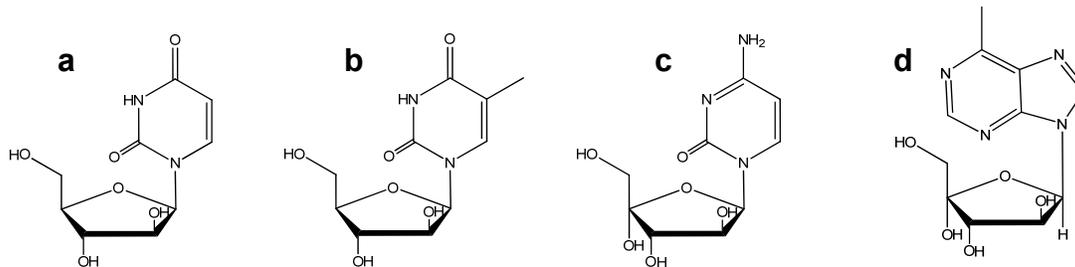


Figura 1. Estructura de los nucleosidos antivirales: a) espongouridina, b) espongotimidina, c) ara C y d) ara A.

Una particularidad de varios compuestos de origen marino, es que son estructuras únicas no encontradas en el medio terrestre esto debido a que los ecosistemas marinos poseen condiciones ambientales variables que permiten una gran diversidad biológica y una variedad de compuestos novedosos (Maschek & Baker, 2008). El hecho de tener estructuras novedosas garantiza su patentabilidad y los hace más atractivos para ser desarrollados por las industrias farmacéuticas, algunos ejemplos de estos compuestos son bryostatina 1 aislado del briozooario *Bugula neritina* (Varterasian *et al.*, 2001), la dolastatina aislada de la liebre de mar *Dolabella auricularia*, el halichondrin B aislados de diferentes esponjas, incluyendo *Halichondria okadai* y *Axinella* sp., y la aplydina (dehydrodidemnin B) aislada del

tunicado *Aplidium albicans* se encuentran en ensayos clínicos como agentes antitumorales, y varios compuestos anticancerígenos naturales que actualmente se encuentran en fase clínica (Figura 2) (Trejos *et al.*, 2009). En la actualidad el compuesto ecteinascidina 743 o trabectedina se encuentra ya en circulación comercializado con el nombre de Yondelis<sup>®</sup> por la empresa farmacéutica PharmaMar (Thornton, 2009), este compuesto entró en pruebas preclínicas en 1996 y salió a la venta a mediados del 2007.

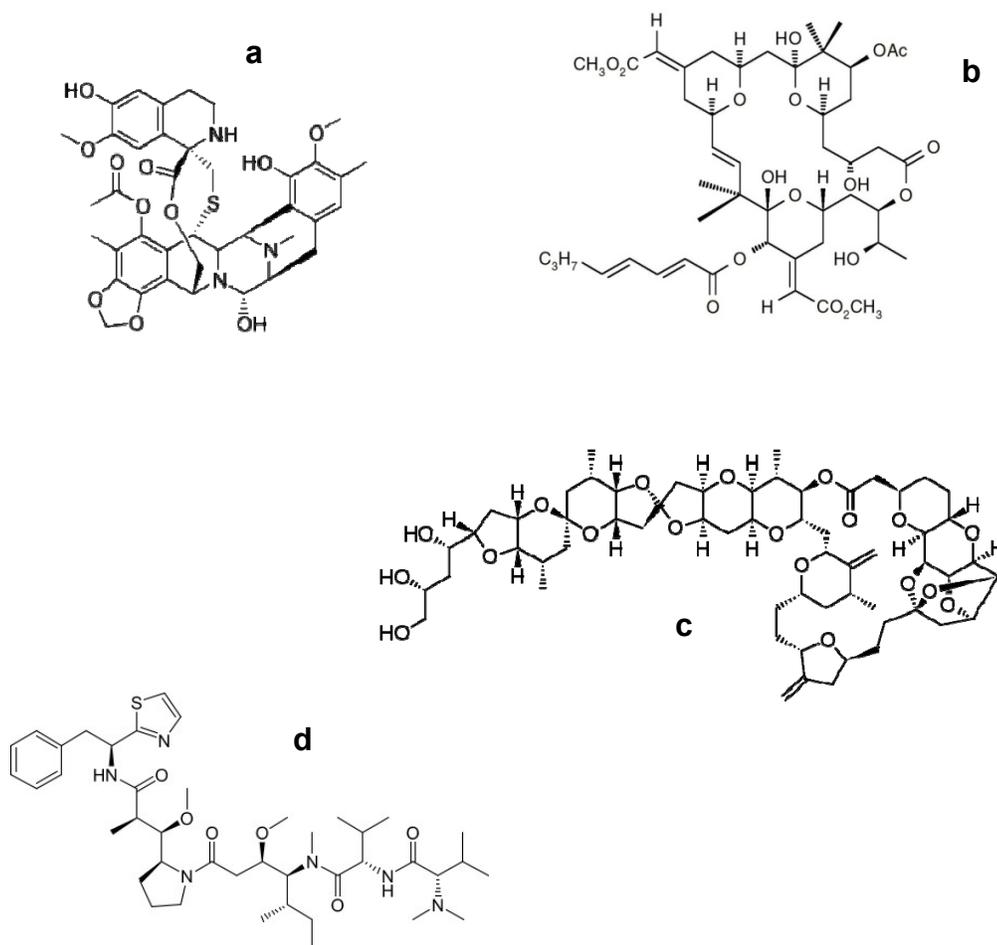


Figura 2. Estructura de algunos productos naturales que se encuentran en ensayos clínicos como agentes antitumorales o comercialmente disponibles: a) ecteinascidina 743, b) bryostatina 1, c) halicondrin B y d) dolastatina 10.

## **1.2. Condiciones geográficas y climáticas de la península de Baja California.**

La península de Baja California, México, se extiende a lo largo de la costa del Pacífico desde el cabo San Lucas, en la parte sur, hasta el norte de punta Concepción, California, Estados Unidos. La confluencia de la corriente de California de aguas frías a templadas ricas en nutrientes y de las aguas cálidas del sur hace del Pacífico sudcaliforniano una compleja zona de transición biótica, caracterizada por una rica diversidad de especies. El Golfo de California es la cuenca evaporativa más grande del Pacífico (Roden, 1958) de aproximadamente 1000 km de longitud y un ancho de 150 km en promedio, presenta un gradiente latitudinal climático que va desde condiciones tropicales y lluviosas (al sur) hasta templadas y áridas (en el norte). Durante el invierno y la primavera los vientos dominantes son del noroeste; en verano y otoño del sureste y más débiles (Roden, 1964); este periodo es de actividad de tormentas tropicales, ciclones y huracanes en el Pacífico tropical oriental y algunos de ellos impactan el Golfo de California (Álvarez-Borrego, 1983). Este patrón de vientos provoca surgencias de aguas ricas en nutrientes en ambas costas, siendo más intensos en la parte continental durante invierno-primavera. En la parte norte se registran temperaturas superficiales que varían de 10° C en invierno hasta 32° C en verano; en la zona sur en verano el promedio de las temperaturas superan los de 25° C y en invierno promedian 20° C (Valdez-Holguín *et al.*, 1999). De acuerdo con este patrón de temperatura, los nutrientes presentan altas concentraciones en la región de las islas y decrecen hacia el sur y hacia el norte (Álvarez-Borrego *et al.*, 1978). El Golfo de California es de los 5 ecosistemas marinos más productivos y diversos del mundo (Enríquez-Adrade *et al.*, 2005) y de gran importancia para México debido a que su alta productividad y condiciones oceanográficas sustentan una gran biodiversidad de flora y fauna marina.

## **1.3. El recurso algal de la Península de Baja California.**

El inventario ficológico de Baja California se comenzó a desarrollar de manera paulatina a partir de la década de los 40's con las primeras incursiones de Dawson,

sin embargo se tiene registro de estudios realizados desde 1895 en el Pacífico mexicano (Dawson, 1944), poco a poco otros trabajos han complementado este inventario realizando colectas en diversas zonas de la península de Baja California. En un reporte, realizado por Pedroche & Santiés donde se analiza la situación fitológica de México, reportan para el estado de Baja California Sur alrededor de 320 algas rojas, 73 pardas y 51 verdes registradas en las costas del lado del Pacífico sudcaliforniano. El registro para la riviéra del Golfo de California es de alrededor de 277 rojas, 62 pardas y 80 verdes. Si se considera lo anterior, se tendrían unas 669 especies registradas solo para Baja California Sur y 720 para Baja California, haciendo un total aproximado de 1400 especies algales para la península de Baja California (Pedroche & Santiés, 2003). Entre los principales trabajos realizados en la parte sur de la península, se destacan el de Riosmena & Paul-Chavez (1997, en Bahía de La Paz), Sánchez-Rodríguez *et al.*, (1989, en Bahía Magdalena), Mateo-Cid *et al.*, (1993, en Bahía Concepción), Mendoza-González & Mateo-Cid (1986, 1994a, 1994b, en Bahía Tortugas, Bahía Asunción y Todos Santos), Anaya-Reyna & Riosmena-Rodríguez (1996, en Cabo Pulmo), Águila-Ramírez *et al.*, (2000, en Laguna Ojo de Liebre) y el de Nuñez-López *et al.*, (1998, en Laguna de San Ignacio). En los trabajos mencionados se analizó y reportó la presencia y las variaciones estacionales de la flora marina, con lo cual han incorporado nuevos registros para varias especies, aunque faltan algunas zonas y algas por inventariar, es clara la riqueza en especies algales que pueden y deben ser estudiadas desde varios puntos de vista. Pacheco-Ruiz & Zertuche-González (1996) listan al menos 55 especies algales que son económicamente explotables en términos de biomasa para el consumo humano, animal, diversos usos medicinales o como fuente de polisacáridos con propiedades visco-elásticas (agar, carragenanos y derivados del ácido algínico) con aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica. Los géneros *Sargassum*, *Padina*, *Colpomenia* y *Dictyota* son los más representativos de las algas pardas, los géneros de *Gracilaria*, *Laurencia*, *Hypnea* y *Gelidium* son los más abundantes de las algas rojas, mientras que *Caulerpa*, *Codium*, *Enteromorpha* y *Ulva* las más representativas por parte de las verdes. En el mismo estudio se considera que de las 55 especies comercialmente explotables (10 pardas, 13 verdes y 32 rojas), 22

podrían ser utilizadas para el consumo humano, específicamente, especies como *Caulerpa racemosa*, *C. sertularoides*, *Codium fragile*, *C. cuneatum*, *C. simulans*, *Dictyota flabellata*, *D. dichotoma*, *Padina durvillaei*, *Porphyra perforata*, *Laurencia pacifica*, *P. papilosa* y *P. sinicola* por nombrar algunas, otras como *Codium fragile*, *C. simulans*, *Enteromorpha compressa*, *E. prolifera*, *Ulva lactuca*, *U. rigida*, *Jania adherens*, *Sargassum johnstoni*, *S. sinicola* y *Centroceras clavulatum* son utilizadas con propósitos medicinales (Pacheco-Ruiz & Zertuche-González, 1996). Es importante notar que para especies del género *Sargassum*, *Macrocystis*, *Eisenia* y *Ulva* además de haber sido determinada su abundancia en el estado (Hernández-Carmona *et al.*, 1990; Casas-Valdez *et al.*, 1993; Hernández-Carmona *et al.*, 1989; Hernández-Carmona *et al.*, 2009; Águila-Ramírez *et al.*, 2005) han sido reportadas en la literatura como fuente de compuestos biológicamente activos (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2009).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Estudios de actividad biológica realizados en algas colectadas en el Pacífico peninsular y Golfo de California.

Encarnación (1980), en uno de los primeros estudios realizados con organismos terrestres y marinos demostró el gran potencial que tiene la riqueza biológica del sur de la península de Baja California como fuente de nuevos fármacos. Sin embargo, el primer estudio a gran escala realizado sobre organismos marinos fue llevado a cabo por un grupo de investigadores estadounidenses a bordo del R/V "Alpha Helix" en 1974. El grupo de investigadores se dio a la tarea de evaluar la actividad antibacteriana, antiviral y citotóxica de 831 especies de organismos marinos colectados en la costa oeste de Baja California y en el Golfo de California. Dentro de los organismos colectados se encontraban 181 muestras de algas, de manera *in situ* fueron evaluados los extractos de 31 especies de algas verdes, 46 pardas y 104 rojas, de las cuales, 3 extractos de algas verdes mostraron actividad contra *B. subtilis* y 5 mostraron actividad contra células tumorales KB ( $ED_{50} \leq 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), de las algas pardas 1 extracto fue activo contra *E. coli*, 13 contra *B. subtilis*, 5 contra *S. cerevisiae*, 3 contra *P. atrovenetum* y 2 extractos mostraron actividad contra las células KB. Para el caso de las algas rojas, 1 extracto inhibió el crecimiento de *E. coli*, 15 extractos exhibieron actividad contra *B. subtilis*, 4 contra *S. cerevisiae*, 4 contra *P. atrovenetum*, 2 extractos mostraron actividad antiviral contra el virus del Herpes simple tipo 1 (VHS-1) ( $\leq 200 \mu\text{g disco}^{-1}$ ), 3 contra células VERO ( $ED_{50} \leq 200 \mu\text{g disco}^{-1}$ ) y 4 contra la línea de células tumorales L1210 ( $ID_{50} \leq 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Rinehart *et al.*, 1981).

Algunos de los organismos más activos fueron estudiados a bordo del R/V "Alpha Helix", utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas. Entre ellos, el alga roja *Laurencia decidua* mostró ser fuente de laurinterol; un terpeno bromado activo contra la línea celular L1210 y la transcriptasa reversa del VHS-1.

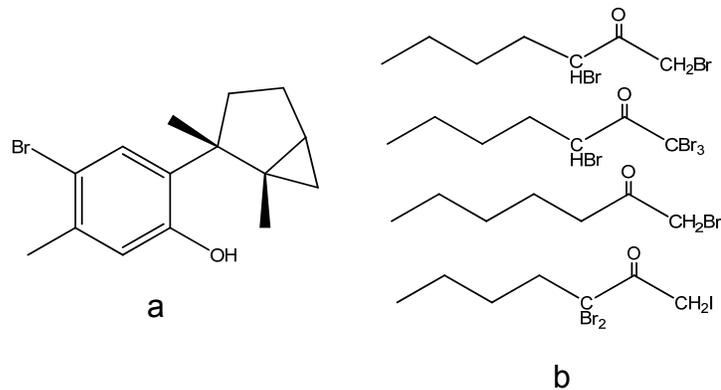


Figura 3. Estructura química de algunos compuestos aislados durante la “Alpha Helix Baja Expedition”: a) laurinterol aislado a partir de *Laurencia decidua* y b) cetonas bromadas aisladas de *Bonnemaisonia hamifera* y *Asparagopsis taxiformis*.

A su vez las algas rojas *Bonnemaisonia hamifera* y *Asparagopsis taxiformis* mostraron cetonas brominadas como componentes activos. En trabajos posteriores con muestras de *Dictyopteris undulata* y *Dictyota flabellata* colectadas en la misma expedición, se identificaron los compuestos zonarol, yahazunol y ácido zonárico como responsables de la actividad antimicrobiana mostrada por el extracto de *D. undulata* y los compuestos dictyodial y el epóxido de pachidictyol A como los responsables de la actividad antimicrobiana mostrada por *D. flabellata*.

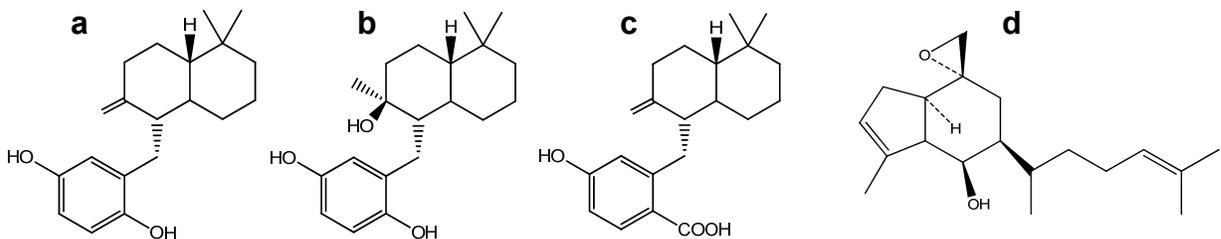


Figura 4. Estructura química de compuestos aislados a partir de *Dictyota undulata* y *D. flabellata*: a) zonarol, b) yahazunol, c) ácido zonaorico y d) epóxido de pachidictyol A.

Sin duda alguna el trabajo realizado a partir de los organismos colectados en la primera expedición en aguas del Pacífico mexicano y el Golfo de California abrió un mundo de oportunidades para el estudio de nuevas moléculas, sin embargo el gran potencial farmacológico que posee la flora marina de los mares californianos hasta a hora no ha sido completamente estudiado.

Desde 1974 a la fecha los trabajos de caracterización, aislamiento y obtención de compuestos químicos bioactivos a partir de algas marinas en las costas de la península de Baja California son escasos. Entre los existentes destaca el realizado por Fenical (1976) con el alga *Laurencia pacifica* donde fueron aislados compuestos bromados derivados del chamigreno. En la actualidad la mayoría de los compuestos halogenados están reportados como los principales compuestos activos aislados de organismos marinos. En otros reportes la variación estacional de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Sargassum sinicola* y *Laurencia johnstonii* colectadas en Bahía de La Paz, fue evaluada contra un panel de 2 cepas de bacterias gram-negativas y 3 gram-positivas. *Sargassum sinicola* mostró actividad estacional contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *Pseudomonas aureginosa*. Por su parte, *L. johnstonii* mostró actividad estacional contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. faecalis*, algunas de las subfracciones del extracto crudo de *L. johnstonii* mostraron actividad contra *E. coli* (Castro-Reyes, 1997). En el trabajo más reciente que se han reportado, se evaluaron los extractos acuosos de algas marinas de las costas de la península Baja California como fuente potencial de polisacáridos con actividad anticoagulante (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2009).

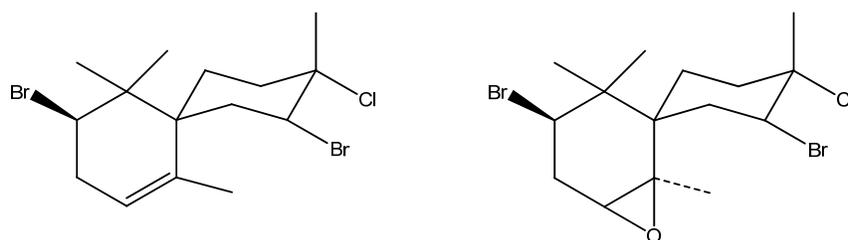


Figura 5. Estructura química de derivados del chamigreno aislados a partir de *Laurencia pacifica*

### 3. JUSTIFICACIÓN

A partir de la conocida era de los antibióticos (1940's) con el descubrimiento de la penicilina en 1918, la lucha contra las enfermedades provocadas por bacterias parecía ganada, sin embargo, el uso indiscriminado, la automedicación y las mal prescripción de antibióticos han generado un nuevo y más preocupante problema, la resistencia bacteriana, si bien el fenómeno de resistencia es un evento natural de los microorganismos, las prácticas humanas con el uso de antibióticos ha acelerado y promovido la evolución y la selección de la bacterias resistentes a los mismos fármacos utilizados para su erradicación. Por lo que los tratamientos utilizados actualmente tienen que ser más drásticos y costosos, con efectos secundarios potencialmente igual o más peligrosos que la enfermedad. Por lo que es necesaria la utilización de nuevas alternativas que permitan tratar a las enfermedades infecciosas de una manera eficaz y sin agravar el problema de la resistencia, entre las alternativas propuestas, la búsqueda de nuevos fármacos y la eliminación de los mecanismos de resistencia, parecer ser dos de las mejores alternativas, debido a que las bacterias no han generado resistencia a los nuevos fármacos, lo cual daría una ventaja al tratamiento y si adicionalmente atacamos el mecanismo de resistencia, se podrían combinar terapias en la cual se asegure la erradicación total del agente causal. Una de las fuentes que ha resultado ser muy prometedoras en la búsqueda de nuevos fármacos han sido los organismos marinos, de entre los cuales las algas son un fuente abundante muy importante de nuevas moléculas con un gran potencial de utilización, ya sea en la industria alimenticia o farmacéutica, y como hemos mencionado anteriormente, México, especialmente las costas de la Península de Baja California, tienen una gran riqueza florística marina que ha sido muy poca estudiada desde el punto de vista farmacológico. Por lo que son indispensables los estudios encaminados a catalogar e identificar dentro de este vasto recurso, a las algas más prometedoras como fuente de nuevos fármacos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial de las algas de Baja California Sur como fuente de compuesto bioactivos con potencial farmacológico.

### 4.2. Objetivos particulares

- a) Construir una colección de extractos etanólicos a partir de algas marinas colectadas en las costas de Baja California Sur.
- b) Evaluar la colección de extractos etanólicos, por su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas para humanos.
- c) Determinar la capacidad de los extractos para suprimir el mecanismo de resistencia a los antibióticos presentada por 3 cepas multiresistentes patógenas de humanos.
- d) Evaluar el efecto citotóxico contra la línea celular VERO de los extractos que resultaron activos contra *M. tuberculosis*.
- e) Evaluar el potencial de la colección de extractos como fuente de compuestos con actividad anti-incrustante contra bacterias marinas y terrestres, y contra microalgas.
- f) Seleccionar y evaluar dos especies algales como fuente de compuestos bioactivos.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Colecta del material algal e identificación taxonómica.**

El material algal utilizado en este trabajo fue recolectado en el periodo del 2004-2007 en diferentes puntos de las costas de Baja California Sur, México (Figura 6). Todo el material fue limpiado, lavado con agua dulce, secado al sol y almacenado en recipientes de plástico en refrigeración a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su utilización. Un espécimen de cada alga, fue preservado en solución de formol al 4%. Las algas recolectadas en el periodo del 2004-2005 fueron enviadas al Laboratorio de Ficología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, para su identificación taxonómica por la Dra. Luz Elena Mateo Cid y la Bióloga Catalina Mendoza González, el resto del material fue identificado por el Dr. Rafael Riosmena Rodríguez del Laboratorio de Ficología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Para obtener los extractos de cada una de las algas colectadas, se tomaron 100 g del alga seca y molida, los cuales fueron macerados con 250 mL de etanol destilado por 24 h. La mezcla disolvente/alga fue separada por filtración y el tejido recuperado fue sometido 2 veces más al mismo proceso. Las tres soluciones obtenidas a partir de cada alga fueron unidas y concentradas a sequedad en un rotavapor a presión reducida a  $40^{\circ}$  C, cada extracto fue etiquetado y almacenado a  $-20^{\circ}$  C.

### **5.2. Pruebas de actividad biológica**

Todos los extractos obtenidos fueron sometidos a las siguientes pruebas de actividad biológica:

- a) Actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con discos.
- b) Reversión de la resistencia a los antibióticos utilizando una modificación del método de difusión en agar con discos.

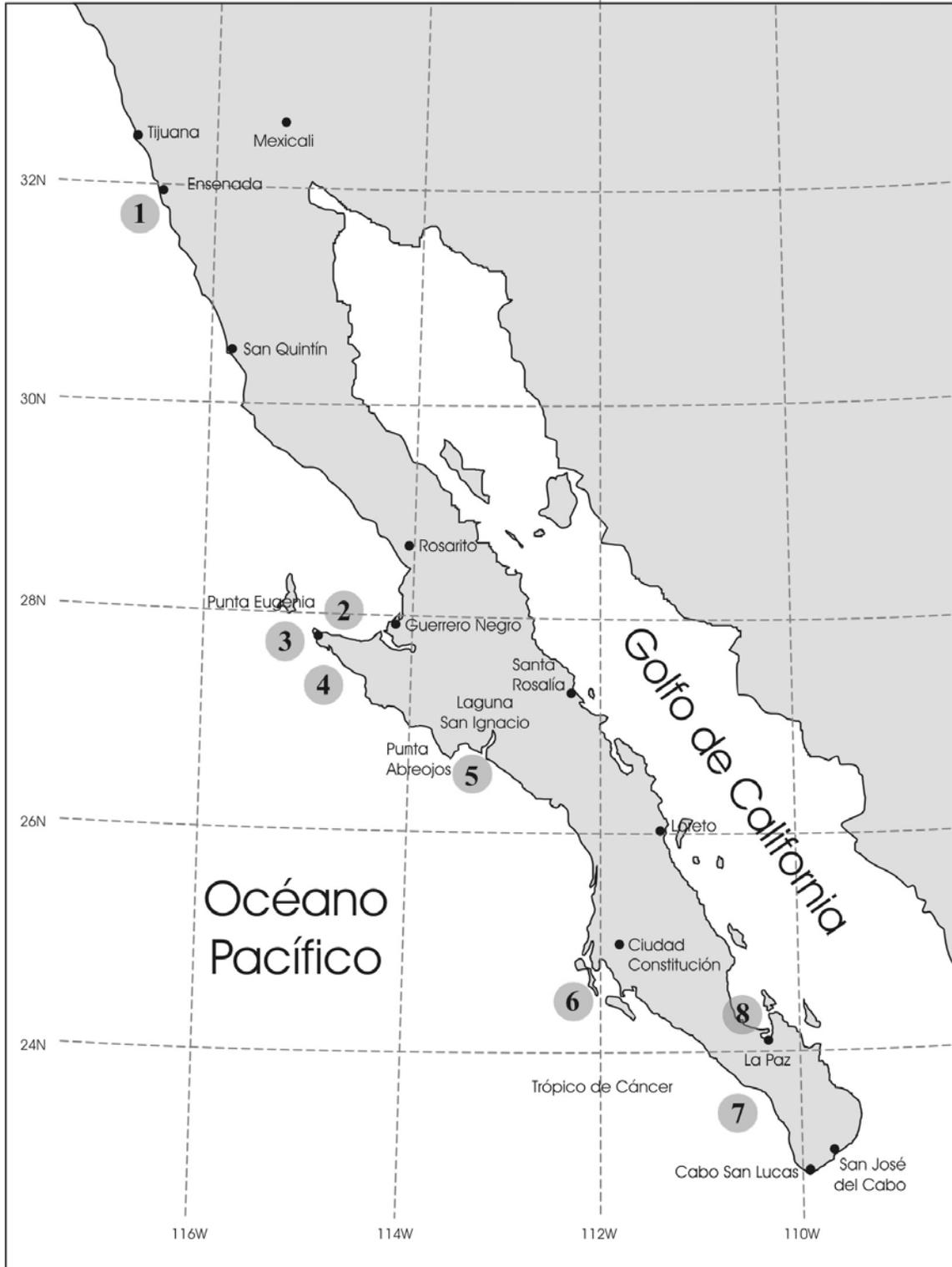


Figura 6. Zonas de colecta del material algal: 1) Ensenada; 2) Punta Eugenia; 3) Isla Natividad; 4) Bahía Tortugas; 5) Laguna San Ignacio; 6) Bahía Magdalena; 7) Playa Los Cerritos y 8) Bahía de la Paz.

- c) Actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con discos.
- d) Reversión de la resistencia a los antibióticos utilizando una modificación del método de difusión en agar con discos.
- e) Actividad anti-mycobacterium por el ensayo de azul de Alamar en microplaca, los extractos activos en esta prueba fueron adicionalmente ensayados por su efecto citotóxico contra células VERO por la técnica de exclusión de azul de tripano en microplaca.
- f) Actividad anti-bioincrustrante por la técnica de micro-dilución en placa.

### **5.3. Selección de microorganismos de prueba.**

Para el ensayo de actividad antimicrobiana y de reversión de la resistencia a los antibióticos por el método de difusión en agar con disco, en la selección de cada microorganismo se tomó en cuenta los siguientes criterios: a) tener representado a los dos grandes grupos de bacterias: gram-negativo y gram-positivo; b) que fueran bacterias caracterizadas pertenecientes a una colección comercial es decir confiabilidad en las cepas; c) que estuvieran involucrados entre las principales enfermedades infecciosas y d) que el manejo de ellas fuera seguro en las condiciones de trabajo correspondientes a la infraestructura del CICIMAR.

Tomando en cuenta estos criterios se eligieron tres cepas patógenas de humanos con mecanismo conocido de resistencia a los antibióticos. Las cepas microbianas fueron adquiridas a través de la American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. La cepa de *Escherichia coli* (ATCC BAA-196) es productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, presenta multiresistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como penicilinas y cefalosporinas, es resistente a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, gentamicina, piperacilina, tobramicina y trimetropim/ácido clavulánico; *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42)  $\beta$ -lactamasa positivo, resistente a meticilina, penicilina, oxacilina, ampicilina sulbactam y

cefalotina; *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) caracterizada por la presencia de una bomba de eflujo que le confiere resistencia a eritromicina. La cepa utilizada en los ensayos de actividad antimycobanterior fue la H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294), la cual presenta sensibilidad a isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y pirazinamida.

En los ensayos de las pruebas de actividad anti-bioincrustante se utilizaron microorganismos formadores de biopelícula, la cual es considerada el primer evento de colonización y lo que prepara a la superficie para la posterior incrustación de macroorganismos. El panel de prueba fue conformado por 3 cepas bacterianas terrestres: *Escherichia coli* (ATCC 23176), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 3 marinas: *Polaribacter irgensii* (ATCC 700398), *Pseudoalteromonas elyakovii* (ATCC 700519), *Vibrio aestuarianus* (ATCC 35048) y 3 microalgas de agua dulce: *Fragilaria crotonensis*, *Cosmarium* sp., *Scenedesmus armatus*.

#### **5.4. Ensayo de actividad antibacteriana y reversión de la resistencia**

El ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar con discos fue modificado para la detección de inhibidores del mecanismo de resistencia en las bacterias elegidas como blanco en este modelo. La modificación consistió en la adición de una concentración subletal de antibiótico comercial al medio de cultivo utilizado en la fabricación de las placas de agar Mueller-Hinton, con esta modificación se espera que el efecto del extracto en los discos inactive el mecanismo de resistencia de la bacteria dejando que el antibiótico añadido al medio de cultivo ejerza su efecto.

Discos de papel filtro Whatman No. 4 de 6.4 mm impregnados con 2 mg del extracto de prueba fueron colocados sobre la superficie de placas de agar Mueller-Hinton preparadas con y sin antibiótico previamente inoculadas con una suspensión del microorganismo de prueba a una concentración de  $4.5 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>. Las

placas fueron incubadas a 37° C por 24 h y el halo de inhibición fue medido al término de la incubación.

### **5.5. Evaluación de la actividad contra *M. tuberculosis* y citotoxicidad.**

Para las pruebas de actividad contra *M. tuberculosis* se utilizó la técnica de microdilución en placa utilizando azul de Alamar como indicador de viabilidad. *M. tuberculosis* fue cultivado en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) suplementado con 12% de glicerol y 10% AODC (ácido oleico-dextrosa-catalasa). Una suspensión celular de  $6 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> fue utilizada como inóculo. Los extractos fueron evaluados en el rango de concentración de 50 a 1.25 µg mL<sup>-1</sup>. La rifampicina se utilizó como control positivo (Molina-Salinas *et al.*, 2006).

La citotoxicidad fue evaluada contra células VERO cultivadas sobre medio modificado de Dulbecco por medio del ensayo de exclusión con azul de tripano, este tinte es más comúnmente utilizado para distinguir células viables de las no viables. Las células viables excluyen el medio de contraste, mientras que las células no viables absorben el tinte y aparecen de color azul. Las células deben estar en suspensión como células individuales en un buffer salino antes del recuento (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2007).

### **5.6. Evaluación de la actividad anti-incrustante por el método de micro-dilución.**

Se utilizó medio líquido, compuesto de 5 g de peptona diluidos en 1 L de agua de mar filtrada y estéril para el cultivo de bacterias marinas. Las bacterias terrestres fueron cultivadas en el caldo nutritivo CM0067 No. 2 a 25 g L<sup>-1</sup> (Oxoid). Todas las bacterias se incubaron a 30° C durante 5 días para permitir su crecimiento. La densidad celular fue ajustada a  $2 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> por espectrofotometría a una longitud de onda de 630 nm (Amsterdam, 1996). Los cultivos fueron incubados en placas de microdilución de 96 celdas a 30° C durante 48 h con los extractos de prueba. El efecto de los extractos fue determinado a 5 concentraciones diferentes

0.1, 1.0, 10.0, 25.0 y 50.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Después de 48 h, se determinó la densidad óptica relativa de la suspensión de la muestra a 600 nm. Se compararon las concentraciones mínimas inhibitorias con el control mediante el método de Tsoukatou *et al.*, (2002).

### **5.7. Evaluación de la actividad secuestrante de radicales utilizando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo**

La actividad secuestrante del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) fue determinada por medio de dos métodos: 1) el método bioautográfico, donde las muestras a evaluar son depositadas en una placa cromatográfica de sílica gel fase normal, la placa es desarrollada y rociada con una solución de DPPH al 0.4 % en metanol, después de 30 minutos de reposo en obscuridad, las zonas decoloradas en la placa son indicativas del efecto antioxidante. 2) método espectroscópico, en este método se utiliza una solución de DPPH al 0.02% en metanol y las lecturas se realizan a 517 nm, se realizaron curvas dosis-efecto graficando el porcentaje de reducción contra la concentración de extracto utilizado. El porcentaje de reducción del DPPH se calculó multiplicando por cien el dividendo de la diferencia entre la absorbancia del blanco y la absorbancia de la muestra sobre la absorbancia del blanco. La  $EC_{50}$  para cada fracción ensayada fue calculada utilizando la ecuación de la recta de regresión de las curvas dosis-efecto para cada fracción ensayada. La  $EC_{50}$  es la concentración de extracto necesaria para reducir la solución del DPPH al 50%. Se utilizó ácido ascórbico y phloroglucinol como estándares de referencia.

### **5.8. Selección de *Padina mexicana* y *Sargassum horridum*.**

*P. mexicana* y *S. horridum* fueron colectadas a mano a una profundidad promedio de 1 m en la Bahía de la Paz frente al poblado de San Juan de la Costa, la Paz, Baja California Sur, México en junio del 2004 entre los 24° 24' 47.64" de latitud Norte y 110° 41' 29.67" de longitud Oeste. Los extractos etanólicos de estas dos

algas mostraron actividad en los ensayos de reversión de la resistencia. *Padina mexicana* fue seleccionada porque su extracto etanólico mostró efecto inhibitorio en combinación con eritromicina contra *S. pyogenes*, además de mostrar interesante actividad en el ensayo de reducción del radical libre DPPH. Por su parte el extracto etanólico de *S. horridum* mostró actividad en combinación con ampicilina contra *S. aureus*, una alta actividad contra *M. tuberculosis* además de moderada toxicidad contra células VERO. Los extractos de *P. mexicana* y *S. horridum* fueron seleccionados para continuar con la búsqueda de los compuestos responsables de la actividad mostrada.

#### **5.9. Fraccionamiento y obtención de compuestos a partir de *P. mexicana* y *S. horridum*.**

Inicialmente los extractos de *P. mexicana* y *S. horridum* fueron sometidos a una extracción sólido-líquido con el propósito de separar el extracto en grupos de compuestos, las fracciones así obtenidas [ESL1F1 a la ESL1F4 para *P. mexicana* (Figura 7) y ESL2F1 a la ESL2F5 y ESL2FI para *S. horridum* (Figura 10)], fueron sometidas nuevamente a los ensayos de actividad. Las fracciones ESL1F2, ESL1F3 de *P. mexicana*; ESL2F1, ESL2F3 de *S. horridum* fueron elegidas por su actividad para ser fraccionadas por medio de diferentes técnicas cromatográficas incluyendo cromatografía en columna de fase normal y reversa, y cromatografía en capa fina, hasta la obtención de 5 compuestos puros; 3 de *P. mexicana* y 2 de *S. horridum*.

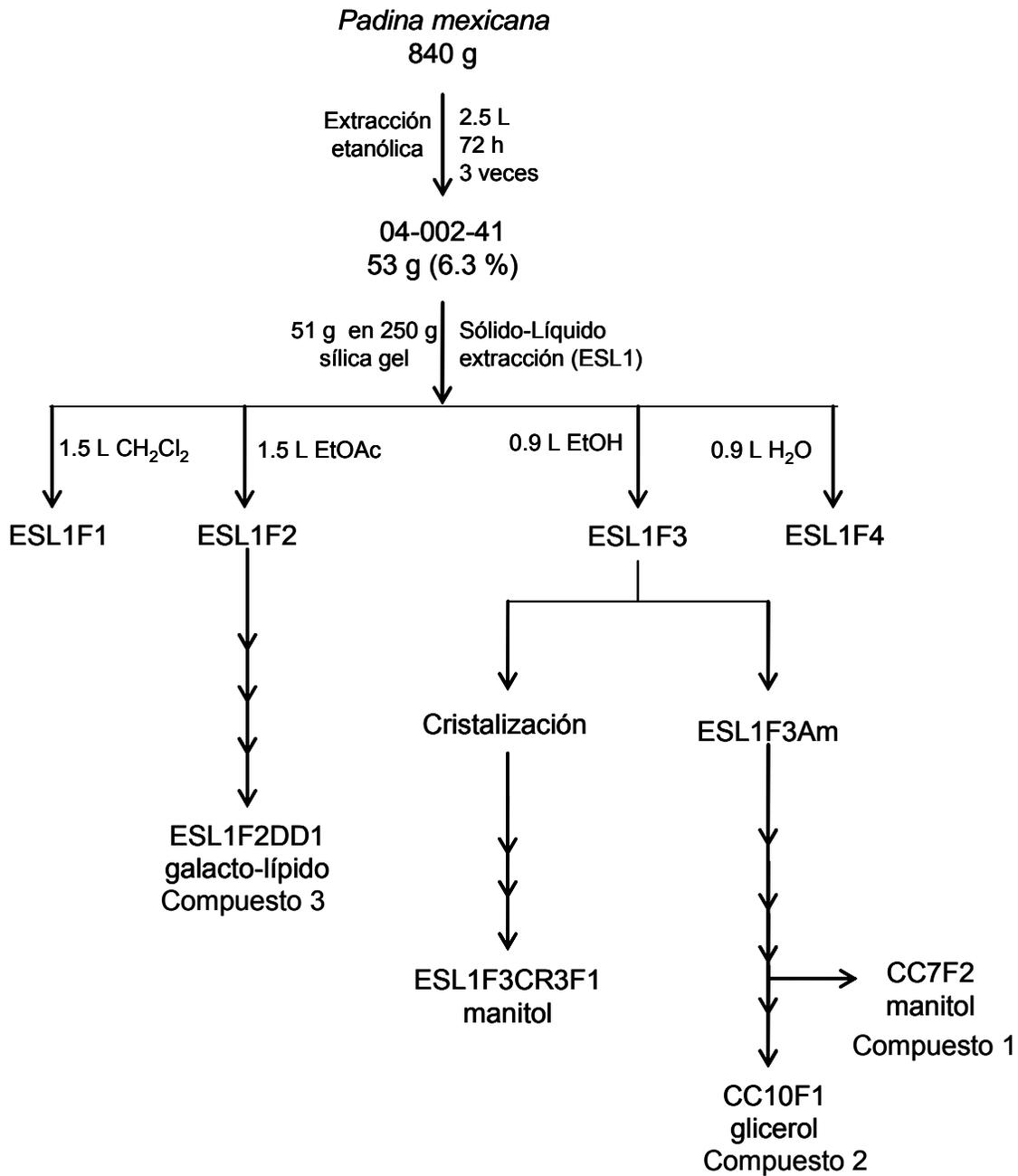


Figura 7. Fraccionamiento general del extracto de *Padina mexicana* y aislamiento de manitol, glicerol y el galactolípido

### 5.10. Aislamiento de manitol, glicerol y el galactodiacilglicerol a partir de *P. mexicana*.

De la fracción ESL1F3 (etanólica) por cristalización espontánea, fueron obtenidas dos subfracciones: la fracción ESL1F3Am (aguas madres) y la fracción cristalizada ESL1F3Cr. Quinientos miligramos de ESL1F3Cr fueron sometidos a tres pasos sucesivos de re-cristalización en etanol, de donde se obtuvo un sólido cristalino (Figura 8) posteriormente identificado como manitol. Por otra parte, a partir del fraccionamiento cromatográfico de la fracción ESL1F3Am utilizando un gradiente de elución elaborado con mezclas de MeCN y metanol, se obtuvo el compuesto denominado ESL1F3AmCC7F1 el cual fue identificado posteriormente como manitol. En el mismo proceso de fraccionamiento de ESL1F3Am utilizando cromatografía de fase reversa con un sistema de elución basado en mezclas de agua y etanol fue obtenida la fracción ESL1F3AmCC10F1, que posteriormente se identificó como glicerol.

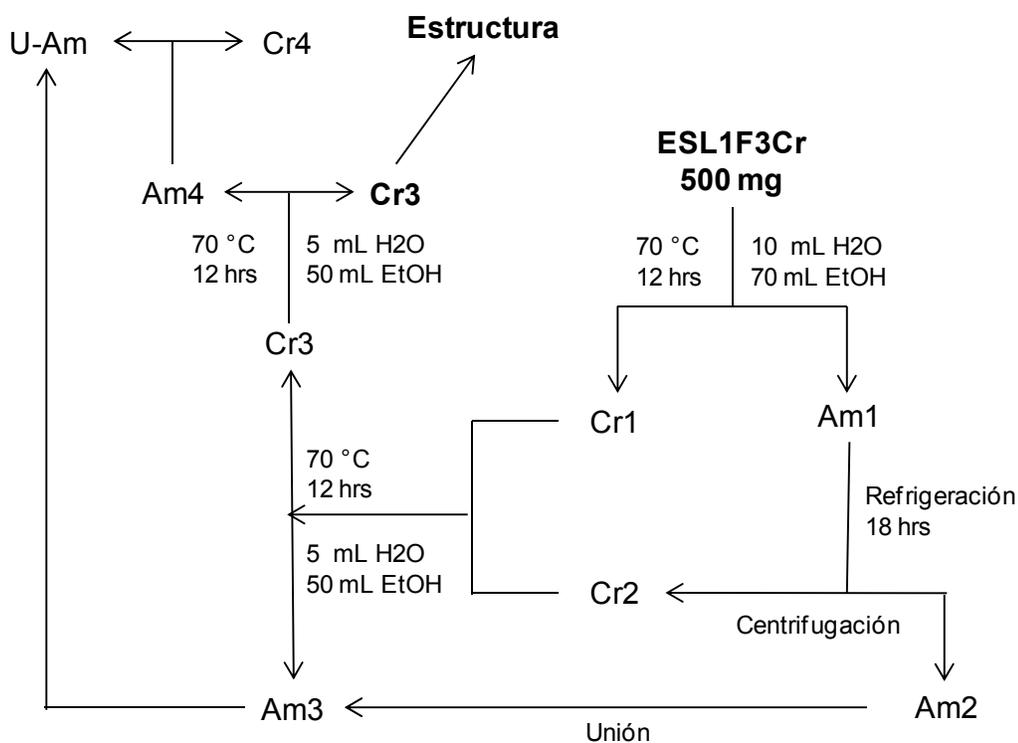


Figura 8. Purificación de manitol por cristalización a partir de la fracción ESL1F3Cr: Am = aguas madres, U-Am = unión de aguas madres, Cr = cristales

La fracción ESL1F2, obtenida con EtOAc, fue fraccionada por columna cromatográfica y por posterior purificación por columna en fase reversa (Figura 9), se logró aislar la fracción DDF1 que fue identificada posteriormente como un galactoglicerolípido.

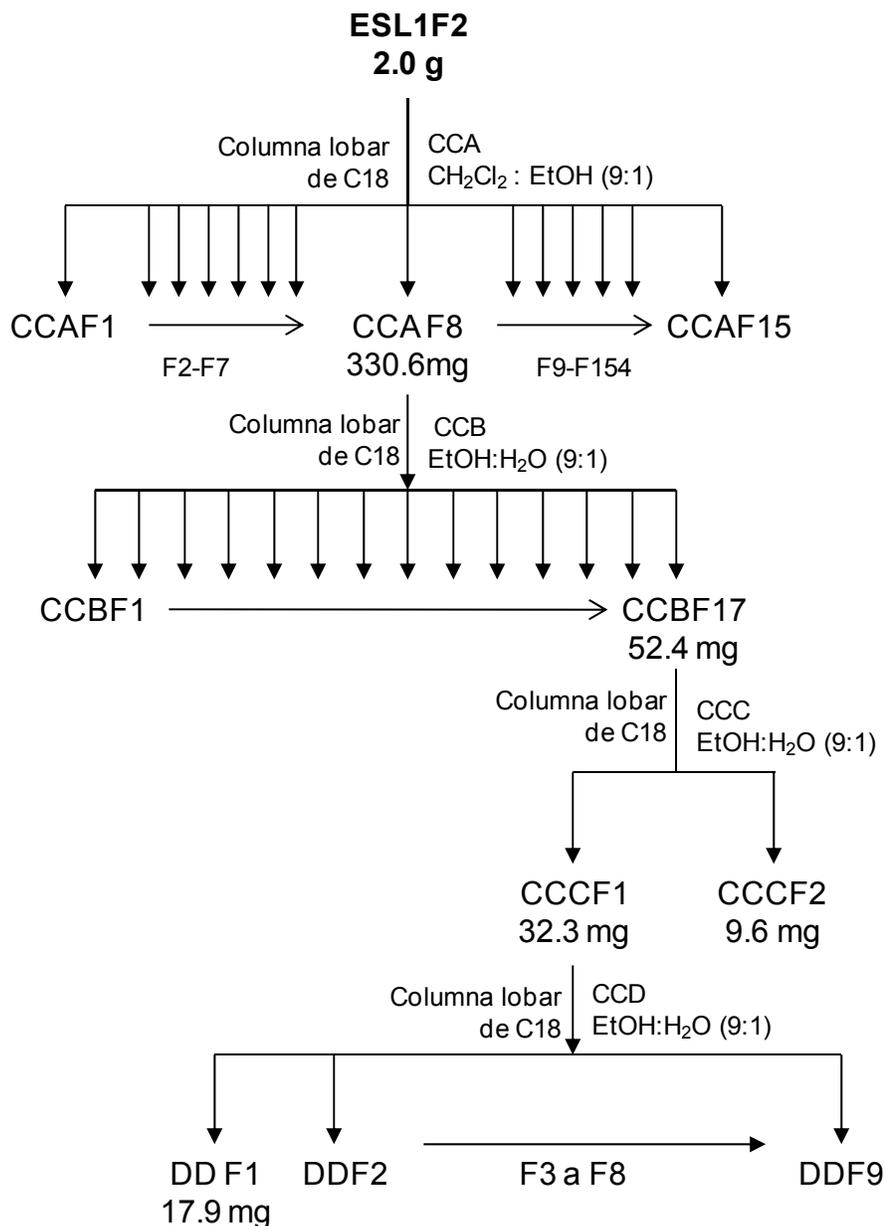
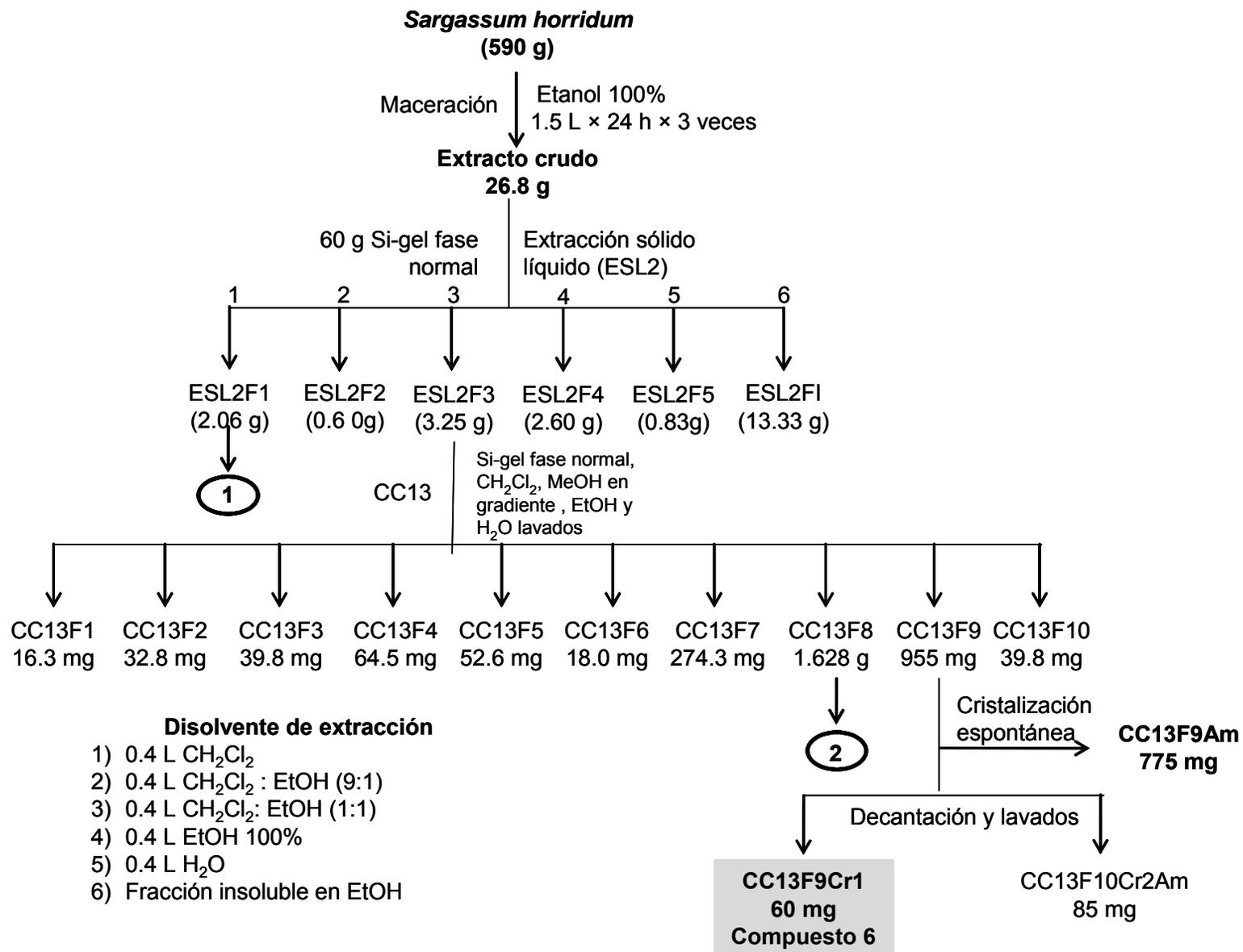


Figura 9. Diagrama de fraccionamiento de ESL1F2 y aislamiento del compuesto 3 (DDF1) a partir de *P. mexicana*.

### **5.11. Aislamiento de ácido mirístico, fucosterol y CC13F9Cr1 a partir de *Sargassum horridum***

El ácido mirístico fue aislado a partir del fraccionamiento en columna cromatográfica de 0.520 mg de ESL2F1 de las 13 fracciones (CC25F1 a CC25F13, Figura 10) obtenidas en este primer fraccionamiento, la fracción ESL2F1CC25F7695 eluída con 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mostró dos manchas principales con R<sub>F</sub> de 0.33 y 0.63 sobre placas de fase reversa C18 en un sistema de 100% etanol, esta fracción fue re-fraccionada en una columna de fase reversa C18 (Lobar) y eluída con un sistema isocrático de EtOH: H<sub>2</sub>O (9:1). Las fracciones obtenidas fueron comparadas entre sí utilizando cromatografía en placa fina (TLC) y unidas por similitud en 3 fracciones identificadas como CC26F1, CC26F2 (cristales) y CC26F3, el análisis de TLC de los cristales de la fracción CC26F2 mostró un compuesto aparentemente puro (ácido mirístico). El fucosterol fue obtenido a partir de la fracción CC26F3 por columna cromatográfica de fase reversa C18 y eluída con un sistema isocrático de EtOH: H<sub>2</sub>O (98:2), las fracciones obtenidas fueron unidas por similitud en 3 grandes fracciones CC27F1 a CC27F3, la fracción CC27F3 mostró ser un compuesto aparentemente puro (fucosterol). La fracción denominada como ESL2F3CC13F9Cr1 (CC13F9Cr1) fueron aislados por medio de cromatografía en columna a partir de 3.25 g de la fracción ESL2F3 obtenida del extracto etanólico de *S. horridum*, el fraccionamiento se llevó a cabo usando sílica-gel fase normal y un gradiente de elución utilizando mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH. En la fracción eluída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (8:2) se observó la formación de cristales, los cuales fueron separados por decantación y lavados con mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (1:1).

La estructura molecular de las fracciones ESL1F3AmCC7F2, ESL1F3AmCC10F1, ESL2F2CCDDF1, ESL2F1CC26F2 y CC27F3 fueron determinadas por comparación de sus datos espectrales de <sup>1</sup>H-RMN, contra lo reportado en la literatura.



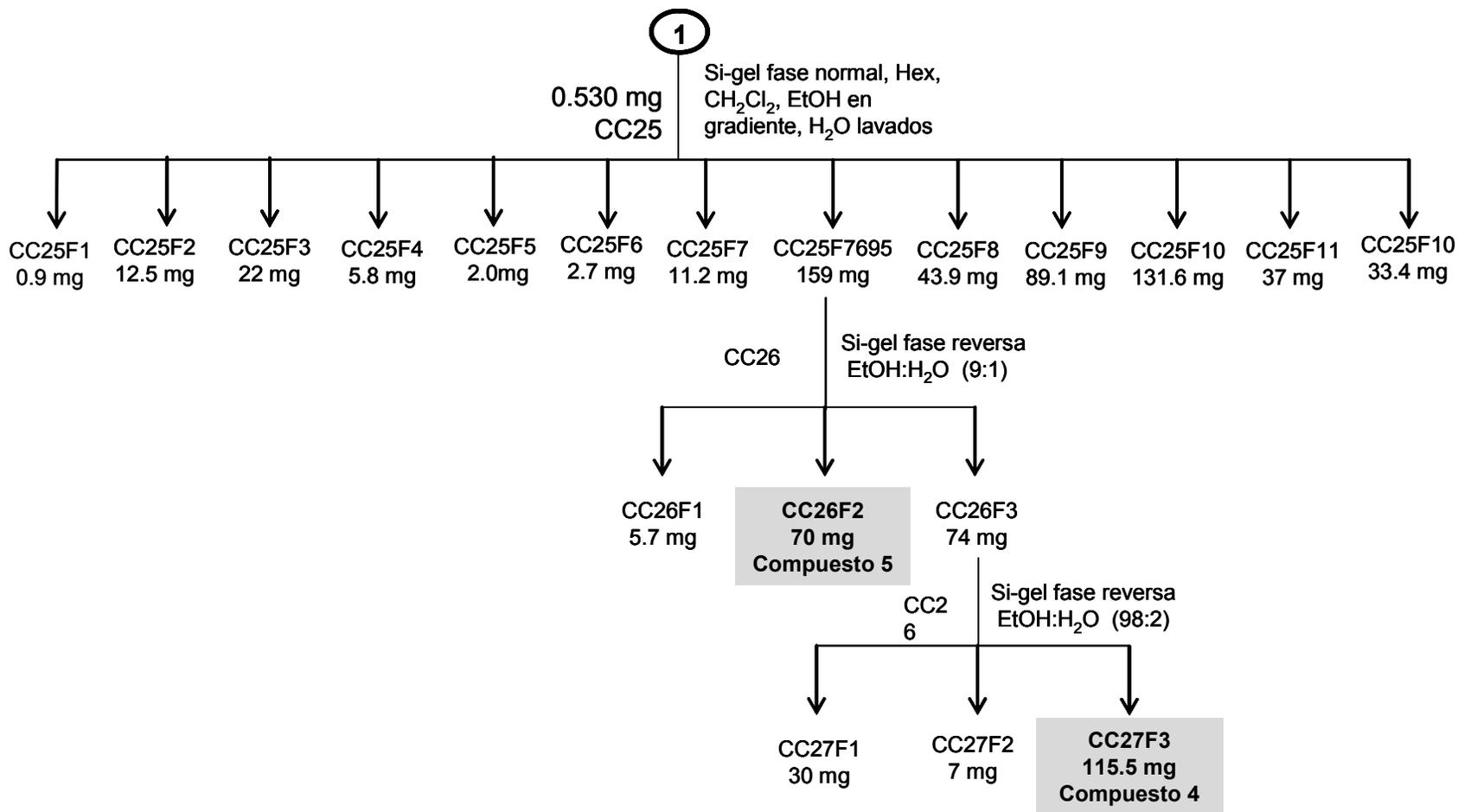


Figura 10. Fraccionamiento general del extracto de *Sargassum horridum* y aislamiento del ácido mirístico (compuesto 5) y fucosterol (compuesto 4).

## 6. RESULTADO Y DISCUSIÓN

### 6.1. Reversión de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Artículo 1)

El ensayo de reversión de la resistencia por el método de difusión en agar modificado nos permitió observar varias respuestas, las cuales se interpretaron de acuerdo a la Tabla 1.

**Tabla 1. Interpretación de los resultados de actividad antibacteriana con respecto al halo de inhibición.**

<b>Efecto</b>	<b>Extracto + antibiótico</b>	<b>Solo extracto</b>
Inhibitorio	Presencia de halo	Presencia de halo
Sinérgico	Presencia de halo	Ausencia de halo
Inactivo	Ausencia de halo	Ausencia de halo

Sólo los extractos que mostraron inhibición contra las bacterias cultivadas en el medio con antibiótico, fueron considerados como los inhibidores de los mecanismos de resistencia bacteriana. Esta interpretación fue basada bajo el supuesto de que algunos compuestos presentes en los extractos fueron capaces de inhibir la actividad de la enzima  $\beta$ -lactamasa de *S. aureus* y/o la bomba de eflujo presente en *S. pyogenes* permitiendo al antibiótico añadido (ampicilina o eritromicina) inhibir el crecimiento bacteriano, el cual fue evidenciado por las zonas de inhibición alrededor de los discos.

Los extractos de *P. mexicana* (04-002), *H. valentiae* (04-011), *C. tuberculata* (06-030), *S. horridum* (04-003), *R. intricata* (04-015), *S. filamentosa* (04-025), *L. californica* (06-008), *C. canaliculatus* (07-010), *C. amplivesiculatum* (04-004), *A.*

*spicifera* (07-004), *L. pacifica* (06-007), y *C. cuneatum* (06-011) en combinación con ampicilina fueron capaces de revertir la resistencia de *S. aureus*.

Los extractos de *S. horridum* (04-003), *C. osmundacea* (06-023), *C. canaliculatus* (06-026), *H. johnstonii* (06-035), *P. bipinnata* (07-003), *S. filamentosa* (07-006), *G. marcialana* (07-007) y *C. sinuosa* (07-008) mostraron el mismo efecto sobre la resistencia de *S. pyogenes* a la eritromicina. De los 3 extractos de *S. horridum* recolectados en diferentes años, sólo el extracto de la muestra 04-003 resultó activo. Además, *S. horridum* (04-003) fue el que mostró un efecto reversionero de la resistencia a los antibióticos de *S. aureus* y *S. pyogenes* contra la ampicilina y eritromicina respectivamente. Ninguno de los extractos probados fue capaz de afectar el crecimiento de *E. coli*.

Entre los reportes bibliográficos referentes a la búsqueda de inhibidores de los mecanismos de resistencia bacteriana, se mencionan como fuentes principales a las bacterias, en algunos casos son desarrollados por síntesis química. Un ejemplo de inhibidor de origen bacteriano es el ácido clavulánico producido por *Streptomyces clavuligerus*. Este ácido, actúa como un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (Hall *et al.*, 2003) mediante inhibición competitiva, la cual es causada por la unión irreversible de una estructura idéntica (un anillo lactámico de 4 miembros) a la del sustrato natural de las  $\beta$ -lactamasas. Creemos que inhibidores competitivos de  $\beta$ -lactamasas se pueden encontrar en las macroalgas, lo cual explicaría el efecto del extracto de *S. horridum* (04-003) y la ampicilina sobre la resistencia de *S. aureus*. Esta idea es apoyada por el aislamiento de sargassumlactam de *S. kjellmanianum* (Nozaki *et al.*, 1980), este compuesto integra en su estructura un anillo lactámico de 5 miembros el cual pudiera tener propiedades similares al anillo lactámico de 4 miembros de las penicilinas y cefalosporinas comunes. Teniendo en cuenta que compuestos similares pueden ser sintetizados por algas cafés, el efecto demostrado por *P. mexicana* (04-002), *R. intricata* (04-015), *C. osmundacea* (06-023) y *C. sinuosa* (07-008) sobre la resistencia de *S. aureus* puede explicarse por la presencia de estructuras similares a la sargassumlactam. Se han aislado otras estructuras lactámicas de algas rojas como los compuestos martensin A y B aislados de *Martensia fragilis*, el martensin A exhibió

actividad farmacológica contra *B. subtilis*, *S. aureus* y contra *M. smegmatis* (Cemal et al., 2010). Compuestos alcaloides de estructura similar al martensin pueden estar presentes en los extractos de *S. filamentosa* (04-025), *L. californica* (06-008), *L. pacifica* (06-007) y *C. canaliculatus* (07-010) y ser causantes de la actividad mostrada.

Para el caso de las bombas de eflujo bacteriano se ha investigado el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad de la bomba NorA expresada por algunas especies del género *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Kaatz & Seo, 1995; Markham et al., 1999). Entre los compuestos que se han evaluado, se encuentra el alcaloide indólico reserpin y algunos derivados de la tirosina como el INF240 y MC207110. Otros compuestos con grupos estructurales como el bromofenol han sido investigados (Gibbon et al., 2003; Markham et al., 1999). La literatura muestra que compuestos relacionados estructuralmente con algunos de los inhibidores de la bomba de NorA, están presentes en los extractos de las algas *H. johnstonii* (06-035), *C. canaliculatus* (06-026), *G. marcialana* (07-007), *P. bipinnata* (07 -003), *C. osmundacea* (06-023), *S. horridum* (04-003), *C. sinuosa* (07-008) y *S. filamentosa* (07-006) (Blunt et al., 2007) lo cual puede explicar el efecto de los extractos antes mencionados sobre la resistencia de *S. pyogenes*.

En la literatura existen numerosos informes sobre una amplia gama de actividad antimicrobiana de extractos de algas de todo el mundo (Naqvi et al., 1980; Cacamese et al., 1985; Hodgson, 1984; Ballantine et al., 1987; De Campos-Takaki et al., 1988; Ballesteros et al., 1992; Kumar & Rengamasy, 2000; Bhosale et al., 2002; Rodrigues et al., 2004; Bansemir et al., 2006), incluyendo las algas de las costas mexicanas (De Lara-Isassi & Álvarez-Hernández, 1994; Oranday, 1998; De Lara-Isassi et al., 1999; Freile-Pelegrín & Morales, 2004). Una serie de productos naturales obtenidos a partir de algas con actividad antimicrobiana se han descrito en las últimas décadas (Blunt et al., 2007). Después de una extensa revisión bibliográfica a través de bases de datos electrónicas, no se encontraron informes sobre la reversión de la resistencia bacteriana a los antibióticos por efecto del uso de extractos algales, por lo que probablemente, nuestro estudio sea pionero en este

ámbito. Esto abre una ventana de oportunidad para el estudio de nuevas moléculas con potencial farmacológico sobre el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias farmacoresistentes, lo cual tendría a su vez dos implicaciones importantes. La primera sería una reducción en el costo y tiempo de los tratamientos; esto debido a que muchos fármacos para los cuales ya existe toda la tecnología y han sido aprobados para su aplicación clínica y que actualmente son obsoletos contra bacterias resistentes a los mismos, podrían nuevamente entrar en circulación en combinación con estos nuevos inhibidores y la segunda implicación se vería directamente sobre la disminución en la generación e inducción de resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos, puesto que ya estos presentan dicha resistencia.

## **6.2. Estudio de selección de actividad antibacteriana y citotóxica**

De todos los extractos probados el 53% (33) fueron activos contra *S. aureus* y *S. pyogenes*, el 21% (13) activos sólo contra *S. pyogenes* y 6% (4) activos sólo contra *S. aureus*, el 16% (10) de los extractos fueron inactivos contra todos los microorganismos y ningún extracto mostró actividad contra *E. coli*.

En el ensayo contra *Mycobacterium* sólo 5 (8%) extractos fueron activos (Tabla 2; *S. horridum*, *Laurencia johnstonii*, *L. pacifica*, *Pterosiphonia bipinnata* y *Laurencia* sp. El resto de los extractos no mostró actividad a la máxima concentración de prueba (100 µg mL<sup>-1</sup>).

En el ensayo de citotoxicidad, los extractos de *L. johnstonii* y *Laurencia* sp., mostraron una fuerte actividad con una IC<sub>50</sub> < 2 µg mL<sup>-1</sup>. *P. bipinnata* mostró la menor actividad, con un IC<sub>50</sub> = 30.76 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 2. Extractos con actividad antimycobacteriana y citotóxica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )**

No. ID	Especie autoridad	Anti-mycobacteriana CMI $\mu\text{g mL}^{-1}$	Citotoxicidad CI <sub>50</sub> $\mu\text{g mL}^{-1}$
04-003	<i>Sargassum horridum</i>	6.25	19.05
04-005	<i>Laurencia johnstonii</i>	12.5	< 2
06-007	<i>Laurencia pacifica</i>	6.25	26.77
07-003	<i>Pterosiphonia bipinnata</i>	6.25	30.76
07-005	<i>Laurencia sp.</i>	3.13	< 2

No. ID. = Número de identificación, CMI= Concentración mínima inhibitoria, CI<sub>50</sub>= Concentración inhibitoria media.

En el método de difusión en agar, *S. pyogenes* fue el microorganismo más susceptible. Los extractos más activos contra de *S. pyogenes* fueron *Cladophora sp.*, *Amphiroa valonioides*, *Dictyopteris undulata*, *Gelidium robustum*, *Macrocystis pyrifera*, *Ganonema farinosum*, *Laurencia sp.*, *L. johnstonii* y *L. pacifica*. En el caso de *S. aureus*, los extractos más activos fueron *Dictyota flabellata*, *Laurencia sp.* y *L. johnstonii*. A pesar de que se obtuvo un alto porcentaje de extractos activos contra *S. aureus*, *S. pyogenes* y muy bajo porcentaje de extractos activos frente a *M. tuberculosis*, la actividad de los extractos contra la *M. tuberculosis* es muy alta, es decir, las concentraciones inhibitorias mínimas son bajas para ser extractos crudos, lo que implica que el compuesto puro responsable de la actividad mostrada podría ser incluso más poderoso, sin embargo, las IC<sub>50</sub> de citotoxicidad son altas en los extractos de *Laurencia sp.* y *L. johnstonii* pero inferior a la concentración mínima inhibitoria contra *Mycobacterium*, lo que sugiere que los compuestos responsables de la actividad citotóxica son diferentes de los responsables de la actividad antimycobacteriana.

En los resultados de la actividad antibacteriana, podemos observar que la respuesta de la actividad de los extractos de la misma especie recolectados en diferente fecha y localidad no fue la misma. Por ejemplo, *L. californica* (06-008) recolectada en la bahía de La Paz, fue activo contra *S. pyogenes* y *L. californica* (06-013), colectadas en la Isla de Margarita en junio 2006, fue inactivo contra este mismo microorganismo, otros casos similares fueron observados en especies como *L. pacifica*, *S. horridum*, *Rosenvingea intricata*, *Colpomenia tuberculata*, *Spyridia filamentosa* y *P. mexicana*. Muchos autores mencionan que la actividad biológica mostrada por extractos de los organismos depende tanto de factores bióticos como abióticos, entre los que se encuentran la temperatura, la salinidad, la localización geográfica, y la presión de herbivoría, entre otros.

Entre los compuestos aislados de algas marinas que han mostrado actividad antimycobacterial se encuentran una amplia gama de ácidos grasos, por ejemplo; los aislados del alga *Polysiphonia virgata* entre los que se encuentran el ácido linoléico, ácido oléico, ácido mirístico y ácido láurico (Saravanakumar *et al.*, 2008). Las algas en general bio-sintetizan ácidos grasos como parte de su metabolismo primario, sin embargo, se han aislado compuestos activos que integran en su molécula uno a más ácidos grasos tal es el caso de los glucolípidos, sulfoglicerolípidos y fosfolípidos, aunque estos compuestos se consideran primarios ya que forman parte de las membranas de los organismos, algunos han mostrado actividad contra bacterias y hongos (Al-Fadhli *et al.*, 2006), lo cual puede explicar parte de la actividad mostrada por los extractos algales evaluados en este trabajo. Para el caso de los extractos del género *Laurencia*, la actividad observada puede ser debida a compuestos como el laurinterol, cicloeudesmol (Sims *et al.*, 1975), martensin A y B extraídos de *Martensia fragilis* (Güven *et al.*, 2010) compuestos que han sido reportados como activos contra cepas de *M. smegmatis*. En algas café se han reportado compuestos esteroidales como el fucosterol y su derivado el saringosterol, obtenidos a partir de algas del género *Lessonia* (Wächter *et al.*, 2001), estos compuestos están ampliamente distribuidos entre las feofitas por lo que podrían ser los responsables de la actividad mostrada por *S. horridum*.

### **6.3. Estudio selección de actividad anti-bioincrustante.**

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de 54 extractos algales sobre el crecimiento de microorganismos formadores de biopelícula y bioincrustantes, los resultados obtenidos del estudio arrojaron datos importantes sobre el comportamiento de los extractos algales. A continuación se presentan los resultados más relevantes del estudio (Tablas 3 y 4).

#### **6.3.1. Sobre el ensayo de la actividad antibacteriana contra bacterias terrestres.**

De los 54 extractos probados solo 4 (7.4%) resultaron activos contra *E. coli*, los extractos de *P. mexicana* y *Ulva dactylifera* fueron activos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) muy baja de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , los extractos de *Hydroclathrus clathratus* y *Chondracanthus canaliculatus* tuvieron una CMI de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para el caso de *Enterobacter aerogenes* 9 extractos (16.6%) mostraron actividad inhibitoria contra este microorganismo, los extractos de *Ulva rigida*, *Rhododymenia californica* y *Rosenvingea intricata* tuvieron una CMI de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , el extracto de *P. mexicana* una CMI de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , los extractos de *S. horridum* y *Ulva dactylifera* (06-002) mostraron una CMI de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y los extractos de *Gelidium robustum*, *Ganonema farinosum* y *Ulva dactylifera* (07-010) tuvieron una CMI =  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En el ensayo con *S. aureus* solo 3 extractos (5.5%) mostraron actividad, los extractos de *Laurencia* sp. (CMI =  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *Spyridia filamentosa* (CMI =  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *Colpomenia sinuosa* ( $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

De los 54 extractos probados, 20 (37%) mostraron actividad contra las tres bacterias de prueba. Tres extractos [*P. mexicana* (04-021), *Chondracanthus canaliculatus* (07-010) y *Ulva dactylifera* (06-002)] mostraron actividad contra las bacterias gran negativas *E. coli* y *E. aurogenes*, de manera general se puede asumir que las bacterias gran negativas son más difícil de inhibir, por lo que estos resultados muestran el potencial de las algas en el combate de este tipo de microorganismos y más aún que las concentraciones utilizadas son relativamente bajas ya que se trata de extractos crudos.

### 6.3.2. Sobre el ensayo de la actividad antibacteriana contra bacterias marinas.

La bacteria *Polaribacter irgensii* fue inhibida por solo 5 (9.2 %) de los 54 extractos probados *Cystoseira osmundacea* y *M. pyrifera* mostraron interesante actividad a una CMI = 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *Porphyra perforata* y *Eisenia arborea* mostraron actividad con una CMI = 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y *Padina concrescens* mostró una CMI = 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los extractos que mostraron actividad contra *Pseudoalteromonas elyakovii*, fueron *Amphiroa valonoides* y *P. perforata* con una CMI de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *Laurencia gardneri* con una CMI de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *P. concrescens* y *Eisenia arborea* con una CMI de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , *M. pyrifera* y *Cystoseira osmundacea* con una CMI de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para el caso de *Vibrio aesturianus*, 43 (80%) extractos tuvieron actividad contra este microorganismo de los cuales, 31 (72%) mostraron una CMI de 0.1  $\mu\text{g/mL}$ , 9 (21%) extractos mostraron una CMI de 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3 (7 %) una CMI de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4 (9%) una CMI de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 4 (9%) una CMI de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Es importante hacer notar que las bacterias del género *Vibrio* son de importancia debido a que causan enfermedades mortales (vibriosis) en camarones y humanos (cólera), por lo tanto y debido a que especies como *M. pyrifera*, *C. osmundacea*, *P. concrescens*, *E. arborea* y *P. perforata* muestran concentraciones mínimas inhibitorias muy bajas (0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para ser un extracto crudo. Lo que hace suponer que los compuestos responsables de la actividad mostrada pueden ser más activos una vez purificados. Por lo que además de su utilidad en el control de microorganismo bioincrustantes, también pueden ser de potencial utilización en acuicultura para el control de bacterias marinas patógenas.

### 6.3.3. Sobre el ensayo de actividad anti-microalgal.

En el caso de las microalgas, los resultados obtenidos fueron completamente diferentes al de las bacterias. Fue observado un aumento en el desarrollo de la microalga por efecto de los extractos, de manera general se puede decir que los extractos algales probados fungieron como promotores de crecimiento de microalgas, lo cual es posible debido a que las algas marinas sintetizan metabolitos

secundarios que regulan su crecimiento, entre tales metabolitos se encuentran las auxinas, citocininas y giberelinas conocidas como hormonas de crecimiento vegetal (Tarakhovskaya *et al.*, 2007).

En el ensayo con la microalga *Fragilaria crotonensis*, 9 (16.6%) extractos tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de esta microalga, y solo 3 (5.5%) tuvieron un efecto inhibitorio contra *F. crotonensis*, *S. horridum*, *Codium amplivesiculatum*, *Rosenvingea intricata* y *M. pyrifera*, tuvieron un efecto positivo sobre el desarrollo de *F. crotonensis* a una concentración de  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , los extractos de *Rhodymenia californica*, *Colpomenia tuberculata*, mostraron un efecto inhibitorio sobre *F. crotonensis* a una concentración de  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y *Gelidium robustum* tuvo el mismo efecto a una concentración de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El resto de los extractos (43) no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento de esta microalga.

En el ensayo con la microalga *Cosmarium* sp., solo 5 (9%) extractos mostraron actividad positiva sobre el desarrollo de esta microalga. El extracto de *Rosenvingea intricata* mostro un efecto inductor del crecimiento de *Cosmarium* sp a una concentración de  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , *Rhodymenia californica*, *Eisenia arborea*, *Cystoseira osmundacea* y *Colpomenia sinuosa* mostraron actividad inductora del crecimiento de *Cosmarium* sp a concentraciones de 10, 25, 50 y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. *Liagora californica* (06-008) y *Chondracanthus canaliculatus* (07-010) mostraron un efecto inhibitor del crecimiento de *Cosmarium* sp. a concentraciones de  $0.1$  y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, el resto de los extractos probados no mostró ningún efecto.

En el ensayo con *Scenedesmus armatus*, solo 7 (13%) extractos mostraron actividad inductora del crecimiento de esta microalga, Los extractos de *Laurencia johnstonii*, *Gelidium robustum*, *P. concrescens* y *M. pyrifera* mostraron efecto inductor a una concentración de  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , *Hypnea valentiae* y *Sargassum horridum* (04-003) a una concentración de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y *Colpomenia tuberculata* (06-017) mostró actividad inductora de crecimiento a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El número de extractos con efecto inhibitor del crecimiento de *S. armatus* fue mayor que con las otras 2 cepas de microalgas, 8 (15%) extractos resultaron activos. Los extractos de *Spyridia filamentosa* (07-006) y *L. pacifica* (06-015) mostraron actividad inhibitoria a una

concentración de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , *Laurencia* sp., (07-005), *L. pacifica* (06-007), *Corallina* sp., inhibieron el crecimiento de *S. armatus* a una concentración de  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , *Dictyopteris undulata* (06-028) tuvo efecto inhibitorio a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , *Corallina vacouveriensis* (06-025) y *Sargassum horridum* (06-005) tuvieron efecto inhibitorio a una concentración de  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Las algas cafés son consideradas como fuente importante de phlorotaninos (Nakai *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006; Chkhikvishvili & Ramazanov, 2000) los cuales se cree están involucrados en la regulación y el control de epifitos en este tipo de macroalgas, sin embargo, los extractos de *P. concrescens*, *M. pyriferá*, *S. horridum* y *Eisenia arborea* resultaron inductores del crecimiento de *S. armatus* y *F. crotonensis*, esto puede deberse a que la concentración de compuestos promotores de crecimiento sea mayor a la del contenido de phlorotaninos. Es sabido que la concentración y la producción de metabolitos secundarios está determinada por muchos factores, entre los que se encuentran la disponibilidad de nutrientes, la exposición a la radiación solar, la desecación, geografía y la presión por herbivoría entre otros (Marechal *et al.*, 2004), por lo que no es sorpresa encontrar comportamientos duales en la actividad mostrada por los extractos algales. El efecto inhibitorio mostrado por los extractos de algas rojas, principalmente el caso de *S. armatus* puede deberse a una variedad de compuestos producidos por las algas. En la literatura podemos encontrar reportes de compuestos con actividad antifouling, tales como terpenoides, esteroides, carotenoides, compuestos polifenólicos, furanonas, péptidos y lactonas entre otros (Raveendran & Limna, 2009).

Como se puede observar en nuestros resultados los extractos algales pueden ser fuente potencial de reguladores de crecimiento vegetal o de compuestos capaces de inducir el desarrollo de plantas, tomando en consideración que las microalgas son consideradas plantas. Además existe evidencia sólida que soporta que las algas marinas son fuente de compuestos derivados del ácido indol-acético, de auxinas y citocininas, las cuales son consideradas como una de las principales fitohormonas (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). Por otra parte también podemos observar aunque en menor número, que varios de los extractos tuvieron un efecto inhibitor del crecimiento de microalgas, estos extractos pueden ser fuente potencial de

compuestos anti incrustantes con potencial aplicación en pinturas para superficies en contacto con el agua de mar como plataformas y embarcaciones. Además de la potencial aplicación como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana.

**Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extractos algales contra bacterias marinas y terrestres implicadas en procesos de bioincrustación.**

No. ID especie (autoridad)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. irgensii</i>	<i>P. elyakovii</i>	<i>V. aestuarinus</i>
<b>04-001</b> <i>Ulva rigida</i> (C Agardh)	NA	NA	<b>50.0</b>	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>04-003</b> <i>Sargassum horridum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	<b>1.0</b>	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>04-004</b> <i>Codium amplivisculatum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>50.0</b>
<b>04-005</b> <i>Laurencia johnstonii</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>10.0</b>
<b>04-008</b> <i>Gelidium robustum</i> (Gardner)	NA	NA	<b>0.1</b>	NA	NA	NA
<b>04-011</b> <i>Hypnea valentiae</i> (Turner) Montagne	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>04-015</b> <i>Rosenvingeia intricata</i> (Agardh) Børgensen	NA	NA	NA	NA	NA	<b>25.0</b>
<b>04-017</b> <i>Hydroclathrus clathratus</i> (C. Agardh) M. A. Howe	<b>50.0</b>	NA	NA	NA	NA	NA
<b>04-018</b> <i>Chnoospora implexa</i> (J. Agardh)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>10.0</b>
<b>04-020</b> <i>Rosenvingeia intricata</i> (Agardh) Børgensen	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>04-021</b> <i>Padina crispata</i> (Thivy)	<b>1.0</b>	NA	<b>25.0</b>	NA	NA	<b>50.0</b>
<b>04-022</b> <i>Ganonema farinosum</i> (J. V. Lamouroux)	NA	NA	<b>0.1</b>	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>04-024</b> <i>Codium cuneatum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>25.0</b>
<b>06-002</b> <i>Ulva dactylifera</i> (Setchell y Gardner)	<b>1.0</b>	NA	<b>1.0</b>	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-003</b> <i>Rhodymenia californica</i> (Kyllin)	NA	NA	<b>50.0</b>	NA	NA	<b>0.1</b>

<b>06-004</b> <i>Rosenvingea intricata</i> (J. Agardh) Børgensen	NA	NA	<b>50.0</b>	NA	NA	<b>25.0</b>
<b>06-005</b> <i>Sargassum horridum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-006</b> <i>Hydroclathrus clathratus</i> (J. Agardh) Howe	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-007</b> <i>Laurencia pacifica</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-008</b> <i>Liagora californica</i> (Zeh)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-009</b> <i>Sargassum horridum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-010</b> <i>Codium simulans</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-011</b> <i>Codium cuneatum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-012</b> <i>Codium amplivisculatum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-014</b> no identificada	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-015</b> <i>Laurencia pacifica</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-016</b> <i>Dictyota flabellata</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>06-017</b> <i>Colpomenia tuberculata</i> (Saunders)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>06-018</b> <i>Padina concretsens</i> (Thivy)	NA	NA	NA	<b>10.0</b>	<b>1.0</b>	<b>0.1</b>
<b>06-019</b> <i>Macrocystis pyrifera</i> (C. Agardh)	NA	NA	NA	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>
<b>06-020</b> <i>Porphyra perforata</i> (J. Agardh)	NA	NA	NA	<b>25.0</b>	<b>50.0</b>	<b>0.1</b>
<b>06-022</b> <i>Eisenia arborea</i> J.E Areschoug	NA	NA	NA	<b>25.0</b>	<b>1.0</b>	<b>0.1</b>
<b>06-023</b> <i>Cystoseira osmundacea</i> (Turner) C Agardh	NA	NA	NA	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>
<b>06-024</b> <i>Gelidium robustum</i> (N. L. Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>

<b>06-025</b> <i>Corallina vancouveriensis</i> (Yendo)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>06-026</b> <i>Chondracanthus canaliculatus</i> (Harvey, Guiry)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-027</b> <i>Corallina</i> sp.	NA	NA	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>06-028</b> <i>Dictyopteris undulata</i> (Holmes)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-029</b> <i>Dictyopteris delicatula</i> (J. V. Lamouroux)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-030</b> <i>Colpomenia tuberculata</i> (Squanders)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-031</b> <i>Neorhodomela larix</i> (Turner) Masuda	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-032</b> <i>Rhodymenia californica</i> (Kylin)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>06-033</b> <i>Gelidium robustum</i> (N. L. Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>06-034</b> <i>Phyllospadix</i>	NA	NA	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>06-035</b> <i>Hypnea johnstonii</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>07-001</b> <i>Amphiroa valonioides</i> (Yendo)	NA	NA	NA	NA	<b>50.0</b>	<b>50.0</b>
<b>07-002</b> <i>Laurencia gardneri</i> (Hollemborg)	NA	NA	NA	NA	<b>25.0</b>	<b>0.1</b>
<b>07-003</b> <i>Pterosiphonia bipinnata</i> (Falkenberg)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>25.0</b>
<b>07-004</b> <i>Acanthophora spicifera</i> (M. Vahl) Børgensen	NA	NA	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>07-005</b> <i>Laurencia</i> sp.	NA	<b>50</b>	NA	NA	NA	<b>0.1</b>
<b>07-006</b> <i>Spyridia filamentosa</i> (Wulfen) Harvey	NA	<b>1.0</b>	NA	NA	NA	<b>1.0</b>
<b>07-008</b> <i>Colpomenia sinuosa</i> (Derbés y Solier)	NA	<b>0.1</b>	NA	NA	NA	<b>50.0</b>
<b>07-009</b> <i>Laurencia johnstonii</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA	NA	NA	<b>10.0</b>

<b>07-010</b> <i>Chondracanthus canaliculatus</i> (Harvey, Guiry)	<b>50.0</b>	NA	<b>0.1</b>	NA	NA	<b>0.1</b>
---	-------------	----	------------	----	----	------------

NA = No activo

Tabla 4. Efecto de extractos algales sobre microalgas implicadas en procesos de bioincrustaciones. Se reporta la mínima concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a la cual los extractos mostraron un efecto inhibitorio (-) o inductor (+).

No. ID especie autoridad	<i>F. crotonensi</i>	<i>Cosmarium sp</i>	<i>S. armatus</i>
04-001 <i>Ulva rigida</i> (C Agardh)	NA	NA	NA
04-003 <i>Sargassum horridum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	<b>(+), 1.0</b>
04-004 <i>Codium cuneatum</i> (Setchell y Gardner)	<b>(+), 0.1</b>	NA	NA
04-005 <i>Laurencia johnstonii</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	<b>(+), 0.1</b>
04-008 <i>Gelidium robustum</i> (Gardner)	NA	NA	<b>(+), 0.1</b>
04-011 <i>Hypnea valentiae</i> (Turner) Montagne	NA	NA	<b>(+), 1.0</b>
04-015 <i>Rosenvingea intricata</i> (Agardh) Børgensen	NA	NA	NA
04-017 <i>Hydroclathrus clathratus</i> (C. Agardh) M. A. Howe	NA	NA	NA
04-018 <i>Chnoospora implexa</i> (J. Agardh)	NA	NA	NA
04-020 <i>Rosenvingea intricata</i> (Agardh) Børgensen	<b>(+) 0.1</b>	NA	NA
04-021 <i>Padina crispata</i> (Thivy)	NA	NA	NA
04-022 <i>Ganonema farinosum</i> (J. V. Lamouroux)	NA	NA	NA
04-024 <i>Codium cuneatum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA

<b>06-002</b> <i>Ulva dactylifera</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-003</b> <i>Rhodymenia californica</i> (Kylín)	<b>(+), 10</b>	<b>(+), 10</b>	NA
<b>06-004</b> <i>Rosenvingea intricata</i> (J. Agardh) Børgensen	<b>(+), 10</b>	<b>(-), 1</b>	<b>(-), 0.1</b>
<b>06-005</b> <i>Sargassum horridum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-006</b> <i>Hydroclathrus clathratus</i> (J. Agardh) Howe	NA	NA	NA
<b>06-007</b> <i>Laurencia pacifica</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	<b>(-), 10</b>
<b>06-008</b> <i>Liagora californica</i> (Zeh)	NA	<b>(-), 0.1</b>	NA
<b>06-009</b> <i>Sargassum horridum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-010</b> <i>Codium simulans</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-011</b> <i>Codium cuneatum</i> (Setchell y Gardner)	<b>(-), 25.0</b>	NA	NA
<b>06-012</b> <i>Codium amplivesiculatum</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-014</b> no identificada	<b>(-), 0.1</b>	NA	NA
<b>06-015</b> <i>Laurencia pacifica</i> (Setchell y Gardner)	<b>(-), 50.0</b>	NA	<b>(-), 1.0</b>
<b>06-016</b> <i>Dictyota flabellata</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-017</b> <i>Colpomenia tuberculata</i> (Saunders)	<b>(-), 0.1</b>	NA	<b>(+), 50.0</b>
<b>06-018</b> <i>Padina conrescens</i> (Thivy)	NA	NA	<b>(+), 0.1</b>
<b>06-019</b> <i>Macrocystis pyrifera</i> (C. Agardh)	<b>(+), 0.1</b>	NA	<b>(+), 0.1</b>

<b>06-020</b> <i>Porphyra perforata</i> (J. Agardh)	NA	<b>(+), 0.1</b>	NA
<b>06-022</b> <i>Eisenia arborea</i> J.E Areschoug	NA	<b>(+), 25.0</b>	NA
<b>06-023</b> <i>Cystoseira osmundacea</i> (Turner) C Agardh	NA	<b>(+), 25.0</b>	NA
<b>06-024</b> <i>Gelidium robustum</i> (N. L. Gardner)	NA	NA	NA
<b>06-025</b> <i>Corallina vancouveriensis</i> (Yendo)	NA	NA	<b>(-), 0.1</b>
<b>06-026</b> <i>Chondracanthus canaliculatus</i> (Harvey, Guiry)	NA	NA	NA
<b>06-027</b> <i>Corallina</i> sp.	NA	NA	<b>(-), 10.0</b>
<b>06-028</b> <i>Dictyopteris undulata</i> (Holmes)	NA	NA	<b>(-), 25.0</b>
<b>06-029</b> <i>Dictyopteris delicatula</i> (J. V. Lamouroux)	NA	NA	NA
<b>06-030</b> <i>Colpomenia tuberculata</i> (Squanders)	<b>(+), 25.0</b>	NA	NA
<b>06-031</b> <i>Neorhodomela larix</i> (Turner) Masuda	NA	NA	NA
<b>06-032</b> <i>Rhodymenia californica</i> (Kylin)	<b>(-), 1.0</b>	<b>(-), 50.0</b>	NA
<b>06-033</b> <i>Gelidium robustum</i> (N. L. Gardner)	<b>(-), 10</b>	<b>(-), 0.1</b>	NA
<b>06-034</b> <i>Phyllospadix</i>	<b>(+), 1.0</b>	<b>(+), 50.0</b>	NA
<b>06-035</b> <i>Hypnea johnstonii</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	<b>(-), 0.1</b>
<b>07-001</b> <i>Amphiroa valonioides</i> (Yendo)	NA	NA	NA
<b>07-002</b> <i>Laurencia gardneri</i> (Hollemberg)	NA	NA	NA

<b>07-003</b> <i>Pterosiphonia bipinnata</i> (Falkenberg)	NA	NA	<b>(-), 50.0</b>
<b>07-004</b> <i>Acanthophora spicifera</i> (M. Vahl) Børgensen	NA	NA	
<b>07-005</b> <i>Laurencia</i> sp.	NA	NA	<b>(-), 10.0</b>
<b>07-006</b> <i>Spyridia filamentosa</i> (Wulfen) Harvey	NA	NA	<b>(-), 1.0</b>
<b>07-008</b> <i>Colpomenia sinuosa</i> (Derbés y Solier)	<b>(+), 50.0</b>	<b>(+), 50.0</b>	NA
<b>07-009</b> <i>Laurencia johnstonii</i> (Setchell y Gardner)	NA	NA	NA
<b>07-010</b> <i>Chondracanthus canaliculatus</i> (Harvey, Guiry)	NA	<b>(-), 10.0</b>	NA

NA = No activo

#### 6.4. *Padina mexicana* como fuente de compuestos con actividad antibacteriana y secuestrante de radicales libres.

##### 6.4.1 Actividad antimicrobiana

De 51 g del extracto etanólico de *Padina mexicana*, fueron obtenidas más de 90 fracciones y 3 compuestos puros.

Las fracciones ESL1F1, ESL1F2, ESL1F3Am y ESL1F3Cr mostraron actividad contra *S. aureus* y ESL1F1 Y ESL1F2 contra *S. pyogenes*, la fracción ESL1F3Am tuvo actividad sinérgica contra *S. aureus* y *S. pyogenes* y ESL1F3Cr tuvo actividad sinérgica contra *S. aureus*. La fracción ESL1F2 fue la única que mostró ligera actividad contra *E. coli* (Tabla 3).

**Tabla 5. Actividad antibacteriana y efecto sinérgico de agentes comerciales y las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *Padina mexicana*. Se reporta el promedio del diámetro del halo de inhibición en milímetros (n=2).**

Fracción	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	Ext. + Amp. 75% CMI	Solo extracto	Ext. + Amp. 75% CMI	Solo extracto	Ext. + Ery. 25% CMI	Solo extracto
ESL1F1	---	---	9.0	8.5	22.0	11.0
ESL1F2	7.5	7.5	11.0	10.5	13.5	12.0
ESL1F3AM	---	---	9.5	7.0	10.0	---
ESL1F4	---	---	---	---	---	---
ESL1F3Cr	---	---	7.0	---	---	---

Amp.= ampicilina, Ery.= eritromicina, Ext.= extracto

Como podemos observar en la Tabla 5 la actividad antibacteriana de *P. mexicana* se concentra en las fracciones no polares ESL1F1 y ESL1F2 y la fracción medianamente polar ESL1F3Am, las fracciones muy polares no mostraron actividad, existen reportes en la literatura que compuestos lipofílicos como los ácidos grasos,

esteroles y algunos aceites muestran actividad antibacteriana y antifúngica (Saravanakumar *et al.*, 2008, Padmini, 1998). ESL1F3Am resultó ser la fracción más abundante además de mostrar actividad contra *S. aureus* y *S. pyogenes*. El fraccionamiento sucesivo de ESL1F3Am permitió aislar 3 compuesto puros y varias fracciones con actividad sinérgica en combinación con ampicilina y eritromicina contra *S. aureus* y *S pyogenes* respectivamente (Tabla 6). Compuestos activos extraídos de algas del género *Padina* son muy escasos. Sin embargo, se ha reportado el aislamiento del hidroperoxi-vinil-24-colesterol un oxiesterol con actividad citotóxica obtenido de *Padina pavonica* (Ktari & Guyot, 1999). De *Padina tetrastromatica* fueron aislados cinco ácidos grasos saturados: isomirístico, palmítico, margarico, estearico y araquídico, 3 insaturados: palmitoléico, oléico y tetradecatrienoico; 2 esteroles: el 24-metilcolesterol y el 24-metilonacolesterol (Shaikh *et al.*, 1991). Loliolido, otros dos terpenoides y galactitol también fueron reportados, el loliolido es un compuesto con actividad antitumoral, previene la germinación de semillas y previene la depredación (Parameswaran *et al.*, 1996). Existen reportes en otras especies de *Padina*, pero solo se ha reportado actividad a nivel de extractos crudo, por ejemplo el extracto de cloroformo:MeOH (2:1) de *Padina gymnospora* mostró actividad ligera contra *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureginosa* y contra *S. aureus* mostró actividad similar a la de la ampicilina. (Vallinayagam *et al.*, 2009).

**Tabla 6. Efecto sinérgico de antibióticos comerciales y las fracciones obtenidas de ESL1F3AM. Se reporta el promedio del diámetro del halo de inhibición en milímetros (n=2). El ensayo fue realizado de acuerdo al método de difusión en agar.**

Fracción	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i>	
	Ext-Amp 75% CMI	Ext	Ext-Amp 75% CMI	Ext	Ext-Ery 25% CMI	Ext.
CC3F4	---	---	11.5	9.5	---	---
CC3F5	---	---	---	---	---	---
CC3F6	---	---	16.5	---	18.5	14.5
CC3F8	---	---	7.0	---	---	---
CC3F9	---	---	13.2	---	13.5	10.5
CC3F10	---	---	---	---	---	---
CC3F11	---	---	---	---	12.5	---
CC3F12	---	---	15.5	---	13.5	---
CC3F13	---	---	13.0	---	---	---
CC3F14	---	---	---	---	---	---
CC4F1	---	---	11.5	9.0	---	---
CC4F2	---	---	13.0	---	---	---
CC4F3	---	---	10.5	---	---	---
CC4F4	---	---	9.0	---	---	---
CC4F5	---	---	12.5	---	---	---
CC4F6	---	---	11.5	---	---	---
CC5F1	---	---	---	---	---	---
CC5F2	---	---	---	---	---	---
CC5F3	---	---	---	---	---	10.0
CC5F4	---	---	10.0	---	---	---
CC7F1	---	---	---	---	---	---
CC7F2	---	---	---	---	---	---
CC7F3	---	---	---	---	---	---
CC7F4	---	---	---	---	---	---
CC11F1	---	---	---	---	---	---
CC11F2	---	---	---	---	---	---

Ext.= Extracto, Amp = ampicilina, Ery = eritromicina; --- = sin actividad.

Los extractos acuosos de *P. pavonica*, mostraron actividad contra los hongos: *Fusarium graminearum*, *Penicillium expansum* y *Alternaria alternata* (Omezzine *et al.*, 2009).

Sin embargo aunque han sido muy pocos los compuestos con actividad antibacteriana aislados del género *Padina*, la familia Dictyotaceae a la que pertenece, ha sido la más estudiada y ha contribuido en número importante de compuestos activos, alrededor del 30% de los compuestos obtenidos de algas pardas (Maschek & Baker, 2008). Por esta razón el estudio de *P. mexicana* brinda una oportunidad para contribuir al conocimiento de la química del género *Padina* que hasta la fecha ha sido pobremente estudiado.

#### 6.4.2. Actividad secuestrante de radicales libres.

Las fracciones ESL1F2, ESL1F3 y ESL1F4 resultaron activas en el ensayo bioautográfico, en la Figura 11 se muestra claramente la decoloración del DPPH provocada por el efecto reductor de las fracciones antes mencionadas.

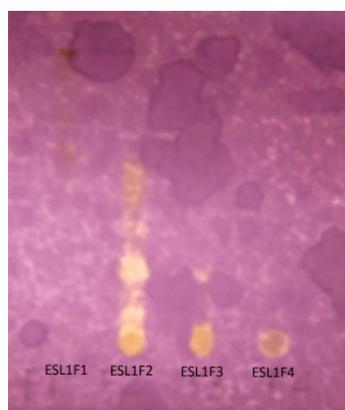


Figura 11. Actividad secuestrante por el método bioautográfico de las fracciones del extracto crudo de *P. mexicana*. Placa cromatográfica de fase normal desarrollada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (95:5), rociada con una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) al 0.2%.

Las algas cafés son conocidas por producir una variedad de entidades químicas con actividad antioxidante principalmente de tipo polifenoles, entre los que se encuentran los phlorotaninos y los flavonoides (Yoshie *et al.*, 2003), este tipo de compuestos le provee protección a las algas contra daños por radiación solar, estrés oxidativo y la depredación (Jormalainen *et al.*, 2003). Sin lugar a dudas la propiedad secuestrante de radicales libres es una de las cualidades que presentan los compuestos obtenidos de la algas que más atención ha tenido por parte de los investigadores, esto debido a que varias enfermedades degenerativas como el cáncer y diversos tumores son originados entre otras cosas por la generación de radicales libres. En este trabajo los resultados muestran claramente el potencial de los extractos de *P. mexicana* como secuestrantes del radical libre estable DPPH, la fracción ESL1F1 fue la única que no mostró actividad secuestrante, en la fracción ESL1F2 se observan varias manchas amarillas indicando una mayor cantidad de compuestos secuestrantes, además también se observa una mayor actividad evidenciada por la fuerte decoloración del DPPH. La EC<sub>50</sub> del extracto crudo de *P. mexicana* y sus fracciones se muestra en la tabla 7, donde se puede observar que la fracción ESL1F2 es la más activa, mostrando un EC<sub>50</sub> de 45.5 µg mL<sup>-1</sup>, el extracto crudo (04-002-41) y ESL1F3AM mostraron similar actividad, sus EC<sub>50</sub> fueron de 272.4.5 µg mL<sup>-1</sup> y 227.2 µg mL<sup>-1</sup>. La actividad mostrada por ESL1F2 (obtenida con acetato de etilo) podría atribuirse a los lípidos solubles, clorofilas (especialmente clorofila a) y compuestos relacionados (Le Tutour *et al.*, 1998; Stajner *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 1999), al contenido de carotenoides (Krinsky, 1989; Yan *et al.*, 1998) y compuestos de tipo flavonoides, los cuales son conocidos por su capacidad secuestrante de radicales libres y foto-protección contra rayos UV. Para el caso del género *Padina* se ha reportado la presencia de flavonoides como catecol, quercetrin y morin conocidos por su actividad antioxidante (Yoshie *et al.*, 2003).

**Tabla 7. Actividad antioxidante del extracto etanólico crudo y fracciones de *Padina mexicana*. Se reportan la EAAA y EC<sub>50</sub> calculados por método grafico de correlación lineal.**

Fracción	EC <sub>50</sub> µg/mL	EAAA (mg aa/100 g )
04-002-41	272	1801.5
ESL1F1	1303	376.0
ESL1F2	46	10652.0
ESL1F3Am	227	2158.6
ESL1F4	--	--

EAAA = equivalente de actividad antioxidante al ascorbato

EC<sub>50</sub> = Cantidad de extracto necesaria para reducir el DPPH al 50%

EC<sub>50</sub> del ácido ascórbico = EC<sub>50</sub> aa= 4.9 µg mL<sup>-1</sup>

En la tabla 7 se puede observar que la actividad de la fracción ESL1F2 es 10 veces menor a la del ácido ascórbico, el fraccionamiento de ESL1F2 por cromatografía en columna permitió la obtención de 15 fracciones de las cuales las fracciones CCAF10, CCAF11, CCAF12 Y CCAF13 fueron las más activas (Tabla 8) mostrando para el caso de las fracciones 10 y 11 una actividad similar a ESL1F2, pero mucho menor que la del phloroglucinol con una EC<sub>50</sub> de 200 y 220 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Las fracción 12 mostró una actividad 10 veces menor a la del phloroglucinol 130.0 µg/mL y la fracción 13 mostró actividad 2 veces menor a la del phloroglucinol con una EC<sub>50</sub> de 23.0 µg mL<sup>-1</sup> y casi 5 veces la del ácido ascórbico. El proceso de purificación de la fracción ESL1F2 permitió incrementar al doble la actividad secuestrante tomando en consideración que la EC<sub>50</sub> de ESL1F2 fue de 46 µg mL<sup>-1</sup> y la fracción más activa resultante del fraccionamiento de ESL1F2 mostró un EC<sub>50</sub> de 23 µg mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 8. Actividad antioxidante de las fracciones activas de ESL1F2. Se reportan la EAAA y EC<sub>50</sub> calculados por método gráfico de correlación lineal.**

Fracción	EC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup>	EAAA (mg aa/100 g )
Phloroglucinol	12.0	40833.3
CCAF10	200.0	2450.0
CCAF11	220.0	2227.3
CCAF12	130.0	3769.2
CCAF13	23.0	21304.3

EAAA = equivalente de actividad antioxidante al ascorbato (100,000.0)

EC<sub>50</sub> = Cantidad de extracto necesaria para reducir el DPPH al 50%

EC<sub>50</sub> del ácido ascórbico = EC<sub>50</sub> aa= 4.9 µg mL<sup>-1</sup>

Con respecto al ácido ascórbico, todas las fracciones resultaron menos activas. Sin embargo hay que recordar que se trata de fracciones que están en fase de purificación, por lo que el o los compuestos responsables de la actividad mostrada, todavía pudieran ser más potentes una vez purificados. Por otro lado, no podemos descartar la posibilidad de que alguno de los compuestos relacionados a la actividad secuestrante sea el propio ácido ascórbico ya que el contenido de este compuesto en las algas marinas varía de 500 a 3000 mg kg<sup>-1</sup> de peso seco (Burtin, 2003). Por otra parte, entre los responsables de la actividad secuestrante de radicales libres se encuentran los phlorotanninos estos compuestos se encuentran presentes en la algas Dictyotales en concentraciones que varían desde 3 a 100 mg g<sup>-1</sup> (Stern *et al.*, 1996) y debido a su naturaleza polar es muy probable que sean los responsables de la actividad mostrada por las fracciones polares CCAF10 a la CCAF13. Nuestros resultados son comparables a los obtenidos en otros estudios con compuestos aislados de diferentes especies algales, compuestos derivados del phloroglucinol tales como trifucodiphlorethol A, trifucotriphlorethol A, fucotriphlorethol A y eckol, que muestran actividad secuestrante en el rango de 10-14.4 µg mL<sup>-1</sup> (Parys *et al.*, 2010, Gin *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2004).

### 6.4.3. Determinación estructural de los compuestos aislados a partir de *P. mexicana*.

#### 6.4.3.1. Elucidación estructural del compuesto 1.

La determinación de la estructura del compuesto 1 fue realizada por comparación de los datos de resonancia magnética nuclear de protón reportados en la literatura. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 1 muestra 3 grupos de señales (Figura 12). El primer grupo entre 3.88 y 3.93 ppm es una señal de dos dobletes consistente para los protones de los carbonos 1 y 6, el grupo de señales que se encuentra entre 3.86 y 3.77 ppm son características de los protones de  $-\text{OH}$ , en ese mismo grupo la señales a 3.85 y 3.83 son atribuidas a los protones de los grupos  $-\text{OH}$  de los carbonos 1 y 6, el resto de las señales de este grupo pertenecen a los protones de  $-\text{OH}$  de los carbonos 2, 3, 4 y 5. El último grupo de señales entre 3.74 y 3.69 ppm, pertenecen a los protones de los grupos  $-\text{CH}_2-$  de los carbonos 2, 3, 4 y 5. Estos datos son consistentes con la molécula de manitol reportado por Hawkes (1984).

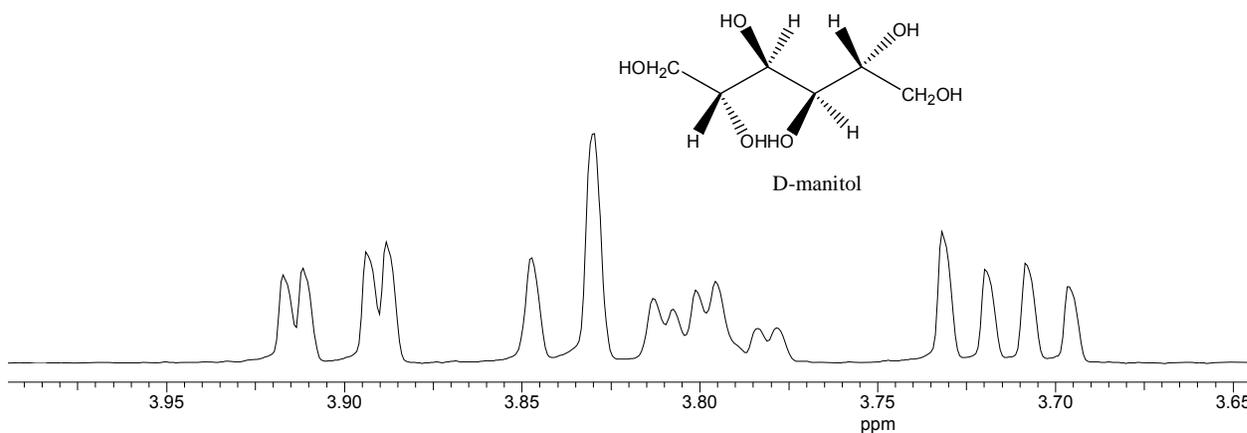


Figura 12. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 1 y estructura del manitol

### 6.4.3.2. Elucidación estructural del compuesto 2.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 2 muestra tres grupos de señales un primer grupo de múltiples entre los 3.78 y 3.73 ppm. Este grupo es atribuido al protón ( $\text{H}^2$ ) unido al carbono 2, el grupo de señales entre 3.66 y 3.60 ppm es atribuido a los protones de los carbonos 1 y 2 ( $\text{H}^1$  y  $\text{H}^3$ ) y el tercer grupo entre 3.57 y 3.51 ppm es atribuida a los protones  $\text{H}^{1'}$  y  $\text{H}^{3'}$  de los carbonos 1 y 3. Estos resultados son consistentes con lo reportado para la molécula de glicerol por Garrett y Serianni, (1990).

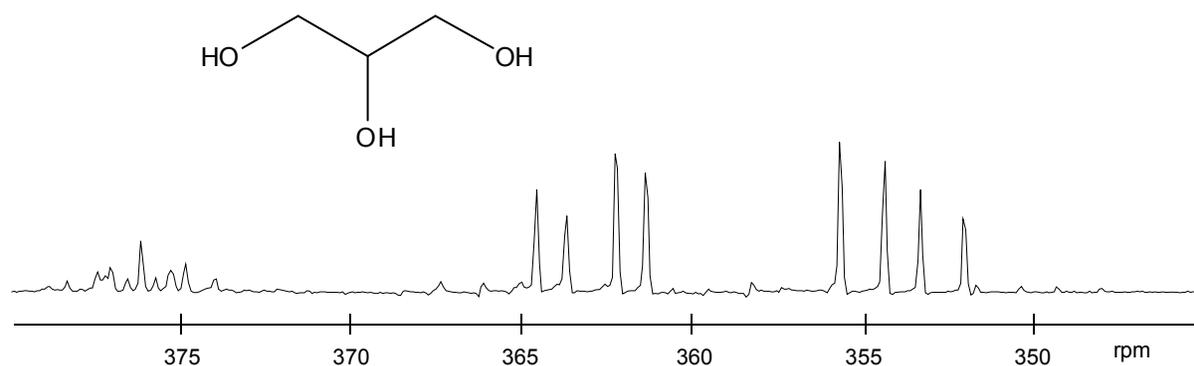


Figura 13. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 2 obtenido de *P. mexicana* y estructura del glicerol

### 6.4.3.3. Elucidación estructural del compuesto 3.

La determinación de la estructura del compuesto 3 fue realizada mediante la comparación de los datos espectrales de  $^1\text{H}$ -RMN con lo reportado en la literatura por Reshef et al., 1997. En el espectro de protón, se pueden observar varios grupos de señales, el grupo entre 1 y 0.5 ppm, corresponden a los grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ), la señal entre 1.5 y 1.0 ppm corresponde a cadenas largas de grupos metilenos ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>n</sub>, la señal entre 1.7 y 1.5 ppm corresponde a protones de carbono  $\beta$   $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ ,

las señales entre 2.1 y 1.8 ppm corresponden a protones  $\alpha$  de  $-\text{CH}_2-$  unidos a carbonilos ( $-\text{C}=\text{O}$ ), las señales alrededor de los 2.3 ppm son asignadas a protones de grupos metilenos unidos a  $-\text{CH}_2-$  unidos a grupos  $-\text{C}=\text{C}-$ , el grupo de señales entre 4.5 y 3.5 corresponden a los protones de azúcar (galactosa) y a los protones de la molécula de glicerol, el último grupo de señales corresponden al protón anomérico de la galactosa y a los dos protones que se encuentran a cada lado de un doble enlace carbono-carbono ( $-\text{HC}=\text{CH}-$ ). El espectro de protón es consistente para la molécula de (2S)-1-oleoil-2-palmitoil-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosilglicerol previamente aislada de la Cianobacteria *Fischerella ambigua* (Falch *et al.*, 1995). Este compuesto está reportado como un inhibidor de la enzima transcriptasa reversa del virus VIH-1 (Reshef *et al.*, 1997).

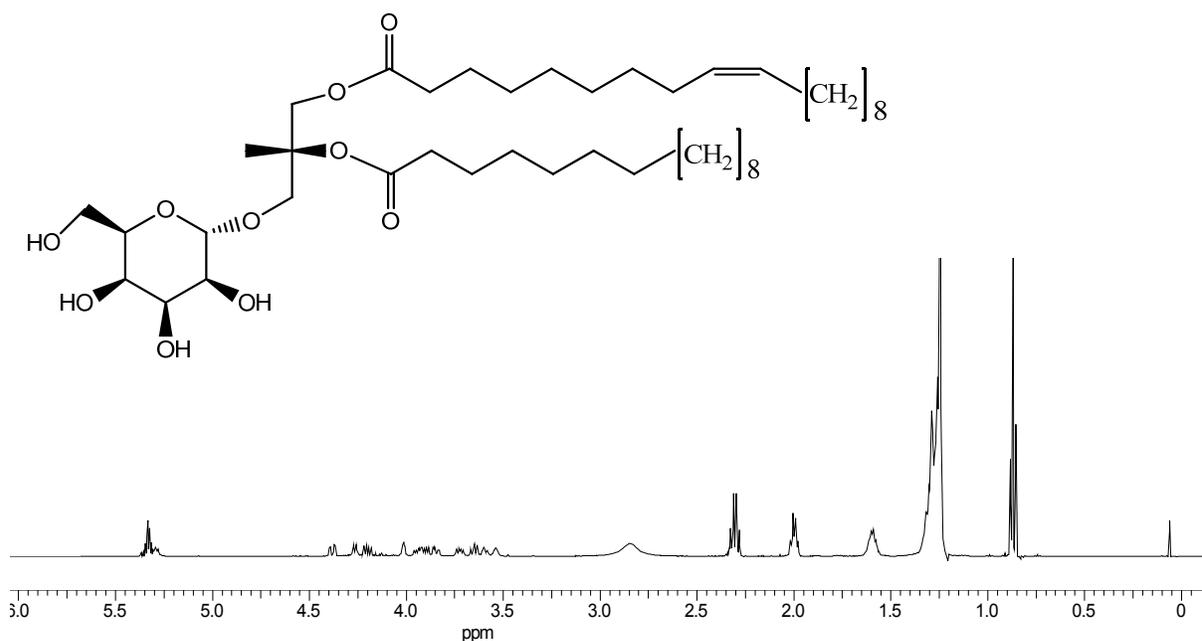


Figura 14. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 3 y estructura del (2S)-1-oleoil-2-palmitoil-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosilglicerol.

## 6.5. *Sargassum horridum* como fuente de compuestos con actividad antituberculosis

### 6.5.1. Actividad antimycobacteriana.

El extracto 04-003-41 de *S. horridum* fue evaluado por su capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* dando como resultado una concentración mínima inhibitoria (CMI) de  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Adicionalmente este mismo extracto mostró mediana citotoxicidad con una  $\text{IC}_{50}$  de  $19.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  contra células VERO. Por lo que fue fraccionado con el propósito de aislar los compuestos responsables de la actividad mostrada. El fraccionamiento por medio de una extracción sólido-líquido permitió obtener 6 fracciones. Las fracciones ESL2F1, ESL2F2 y ESL2F3 mostraron actividad contra *S. pyogenes*, la ESL2F1 adicionalmente mostró ligera actividad contra *S. aureus*, ninguna de las fracciones fue activa contra *E. coli*.

A pesar de que el extracto crudo mostró actividad contra MT con una CMI muy pequeña, sorprendentemente ninguna de las fracciones gruesas obtenidas del extracto presentó actividad contra *M. tuberculosis*. Esto sugiere que la actividad mostrada por el extracto crudo de *S. horridum* se deba a un efecto sinérgico de sus componentes sobre *M. tuberculosis*. Sin embargo, existen reportes en la literatura de compuestos aislados del género *Sargassum* que han mostrado actividad contra cepas de *M. tuberculosis*, entre los compuestos activos se encuentran, el saringosterol, la saringosterona, fucosterol y diversos ácidos grasos. Por otra parte la citotoxicidad del extracto es alta con respecto a la actividad antimycobacteriana por lo que sugiere que los compuestos activos contra *M. tuberculosis* son diferentes a los responsables de la actividad citotóxica.

Como resultado del fraccionamiento de ESL2F1 se logró aislar 3 compuestos (4, 5 y 6) figura 7, los cuales fueron identificados por comparación de sus datos espectrales con lo reportado en la literatura.

En el ensayo de actividad antiTB de los compuestos 4, 5 y 6, solo el compuesto 4 (ácido mirístico) mostró actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* con una CMI de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , los compuestos 5 (fucosterol) y 6 (posible galactitol por

comprobar) mostraron una CMI > 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El ácido mirístico ya había sido reportado con anterioridad en un trabajo realizado con el alga *Polysiphonia virgata*, en ese trabajo aislaron diversos ácidos grasos y es ácido mirístico aparece como uno de los responsables de la actividad mostrada contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* con una CMI = 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nuestros resultados son consistentes al 100% con este reporte (Saravanakumar *et al.*, 2008). En otro trabajo se evaluó la actividad de diversos ácidos grasos contra 16 especies de *Mycobacterium*, el ácido mirístico mostró una concentración mínima inhibitoria del 40% (CMI<sub>40</sub>) de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  contra la cepa de *M. aurum*, contra el resto de las cepas la CMI fue superior a los 400  $\mu\text{g/mL}$  (Saito *et al.*, 1984), sin embargo aunque el ácido mirístico obtenido de *S. horridum* mostró una actividad antimycobacteriana interesante creemos que no es el único compuesto activo ya que el extracto etanólico crudo de *S. horridum* mostró una CMI de 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  una actividad 7 veces mayor al ácido mirístico, compuestos obtenidos de otras especies de algas cafés como el caso de *Lessonia nigrescens* de la que se obtuvo saringosterol y sus epímeros 24S y 24R mostraron CMI de 0.25, 1.0 y 0.125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente (Wächter *et al.*, 2001), muy probablemente este tipo de compuestos sean los responsables de la alta actividad mostrada por *S. horridum*.

## **6.5.2. Determinación estructural de los compuestos aislados de *S. horridum*.**

### **6.5.2.1. Elucidación estructural del compuesto 4.**

El compuesto 4 fue identificado por medio de  $^1\text{H}$ -RMN como ácido mirístico (Figura 15), el espectro de este compuesto mostró desplazamientos químicos en el rango de 0.5 a 2.0 ppm consistente con lo reportado para el ácido mirístico (Catalan *et al.*, 1988), la pequeña señal alrededor de 0.67 ppm corresponde a los protones del grupo metilo terminal (-CH<sub>3</sub>) de la cadena de carbonos del ácido graso, el grupo de señales alrededor de 0.7 y 1.0 ppm corresponde a protones de grupos metilenos unidos a metilo (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), la señal intensa alrededor de 1.1 y 1.3 ppm corresponde a los protones de cadena de grupos metileno [(-CH<sub>2</sub>-)<sub>n</sub>], la señal alrededor de 1.5-1.6 ppm corresponde a protones de grupos unidos a carbonos  $\beta$  del grupo carboxilo

( $-\text{C}^{\beta}\text{H}_2-\text{C}^{\alpha}\text{H}_2-\text{COOH}$ ), por último la señal alrededor de 1.95 ppm corresponde a los protones  $\alpha$  del grupo metileno unido al grupo carbonilo ( $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ).

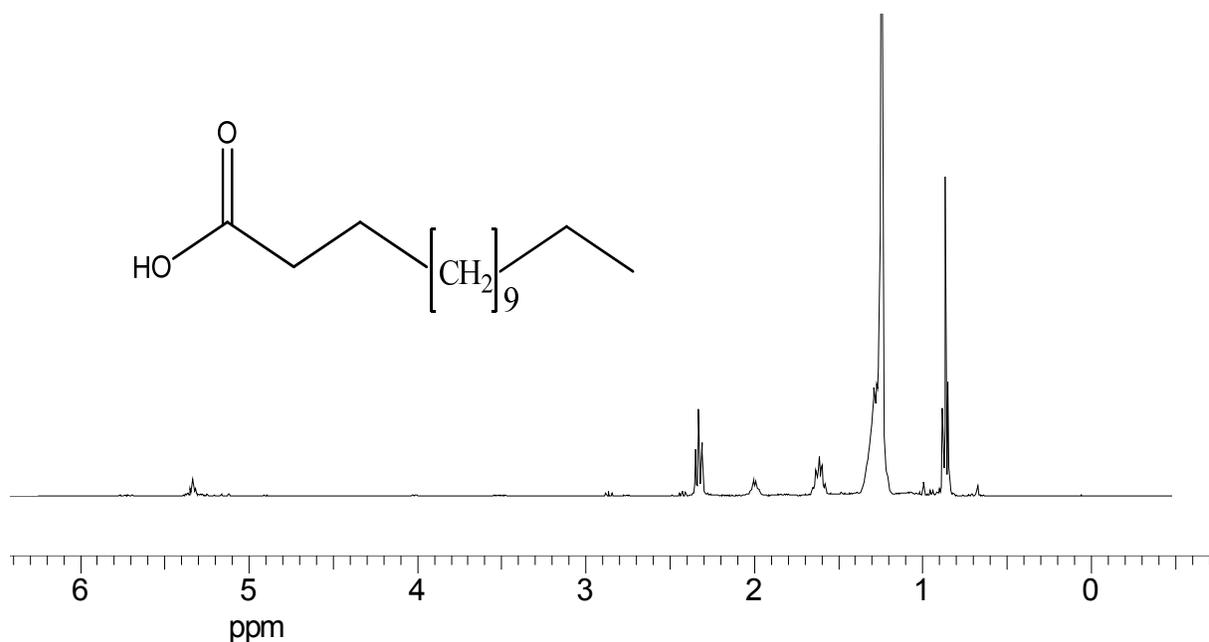


Figura 15. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 4 obtenido de *Sargassum horridum* y estructura del ácido mirístico.

#### 6.5.2.2. Elucidación estructural del compuesto 5.

El compuesto 5 (CC27F3) dio un espectro de protón complejo con múltiples señales, sin embargo los desplazamientos característicos de los esteroides pueden ser fácilmente identificados. En el espectro <sup>1</sup>H-RMN (Figura 16), las señales de los protones de los carbonos 18 y 19, las podemos observar a las 0.67 y 01.2 ppm respectivamente, las señales dobles de los metilos 21, 26, 27 y 29 las observamos a 0.96, 0.97, 0.98 y 1.24 ppm respectivamente. Los desplazamientos químicos mostrados por el compuesto 5 son consistentes con los reportados para la molécula de fucosterol. La Tabla 9 muestra la comparació de los desplazamientos químicos del compuesto 5, el fucosterol y el isofucosterol.

**Tabla 9. Comparación de los desplazamientos químicos de a) fucosterol\*, b) CC27F3 c) isofucosterol\*.  $\delta$  en ppm.**

	C18	C19	C21	C26	C27	C28	C29	C25
Fucosterol	0.68	1.01	0.98	0.98	0.98	5.07	1.98	2.2
CC27F3	0.68	1.02	0.96	0.97	0.98	5.15	1.24	2.27
Isofucosterol	0.68	1.01	0.94	0.97	0.97	5.10	1.6	2.8

\*Rohmer *et al.*, 1980.

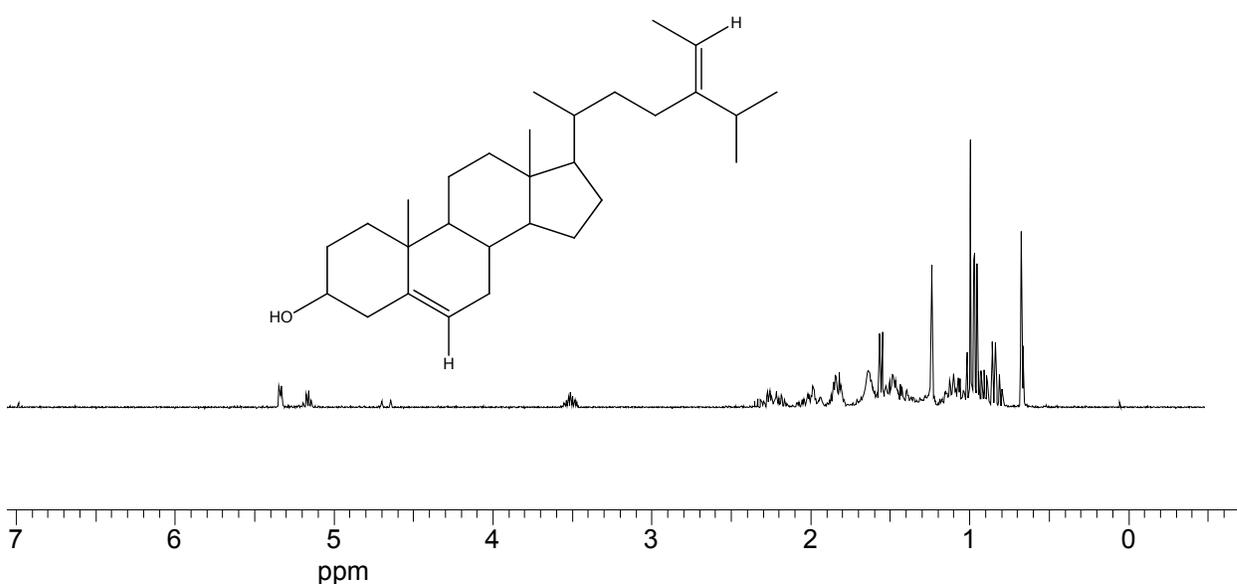


Figura16. Estructura y espectro <sup>1</sup>H-RMN del fucosterol obtenido de *Sargassum horridum*.

### 6.5.2.2. Elucidación estructural del compuesto 6.

La estructura del compuesto 6 se encuentra actualmente en proceso de elucidación, a la fecha se ha obtenido el espectro de infrarrojo de este compuesto, de acuerdo a sus bandas de absorción el compuesto 6 tiene un estructura similar a la del manitol previamente aislado de *Padina*, sin embargo existan algunas pequeñas

diferencias que hacen suponer que el compuesto 6 podría tratarse de galactitol, sin embargo falta confirmarlo.

## 7. CONCLUSIONES

1. 80% de las algas en este estudio son fuente de compuestos con potencial uso farmacológico como antibacterianos, por lo menos contra un microorganismo del panel de prueba.
2. Que las algas marinas del estado, son fuente de compuestos inhibidores de los mecanismos de resistencia a la ampicilina y/o a la eritromicina presentada por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* respectivamente.
3. Que las algas contienen compuestos inhibidores del crecimiento de microorganismos terrestres y acuáticos involucrados en los procesos de colonización e incrustaciones en superficies sumergidas.
4. Que es posible encontrar compuestos con actividad inhibitoria del crecimiento de microalgas algunas especies de algas y compuestos con actividad estimuladora del crecimiento en otras especies de algas.
5. Que *Padina mexicana* es fuente de compuestos antibacterianos y antioxidantes con potencial farmacológico.
6. Que *Sargassum horridum* es fuente de compuestos con potencial farmacológico para combatir enfermedades infecciosas como la tuberculosis.
7. Que en enfermedades degenerativas como el cáncer y el síndrome metabólico en las que el estrés oxidativo es uno de los agentes causales, las algas marinas mexicanas pueden tener un papel preponderante para su tratamiento, lo cual queda de manifiesto con los resultados de actividad antioxidante mostrada por el extracto etanólico de *Padina mexicana* y la actividad citotóxica mostrada por varios extractos del género *Laurencia*, así como la actividad antimycobacterial de *Sargassum horridum*.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abbott, P. 1996. Ethnobotany of seaweeds: clues to uses of seaweeds. *Hidrobiología* 326/327: 15-20.
- Águila-Ramírez, R. N., M. M. Casas-Valdez, B. M. Cruz-Ayala & Núñez-Lopez, R. A. 2000. Variación estacional de la ficoflora en la Laguna Ojo de Liebre. Baja California Sur, México. *Hidrobiológica* 10: 147-160.
- Águila-Ramírez, R. N, M. M. Casas-Valdez, G. Hernández-Carmona & A. Marín-Álvarez. 2005. Biomasa de *Ulva* ssp. En tres localidades del Malecón de La Paz Baja California Sur, México. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 40: 55-61.
- Al-Fadhli, A., S. Wahidulla & L. D'Souza. 2006. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. *Glycobiol.* 16: 902-915.
- Álvarez-Borrego, S., J. A. Rivera, G. Glaxiola-Castro, M. J. Acosta-Ruiz & A. Schwartzlose-Richard. 1978. Nutrientes en el Golfo de California. *Cien. Mar.* 5: 53-71.
- Álvarez-Borrego, S. 1983. Gulf of California, 427-449. En: Ketchum, B. H. (Ed.) *Estuaries and Enclosed Seas*. Elsevier, Amsterdam. 500 p.
- Amsterdam, D. 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media 52-111. En: Lorian, V. (Ed.) *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore. 1238 p.
- Anaya-Reyna, G. & R. Riosmena-Rodríguez. 1996. Macroalgas marinas del arrecife coralino de Cabo Pulmo-Los Frailes, B.C.S., México. *Rev. Biol. Trop.* 44: 861-864.
- Anónimo. 2010. Estadísticas sanitarias mundiales. Organización Mundial de La Salud, Genova. 177 p.

- Ballantine, D. L., W. H. Gerwick, S. M. Vélez, E. Alexander & P. Guevara. 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiológica* 151/152: 463-469.
- Ballesteros, E., D. Martin & M. J. Uriz. 1992. Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes. *Bot. Mar.* 35: 481-485.
- Bansemir, A., M. Blume, S. Schöder & U. Lindequist. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252: 79-84.
- Bernards, M. A. 2010. Plant natural products: a primer. *Can. J. Zool.* 88: 601-614.
- Bergmann, W. & D. C. Burke. 1955. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Sponthymidine and spongouridine. *J. Org. Chem* 20: 1501-1507
- Bhatnagar, I. & K. K. Se. 2010. Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies. *Marine Drugs* 8: 2702-2720.
- Bhosale, S. H., V. L. Nagle & T. G. Jagtap. 2002. Antifouling potential of some marine organisms from India species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Mar. Biotechnol.* 4: 111-118.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. Prinsep. 2004. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21: 1-49.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. Prinsep. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23: 26-78.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote & M. Prinsep. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24: 31-86.
- Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweed. *EJEAFChe.* 2: 498- 503.

- Caccamese, S., R. M. Toscano, I. G. Furnari & M. Cormaci. 1985. Antimicrobial activities of red and brown algae from southern Italy coast. *Bot. Mar.* 28: 505-507.
- Casas-Valdez, M. M., I. Sánchez-Rodríguez & G. Hernández-Carmona. 1993. Evaluación de *Sargassum* spp. en la costa oeste de Bahía Concepción, B. C. S., México. *Invest. Mar., CICIMAR.* 8: 61-68.
- Castro-Reyes, M. A. 1997. Actividad antibacteriana de *Sargassum sinicola* (Sargassaceae, Phaeophyta) y *Laurencia Johnstonii* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) de Bahía de la Paz, B.C.S., México. Tesis de maestría, CICIMAR-IPN. 64 p.
- Catalán, A. N. C., I. A. D. de Iglesias, J. Kavka, E. V. Sosa & W. Herz. 1988. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia chamaedrys*. *Phytochemistry* 27: 197-202.
- Cemal, G. K., A. Percot & E. Sezik. 2010. Alkaloids in marine algae. *Marine Drugs* 8: 269-284.
- Chkhikvishvili, I. D. & Z. M. Ramazanov. 2000. Phenolic substances of brown Algae and their antioxidant activity. *Appl. Biochem. Microbiol.* 36: 289-291.
- Clark, M. A. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research.* 13: 1133-1141.
- Cowan, J. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 564-582.
- Cragg, M. G., D. J. Newman & K. M. Snader. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60: 52-60.
- Cragg, G. M., D. J. Newman & R. B. Weiss. 1997. Coral reefs, forests and thermal vents: The worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Seminars in Oncolog.* 24: 156-163.

- De Campos-Takaki, G. M., M. B. S. Diu, M. L. Koenig, & E. C. Pereira. 1998. Screening of marine algae from Brazilian northeastern coast for antimicrobial activity. *Bot. Mar.* 3: 375-377.
- Dawson, E. Y. 1944. The marine alga of Gulf of California. *Allan Hancock Pac. Exped.* 3: 189-453.
- Daza-Pérez, R. M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud* 22: 57-67.
- De Lara-Isassi, G. & S. Álvarez-Hernández. 1994. Actividad biológica de las macroalgas marinas mexicanas. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 45: 51-60.
- De Lara-Isassi, G., S. Álvarez-Hernández, R. C. Lozano & S. N. Hernández. 1999. Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiológica* 9: 159-169.
- Encarnación-Dimayuga, R. 1980. Nuevos proyectos. Investigación farmacognóstica de productos naturales. Informe general de labores. Centro de Investigaciones Biológicas de la Paz. 307 p.
- Enríquez-Andrade, R., G. Anaya-Reyna, J. C. Barrera-Guevara, M. A. Carvajal-Moreno, M. E. Martínez-Delgado, J. Vaca-Rodríguez & C. Valdés-Casillas. 2005. An analysis of critical areas for biodiversity conservation in the Gulf of California Region. *Ocean Coast Manage* 48: 31-50.
- Falch, B. S., G. M. Köning, O. Sticher & A. D. Wright. 1995. Studies on the glycolipid content of the cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *Planta Med.* 61: 540-543.
- Faulkner, D. J. 1984. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 1: 251-280.
- Faulkner, D. J. 1986. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 3: 1-4.
- Faulkner, D. J. 1990. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 7: 269-310.
- Faulkner, D. J. 1991. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 8: 97-147.

- Faulkner, D. J. 1992. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 9: 323-364.
- Faulkner, D. J. 1993. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 10: 497-539.
- Faulkner, D. J. 1996. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 13: 75-125.
- Faulkner, D. J. 1998. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 15: 113-158.
- Faulkner, D. J. 2000. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17: 7-55.
- Fenical, W. 1976. Chemical variation in a new bromochamigrene derivative from the red seaweed *Laurencia pacifica*. *Phytochemistry*. 15: 511-512.
- Freile-Pelegrín. Y. & J. L. Morales. 2004. Antibacterial activity in marine algae from Yucatan coast, Mexico. *Bot. Mar.* 47: 140-146.
- Garrett, E. C. & A. S. Serianni. 1990. (1-<sup>13</sup>C) alditols: elimination of magnetic equivalence in <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-n.m.r. spectra of symmetric compounds through (<sup>13</sup>C)-substitution. *Carbohydr. Res.* 208: 23-35.
- Gibbon, S., M. Oluwatuyi & G. W. Kaatz. 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 51: 13-17.
- Gin, N. A., N. K. Kil, H. C. Seon, B. S. Choon, L. Jehee, S. H. Moon, K. Y. In, H. L. Nam, H. J. Young, S. K. Jin, S. H. Min & J. J. You. 2007. Antioxidant activity of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated DNA damage. *Eur. Food Res. Techn.* 226: 71-79.
- Güven, K. C., A. Percot & E. Sezik. 2010. Alkaloids in marine algae. *Mar. Drugs*. 8, 269-284.
- Hall, G. B., S. J. Salipante & M. M. Barlow. 2003. Independent origins of subgroup B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub> and subgroup B<sub>3</sub> metallo-lactamases. *J. Mol. Evol.* 59: 133-141.
- Hawkes, G. E. & D. Lewis. 1984. <sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance spectra and conformation of alditols in deuterium oxide. *Perkins Trans 2*. 12: 2073-2078.

- Hay, M. E. & W. Fenical. 1996. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography* 9(1): 10-20.
- Hernández-Carmona, G., S. Carrillo-Domínguez, D. L. Arvizu-Higuera, Y. E. Rodríguez-Montesinos, J. I. Murillo-Álvarez, M. Muñoz-Ochoa & R. M. Castillo-Domínguez. 2009. Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* Areschoug. *J. Appl. Phycol.* 21: 607-616.
- Hernández-Carmona, G., M. M. Casas-Valdez, M. C. Fajardo-López, I. Sánchez-Rodríguez & Y. E. Rodríguez-Montesinos. 1990. Evaluación de *Sargassum* spp., en la Bahía de La Paz, B. C. S., México. *Invest. Mar. CICIMAR* 5: 11-18.
- Hernández, G., Y. E. Rodríguez, V. J. Torres, I. Sánchez & M. Vilchis. 1989. Evaluación de los mantos de *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta, Laminariales) en Baja California, México, I. Invierno 1985-1986. *Cienc. Mar.* 15: 1-27.
- Hodgson, L. M. 1984. Antimicrobial and antineoplastic activity in some south Florida seaweeds. *Bot. Mar.* 27: 387-390.
- Ioannou, E., C. Vagias & V. Roussis. 2010. Bioactive metabolites from marine algae. *BIO Environment.* 26: 68-72.
- Jormalainen, V., T. Honkanen, R. Koivikko, J. Eränen. 2003. Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? *Oikos* 103: 640-650.
- Kaatz, W. G. & M. S. Seo. 1995. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 39: 2650-2655.
- Kang, S. H., Y. H. Chung, Y. J. Kim, W. B. Son, A. H. Jung & S. J. Choi. 2004. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch. Pharmacol. Res.* 27: 194-198.
- Kijjoa, A & P. Sawangwong. 2004. Drugs and cosmetics from the Sea. *Marine Drugs* 2: 73-82.
- Krinsky, N. I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biol. Med.* 7: 617-635.

- Ktari, L. & M. Guyot. 1999. A cytotoxic oxysterol from the marine red sea alga *Padina pavonica* (L.) Thivy. *J. Appl. Phycol.* 11: 511-513.
- Kumar, A. K. & R. Rengasamy. 2000. Evaluation of antibacterial potential of seaweeds occurring along the coast of Tamil Nadu, India against the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Ishiyama) dye. *Bot. Mar.* 43: 409-415.
- Le Tutour, B., F. Benslimane, M. P. Gouleau, J. P. Gouygou, B. Saadan & F. Quemeneur. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongate*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* 10: 121-9.
- Maréchal, J. P., G. Culioli, C. Hellio, H. Thomas-Guyon, M. E. Callow, A. S. Clare & A. Ortalo-Magne. 2004. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus Amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313: 47-62.
- Markham, N. P. E., K. W. Klaychko, M. E. Johnson & A. A. Neyfakh. 1999. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemoth.* 43: 2404-2408.
- Maschek, J. A. & B. J. Baker. 2008. Chemical of algal secondary metabolism, 1-20. En: Amsler C. D. (Ed.). *Algal Chemical Ecology*. Springer, Berlin. 313 p.
- Mateo-Cid, L. E. & A. C. Mendoza-González. 1994. Estudio florístico de las algas bentónicas de Bahía Asunción, Baja California Sur, México. *Cienc. Mar.* 20: 41-64.
- Mateo-Cid, L. E., R. I. Sánchez, Y. E. Rodríguez-Montesinos & M. M. Casas-Valdez. 1993. Estudio florístico de las algas marinas bentónicas de Bahía Concepción, B. C. S., México. *Cienc. Mar.* 19: 41-60.

- Mayer, A. M. S., K. R. Gustaveson. 2003. Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int. J. Cancer* 105: 291-299.
- Mendoza-González, A. C. & L. E. Mateo-Cid. 1994. Algas marinas bentónicas de Todos Santos, B.C.S., México. *Acta Bot. Mex.* 29: 31-48.
- McCullagh, M. 2009. Natural products pharmaceuticals: The third generation. *Drugs Disc. World.* 2008/2009: 69-73.
- Molina-Salinas, G. M., M. C. Ramos-Guerra, J. Vargas-Villarreal, B. D. Mata-Cárdenas, P. Becerril-Montes & S. Said-Fernández. 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Med. Res.* 37: 45–49.
- Moon, M. K., V. T. Quang, E. Mendis, N. Rajapakse, K. J. Won, G. B. Hee, J. J. You & K. K. Se. 2006. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. *Life Sciences* 79: 1436-1443.
- Muñoz-Ochoa, M., J. I. Murillo-Álvarez, Y. E. Rodríguez-Montesinos, G. Hernández-Carmona, D. L. Arvizu-Higuera, J. Peralta-Cruz & M. J. Lizardi. 2009. Anticoagulant screening of marine alga from Mexico, and partial characterization of the active sulfated polysaccharide from *Eisenia arborea*. *CICIMAR Océánides* 24: 41-51.
- Nakai, M., N. Kageyama, K. Nakahara, W. Miki, 2006. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Mar. Biotech.* 8: 409-414.
- Nakayama, R., Y. Tamura, H. Kikuzaki & N. Nakatani. 1999. Antioxidant effect of the constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 644-653.
- Naqvi, S. W. A., S. Y. Kamat, L. Fernandes & C. V. G. Reddy. 1980. Screening of some marine plants from the Indian coast for biological activity. *Bot. Mar.* 24: 51-55.

- Navarrete-Vázquez, G., G. M. Molina-Salinas, Z. V. Duarte-Fajardo, J. Vargas-Villarreal, S. Estrada-Soto, F. González-Salazar, E. Hernández-Núñez and S. Said-Fernández. 2007. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorgan. Med Chem.* 15: 5502–5508.
- Newman, J. D. & M. G. Cragg. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70 (3): 461-477.
- Nozaki, H., Y. Fukuoka, A. Matsuo, O. Soga & M. Nakayama. 1980. Structure of sargassumlactam, a new  $\beta$ ,  $\gamma$ -unsaturated- $\gamma$ -lactam, from the marine alga *Sargassum kjellmanianum*. *Chem. Lett.* 9: 1453-1454.
- Núñez-López, P. A., M. M. Casas-Valdez, A. C. Mendoza-Gonzalez & L. E. Mateo-Cid. 1998. Flora ficológica de la Laguna San Ignacio, B. C. S. México. *Hidrobiológica* 8: 33-42.
- Omezzine, F, R. Haouala, A. El Ayeb & N. Boughanmi. 2009. Allelopathic and antifungal potentialities of *Padina pavonica* (L.) extract. *J. Plant Breed. Crops Sci.* 1: 094-203.
- Oranday, C. M, A. 1998. Componentes químicos de algas del estado de Tamaulipas y su aplicación farmacológica. Ph. D. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Pacheco-Ruiz, I. & J. A. Zertuche-González. 1996. The commercially valuable seaweeds of the Gulf of California. *Bot. Mar.* 39: 201-206.
- Padmini, S. R. P., 1998. Biological investigation of Indian Phaeophyceae 17. Seasonal variation of antibacterial activity of total sterols obtained from frozen samples of *Sargassum johnstonii* Setchell et Gardner. *Seaweed Res. Utilization* 20: 91-95.
- Parameswaran, P. S., C. G. Naik, B. Das & S. Y. Kamat. 1996. Constituents of the brown alga *Padina tetrastromatica* (Hauck). *Ind. J. Chem.* 35: 463-467.

- Parys, S., S. Kehraus, A. Krick, A. W. Glombitza, S. Carmeli, K. Klimo, C. Gerhäuser & M. G. König. 2010. In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* 71: 221-229.
- Pedroche, F. F. & G. A. Santiés. 2003. Ficología marina mexicana. Diversidad y problemática actual. *Hidrobiológica* 13: 23-32.
- Raveendran, T. V. & M. V. P. Limna. 2009. Natural product antifoulants. *Current Science* 97: 508-520.
- Reshef, V., E. Mizrachi, T. Marezki, C. Silberstein, S. Loya, A. Hizi & S. Carmeli. 1997. New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *J. Nat. Prod.* 60: 1251-1260.
- Rinehart, L. K., D. P. Shaw, S. L. Shield, B. J. Gloer, C. G. Harbour, E. S. M. Koker, D. Samain, E. R. Schwartz, A. A. Tymiak, L. D. Weller, T. G. Carter & H. G. M. Munro. 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure Appl. Chem.* 53: 795-817.
- Riosmena-Rodríguez, R. & L. Paul-Chávez. 1997. Sistemática y biogeografía de las macroalgas de la Bahía de La Paz, B. C. S., 59-82 p. En: Urbán, R. J. & M. R. Ramírez (Eds.). La Bahía de La Paz. Investigación y Conservación. UABCS-CICIMAR-SCRIPPS, La Paz. 345 p.
- Roden, G. I. 1964. Oceanographic and meteorological aspects of the Gulf of California. *Pacific Sci.* 12: 21-45.
- Rodrigues, E., T. Supriya & C. G. Naik. 2004. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309: 121-127.

- Rohmer, M., W. C. Kokke, W. Fenical, C. Djerassi. 1980. Isolation of two new C30 sterols, (24E)-24-N-propylidenecholesterol and 24  $\epsilon$ -N-propylcholesterol, from a cultured marine *Chrysophyte*. *Steroids*. 35: 219-31.
- Saito, H., H. Tomioka & T. Yoneyama. 1984. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 26: 164-169.
- Sánchez-Rodríguez, I., M. C. Fajardo-León & P. C. Oliveiro. 1989. Estudio florístico estacional de las algas en Bahía Magdalena, B. C. S., México. *Invest. Mar. CICIMAR* 4:35-48.
- Saravanakumar, D. E. M., P. I. Folb, B. W. Campbell & P. Smith. 2008. Antimycobacterial activity of the red alga *Polysiphonia virgata*. *Pharm. Biol.* 46: 254-260.
- Shaikh, W., M. Shameel, K. Usmanghani, V. U. Ahmad. 1991. Phytochemical examination of *Padina tetrastromatica* (Dictyotales, Phaeophyta). *Pak. J. Pharm. Sci.* 4: 55-61.
- Sharom, F. J. 1997. The P-Glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? *J. Membr. Biolog.* 160: 161-175.
- Sims, J. J, S. M. Donnell, V. J. Leary & H. G. Lacy. 1975. Antimicrobial agents from marine algae. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 7: 320-321.
- Sims, J. J., W. Fenical, R. M. Wing & P. Radlick. 1973. Marine natural products. IV. Prepacifenol, a halogenated epoxysesquiterpene and precursor to pacifenol from the red alga, *Laurencia filiformis*. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 972-972.
- Schmitt, T., E. Keller, S. Dietrich, P. Wuchter, A. D. Ho & G. Egerer. 2010. Trabectedin for metastatic soft tissue sarcoma: A retrospective single center analysis. *Marine Drugs* 8: 2647-2658.
- Stajner, D., N. Milic & B. J. Canadanovic. 1999. An investigation into the antioxidant activity of *Allium nutans* L. *Phytoth. Res.* 13: 333-336.

- Stern, J. L., A. E. Hagerman, P. D. Steinberg, F. C. Winter & J. A. Estes. 1996. A new assay for quantifying brown algal phlorotannins and comparisons to previous methods. *J. Chem. Ecol.* 22: 1273-1293.
- Tarakhovskaya, E. R., Y. I. Maslov & M. F. Shishova. 2007. Phytohormones in algae. *Russ. J. Plant. Physiol.* 54 (2): 163-170.
- Thornton, A. K. 2009. Trabectedin: the evidence for its place in therapy in the treatment of soft tissue sarcoma. *Core Evidence* 4: 191-198.
- Trejos, J. J., M. Šturdíková & E. Šturdík. 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca* 2: 63-74.
- Tsoukatou, M., C. Hellio, C. Vagias, C. Harvala, V. Roussis. 2002. Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Z. Naturforsch.* 57: 161-171.
- Valdez-Holguín, J. E., S. Álvarez-Borrego & C. C. Trees. 1999. Seasonal and spatial characterization of the Gulf of California phytoplankton photosynthetic parameters. *Cien. Mar.* 25: 445-467.
- Vallinayagam, K., R. Arumugam, R. Ragupathi Raja Kannan, G. Thirumaran & P. Anantharaman. 2009. Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam coastal regions. *Glob. J. Pharm.* 3: 50-52.
- Varterasian, L. M, A. P. Pemberton, K. Hulburd, H. D. Rodríguez, A. Murgó & M. A. Al-Katib. 2001. Phase II study of bryostatin 1 in patients with relapsed multiple mieloma. *Investig. New Drugs.* 19: 245-247.
- Wächter, A. G., G. S. Franzblau, G. Montenegro, J. J. Hoffmann, M. W. Maiese & B. N. Timmermann. 2001. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *J. Nat. Prod.* 64: 1463-1464.
- Yan, X., T. Nagata & X. Fan. 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant. Foods Hum. Nutrition* 52: 253-262.

Yoshie, S. Y., Y. P. Hsieh & T. Suzuki. 2003. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweed in Japan. *J. Tokyo Univ. Fish* 89: 1-6.