



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**POTENCIAL BIOACTIVO DE ALGAS DEL
GÉNERO *Codium*, RECOLECTADAS EN
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

PRESENTA

ALEJANDRO MARÍN ÁLVAREZ

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2013



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 6 del mes de Junio del 2013 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 BIOACTIVO DE ALGAS DEL GÉNERO *Codium*,
RECOLECTADAS EN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO"**

Presentada por el alumno:

MARÍN
Apellido paterno

ÁLVAREZ
materno

ALEJANDRO
nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	1	2
---	---	---	---	---	---	---

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

DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



**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 18 del mes Junio del año 2013
el (la) que suscribe MC. ALEJANDRO MARÍN ÁLVAREZ alumno(a) del
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro B091412 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 BIOACTIVO DE ALGAS DEL GÉNERO *Codium*
RECOLETADAS EN 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: alex3412@hotmail.com - jmurilloa@ipn.mx

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


MC. ALEJANDRO MARÍN ÁLVAREZ
nombre y firma

ÍNDICE.		Pág.
Índice.....		i
Agradecimientos y dedicatoria.....		iv
Lista de figuras.....		v
Lista de tablas.....		vi
Abreviaciones.....		vii
Glosario.....		ix
Resumen.....		x
Abstract.....		xi
1. Introducción.....		1
2. Antecedentes.....		2
2.1 Actividad antibacteriana.....		10
2.2 Actividad antifúngica.....		11
2.3. Actividad antiviral		12
2.4 Actividad anticáncer y citotóxica.		13
2.5 Actividad anticoagulante y antiangiogénica.....		14
2.6 Actividad de lectinas.....		16
3. Justificación.....		18
Hipótesis de Trabajo.....		19
4. Objetivos.....		19
4.1 Objetivo General.....		19
4.2 Objetivos particulares.....		19
5. Material y Métodos.....		20
5.1 Recolección del material biológico.....		20
5.2 Aislamiento y caracterización estructural de los principales productos naturales de las algas <i>Codium amplivesiculatum</i> , <i>C.</i> <i>simulans</i> , <i>C. cuneatum</i> y <i>C. fragile</i>		21
5.2.1 Obtención de extractos orgánicos.....		21
5.2.2 Fraccionamiento y aislamiento de compuestos.....		21
5.2.2.1 Fraccionamiento de <i>Codium amplivesiculatum</i>		21
5.2.2.2 Fraccionamiento de <i>Codium simulans</i>		23
5.2.2.3 Fraccionamiento de <i>Codium cuneatum</i>		26
5.2.2.4 Fraccionamiento de <i>Codium fragile</i>		28
5.3 Caracterización estructural de los productos naturales.....		28
5.4 Evaluación de la actividad antibacteriana.....		30
5.4.1 Evaluación de la actividad antituberculosis.....		30
5.5 Evaluación de la actividad antiviral.....		31
5.6 Evaluación citotóxica de las fracciones purificadas obtenidas de <i>C.</i> <i>amplivesiculatum</i>		31

6. Resultados.....	33
6.1 Aislamiento y purificación de los productos naturales.....	33
6.2.1 Productos naturales aislados de <i>Codium amplivesiculatum</i>	33
6.2.2 Productos naturales de <i>Codium simulans</i> , <i>C. cuneatum</i> y <i>C. fragile</i>	37
6.2.3 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	37
6.3 Evaluación de la actividad antituberculosis.....	44
6.4 Evaluación de la actividad antiviral.....	44
6.5 Evaluación citotóxica de compuestos puros obtenidos de <i>C. amplivesiculatum</i>	45
7. Discusión.....	46
7.1 Aislamiento y purificación de los productos naturales.....	46
7.1.1 Productos naturales aislados a partir de <i>C. amplivesiculatum</i> , <i>C. simulans</i> , <i>C. cuneatum</i> y <i>C. fragile</i>	46
7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de <i>Codium</i> spp. de B.C.S..	51
7.3 Evaluación de la actividad antituberculosis.....	53
7.4 Evaluación de la actividad antiviral.....	54
7.5 Evaluación citotóxica de las fracciones purificadas obtenidas de <i>C. amplivesiculatum</i>	55
8. Conclusiones.....	56
9. Referencias.....	58
Apéndice. Espectros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN e IR-ATR de compuestos aislados.....	71
A.1. Espectro de Infrarrojo del compuesto 1 (CC12F3) (ATR Perkin-Elmer).....	71
A.2. Espectro de RMN de ¹ H obtenido con el compuesto 1 (CC12F3): 1- Octadecanol . 400 MHz y en CDCl ₃ como solvente.....	71
A.3. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 2(a) e identificado como clerosterol	72
A.4. Espectro de IR del compuesto 2(a) identificado como clerosterol	72
A.5. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 5(a) (CC20F5) , identificado como posible codiósido.....	73
A.5.1. Espectro de RMN de ¹ H del rango con mayor cantidad de señales del compuesto 5(a) (CC20F5)	73
A.6. Espectro de RMN de ¹³ C del compuesto 5(a) (CC20F5) , identificado como posible codiósido.....	74
A.6.1. Espectro de RMN de ¹³ C del rango con mayor cantidad de señales del compuesto 5(a) (CC20F5)	74

A.7. Espectro de IR-ATR del compuesto 2(c) (clerosterol), F3C6PESL1F3 de <i>Codium cuneatum</i>	75
A.8. Espectro de IR-ATR, del compuesto 5(a) (CC20F5)	75
A.9. Espectro de IR-ATR del compuesto 5(c) (posible codiósido), F1C7PESL1F6 de <i>Codium cuneatum</i>	76
A.10. Espectro de IR-ATR del compuesto 5(f) (posible codiósido), F1C3PESL7 de <i>Codium fragile</i>	76
A.11. Espectro de IR-ATR del compuesto 2(s) (clerosterol), F2C5ESL1 de <i>Codium simulans</i>	77

“There is hope from the sea, but none from the grave” (Irish Proverb)

Agradecimientos:

Primordialmente agradezco el apoyo incondicional de mis compañeros de trabajo para la realización de la presente tesis: Iván, Liz, Dora, Mauricio y Gustavo.

También agradezco a la Dra. Gloria María Molina Salinas, por su apoyo en la utilización del Laboratorio de Farmacognosia en CIBN, del Instituto Mexicano del Seguro Social, a la Dra. Ma. Mercedes Cueto de la Universidad de Canarias España, por su apoyo en la definición del espectro de clerosterol, a la Dra. Nuri Pérez, al Dr. Javier Peralta Cruz del Departamento de Química Analítica de la facultad de Ciencias Biológicas del IPN, al Dr. Juan Salas Benito de la Escuela de Medicina y Homeopatía del IPN, por las facilidades para realizar los bioensayos antidengue y al Dr. Rafael Riosmena de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, por la identificación de las especies en estudio. Se agradece al Instituto Politécnico Nacional el financiamiento para la realización de esta tesis con los proyectos autorizados en el período correspondiente:

“Estudio de la actividad antioxidante y antibacteriana del alga café *Padina crispata*. Fase I. IPN-CICIMAR. La Paz, B.C.S.” SIP-20090558. Y Fase II. SIP-20101182.

“Estudio del Potencial de Aplicación Biomédica y Ambiental de Algas del Género *Sargassum* y *Enteromorpha* colectadas en el Golfo de California”.SIP: 20111014

“Obtención de compuestos con actividad anticoagulante a partir de alga *Eisenia arborea* y su caracterización estructural” SIP: 20120726.

“Cáncer de mama de próstata y cérvico uterino en México: Bases moleculares, diagnóstico y estrategias terapéuticas”. NODO:CICIMAR. Red de Biotecnología-IPN”. A la SEMS-COSDAC-DGETI por la beca-comisión otorgada.

Dedicatoria:

La presente tesis la dedico a mi familia, a los integrantes de mi comité tutorial y a todos mis amigos con un gran cariño.

Lista de figuras.		Pág.
Fig. 1	Zonas de recolecta de <i>Codium</i> spp.....	20
Fig. 2	Diagrama de fraccionamiento de <i>Codium amplivesiculatum</i>	23
Fig. 3	Diagrama de fraccionamiento de <i>Codium simulans</i>	25
Fig. 4	Diagrama de fraccionamiento de <i>Codium cuneatum</i>	27
Fig. 5	Diagrama de fraccionamiento de <i>Codium fragile</i>	29
Fig. 6	Estructura del clerosterol.....	36
Fig. 7	Comparación de los espectros de infrarrojo del diacilglucoglicérido 5 (a) , (CC20F5) obtenido de <i>C. amplivesiculatum</i> (arriba), el compuesto 5(s) , (F1C6ESL1, medio) y compuesto 5(s') (F1C7ESL1, abajo) aislados de <i>Codium simulans</i>	38
Fig. 8	Estructura química del estigmasterol (24-etil-5,22-colestadien-3- β -ol) (SDBS, 2003).....	48
Fig. 9	Espectro de IR-nujol de estigmasterol con diferencia de la orientación de metilos hacia la frecuencia entre 0 y 850 cm^{-1} (SDBS, 2003).....	48
Fig.10	Estructura química del codiósido A, B, C y D. (Saleem, 2000).....	50

Lista de tablas.		Pág.
Tabla 1	Productos naturales obtenidos a partir del género <i>Codium</i>	3
Tabla 2	Actividad antiviral de especies de <i>Codium</i>	12
Tabla 3	Actividad citotóxica de extractos y compuestos obtenidos de <i>Codium</i> spp	13
Tabla 4	Rendimiento porcentual en base seca de extracto etanólico y fase orgánica obtenidos de las especies de <i>Codium</i> estudiadas.....	33
Tabla 5	Comparación de las señales obtenidas por RMN de ¹ H del compuesto 1, con las reportadas en la base de datos SDBS (2003).....	34
Tabla 6	Comparación de señales de ¹ H-RMN (δ en ppm) del compuesto 2(a) con aquellas reportadas en la literatura para clerosterol.....	35
Tabla 7	Actividad antibacteriana de fracciones y productos puros de <i>Codium amplivesiculatum</i> determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).	39
Tabla 8	Actividad antibacteriana del extracto orgánico y fracciones de <i>Codium simulans</i> determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).....	40
Tabla 9	Actividad antibacteriana del extracto orgánico y fracciones de <i>Codium cuneatum</i> determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).....	41
Tabla 10	Actividad antibacteriana del extracto orgánico y fracciones de <i>Codium fragile</i> determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).....	42
Tabla 11	Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones activas vs. microorganismos ensayados del extracto orgánico de <i>Codium</i> spp.....	43
Tabla 12	Citotoxicidad de los compuestos 2(a) y 5(a) (CC13F2 y CC20F5) sobre la línea celular Huh-7 (derivada de hepatocitos humanos), los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular.....	44
Tabla 13	Actividad antiviral de clerosterol y el diacilglucoglicérido contra el virus del dengue DENV2 expresada como porcentaje de la infección.....	45
Tabla 14	Citotoxicidad* de clerosteroles (compuestos 2(a) y 2(a')) y el diacilglucoglicérido, en porcentaje de inhibición del crecimiento sobre líneas celulares cancerosas humanas. Probadas a 50 μ g mL ⁻¹	46

Abreviaciones

Å	Angstrom
AODC	Ácido oleico-dextrosa - catalasa
APTT	Tiempo de tromboplastina parcial activada
A-549	Línea celular de pulmón humano
ATCC-CCL-81	Clave de línea celular de células VERO
CAM	Concentración antiviral mínima antes de infección
CC13F2	Columna cromatográfica 13, fracción 2
CC15F3	Columna cromatográfica 15, fracción 3
CC20F5	Columna cromatográfica 20, fracción 3
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CMI	Concentración mínima inhibitoria
δ	Desplazamientos químicos en ppm del espectro de RMN
DENV 2	Virus de dengue cepa "New Guinea C"
DFP	Di-isopropil fluorofosfato
DHL	Deshidrogenasa láctica
DM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
$\text{EC}_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$	Concentración media de efectividad de una sustancia en un ensayo
ED_{50}	Reducción de la concentración del 50% de la absorbancia de la prueba de un compuesto, comparado con las células no tratadas
EtOH	Etanol
Gram ⁺	Tinción de bacterias que fijan el cristal violeta
Gram ⁻	Tinción de bacterias que fijan el color rojo de la safranina.
g mL^{-1}	Gramos por mililitro.
HCT-15	Cáncer de colon
HR37Rv (27294)	Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HPLC	Cromatografía de alta resolución (siglas del nombre en inglés)
HSV-1	Virus del herpes simplex tipo 1.
HSV-2	Virus del herpes simplex tipo 2.
HT-29	Línea celular de colon humano
Huh-7	Línea celular de hepatocitos humanos
Hxn	Hexano
$\text{IC}_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$	Inhibición media de crecimiento en microgramo por mililitro
IR-ATR	Espectrómetro de infrarrojo
KB	Línea celular de nasofaringe humana
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
P-388	Línea celular cancerosa de leucemia linfoide de ratón
PC-3	Línea celular tumoral de cáncer de próstata
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
ppm	Partes por millón
PT	Tiempo de protrombina
p/v	Disolución peso-volumen
PVX	Virus de la papa
RBL-2H3	Línea celular de leucemia
¹ H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón ¹ H
¹³ C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono ¹³ C
SFB	Suero fetal bovino
SI	Mejor índice selectivo
SINV	Virus sindbis, que causa enfermedad similar al dengue.
SRB	Sulforhodoamina B
%T	% de transmitancia
TLC	Cromatografía de capa fina
TT	Tiempo de trombina
ν en cm^{-1}	Frecuencia reflejadas por los átomos en el espectro de Infrarojo
VERO	Células adherentes y de morfología apitelial de <i>Cercopithecus aethiops</i> (mono verde africano adulto)

GLOSARIO

- Apoptosis.** Es una forma de muerte celular que está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.
- Antiangiogénico.** Agente químico o biológico que inhibe o reduce la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis).
- Células VERO.** Línea celular de cultivo de células de riñón de mono verde africano *Chlorocebus*.
- Chlorophyta.** División de algas verdes que incluye alrededor de 8200 especies de organismos eucariotas, en su mayoría acuáticos fotosintéticos.
- Citotóxico.** Es la cualidad de ser tóxico a células.
- Galactopiranosido.** Compuesto químico constituido por una molécula de carbohidrato y un grupo pirano, que puede tener diferentes átomos sustituidos.
- Clerosterol.** Esterol que se encuentra distribuido en plantas terrestres y que es de importancia quimiotaxonómica en la alga marina del género *Codium*.
- Coodiósido.** Nombre asignado a derivados del alga del género *Codium* que están costituidos por una molécula de carbohidrato, esterificado a cadenas de ácidos grasos.
- Herpes.** Es la enfermedad que causa una lesión cutánea inflamatoria que suele aparecer sobre todo en los labios y que se caracteriza por la aparición de pequeñas vesículas, causada por el virus *Herpes hominis*.
- Lectinas.** Son proteínas que se unen a carbohidratos con una elevada especificidad para cada tipo distinto de afinidad química en la unión de moléculas .
- Trombina.** Enzima del tipo de las peptidasas. Que forma parte del proceso de coagulación sanguínea. Ayuda a la degradación del fibrinógeno a monómeros de fibrina.
- Tromboplastina.** Proteína que se forma en el plasma por la combinación del factor tisular con los fosfolípidos de las membranas de las plaquetas y que participa en la coagulación de la sangre por medio de la conversión de protrombina a trombina.
- Protrombina.** Proteína del plasma sanguíneo, que forma parte del proceso de coagulación, mediante la reacción con la tromboplastina, enzima ubicada en el interior de los trombocitos, que se libera al romper la membrana celular de los trombocitos.

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana, antiviral y citotóxica de extractos y productos naturales de *Codium amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile* recolectadas en las costas de Baja California Sur, México. Se realizó el fraccionamiento de extractos etanólicos de algas del género *Codium*, recolectadas en tres localidades de Baja California Sur, México, por medio de columnas cromatográficas sílica gel 60 Å (230-400 de malla) utilizando mezclas de solventes de polaridad creciente. Se aislaron los compuestos: **1-octadecanol**, **clerosterol** y un posible **codiósido de *C. amplivesiculatum*** que corresponden al primer registro de estas sustancias en dicha alga. Se confirmó la presencia de clerosterol y de codiósidos en *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile* por comparación de las mismas señales obtenidas en espectros de IR-ATR. Las fracciones se sometieron a un ensayo de actividad antimicrobiana utilizando la técnica de difusión en agar con sensidiscos. Las bacterias de prueba fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42), *Escherichia coli* (ATCC- BAA-196) *Streptococcus pyogenes* (ATCC-BAA-946), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802), *V. alginolyticus* (ATCC-17749) y *Vibrio harveyi* (ATCC-14126). Se obtuvieron 7 fracciones activas contra *S. aureus*, 9 contra *S. pyogenes*, 9 contra *V. parahaemolyticus*, 6 contra *V. alginolyticus* y 12 contra *V. harveyi*. Ninguna de las fracciones mostró actividad contra *E. coli*. Una fracción de *C. amplivesiculatum* y una de *C. simulans* tuvieron una CMI de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ y el resto con una $\text{CMI} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$. De las fracciones de extracto orgánico de *C. amplivesiculatum* ensayadas contra *Mycobacterium tuberculosis*, solo una tuvo una CMI de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y las demás tuvieron una $\text{CMI} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Debido a los reportes previos se deduce que el compuesto activo anti-tuberculosis es el **1-octadecanol**. Se realizó un ensayo de citotoxicidad contra células de carcinoma humano con dos compuestos de clerosterol (CC13F2 y CC15F3) y el codiósido (CC20F5), resultando con débil inhibición del crecimiento celular. Con el clerosterol y el codiósido se realizaron pruebas anti-dengue, con resultados favorables para el codiósido obteniendo 73.8% de inhibición de la infección en la línea celular Huh-7 de hepatocitos humanos, con la técnica de multiplicidad de infección celular.

Palabras clave: *Codium*, antibacteriana, antiviral, citotoxico, bioactividad.

ABSTRACT.

Antibacterial, antiviral and cytotoxic activity was assessed of natural product and extracts of *Codium amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* and *C. fragile* collected in the coast of Baja California Sur, Mexico. Fractionation was performed ethanolic extracts of algae collected in three locations in Baja California Sur, México, through chromatographic columns of silica gel 60 Å (230-400 mesh) using solvent mixtures of increasing polarity). We isolated the pure compounds: **1-octadecanol**, **clerosterol** and a possible **codiósido** from *C. amplivesiculatum*. Correspond to the first record of these substances in this alga. We confirmed the presence of clerosterol and codiósidos in *C. simulans*, *C. cuneatum* and *C. fragile* by comparison of signals obtained in IR-ATR spectra. The fractions were subjected to an antimicrobial activity test using the agar diffusion method with sensitivity discs. The test bacteria were: *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42), *Escherichia coli* (ATCC- BAA-196) *Streptococcus pyogenes* (ATCC-BAA-946), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC- 17802), *V. alginolyticus* (ATCC-17749) and *V. harveyi* (ATCC-14126). Seven active fractions were obtained against *S. aureus*, 9 against *S. pyogenes*, 9 against *V. parahaemolyticus*, 6 against *V. alginolyticus* and 12 against *V.harveyi*. None of the fractions showed activity against *E. coli*. A fraction of *C. amplivesiculatum* and *C. simulans* had an MIC of 125 µg mL⁻¹ and the rest with an MIC > 250 µg mL⁻¹. From the organic extract fractions *C. amplivesiculatum* tested against *Mycobacterium tuberculosis*, only one had an MIC of 100 µg mL⁻¹ and the other had an MIC > 100 µg mL⁻¹. It follows that the anti-TB active compound is **1-octadecanol**, due to previous reports. Cytotoxicity assay was performed against human carcinoma cells with two compounds clerosterol (**CC13F2** and **CC15F3**) and codiósido (**CC20F5**), resulting in a weak inhibition of cell growth. Clerosterol and codiósido were performed anti-dengue tests, with favorable results for codiósido obtaining 73.8% inhibition of the infection in cell line Huh-7 human hepatocytes by the technique of multiple cellular infection.

Key Words: *Codium*, antibacterial, antiviral, cytotoxic, bioactivity.

1. INTRODUCCIÓN

En las tres últimas décadas, la investigación de productos naturales marinos, ha conducido al aislamiento de unos 35,000 compuestos, de los cuales un alto porcentaje de ellos son biológicamente activos (Kovganko & Kashkan, 1999; Matsubara *et al.*, 2003; Smit, 2004; Blunt *et al.*, 2003-2012), y algunos de ellos muestran una actividad sobresaliente, como el caso del diterpeno bromosphaerona aislado a partir del alga roja *Spaerococcus coronopifolius* que mostró una CMI = $0.047 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *Staphylococcus aureus* (Etahiri *et al.*, 2001). De acuerdo con lo reportado, las algas son una fuente importante de compuestos halogenados como los aislados a partir del género *Laurencia* que le confiere con notable actividad biológica (Masuda *et al.*, 1999). Por otro lado también se asume que los compuestos de naturaleza esterooidal, heterociclíca y fenólica contienen potenciales agentes antisépticos (Lincoln *et al.*, 1991). Tal es el caso de los depsipéptidos kahalalido A y F aislados a partir de *Bryopsis* sp. los cuales mostraron una potente actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*. Adicionalmente, el kahalalido F resultó ser un candidato muy prometedor para el tratamiento de cáncer pulmonar, de próstata y el síndrome de inmunodeficiencia humana (Smit, 2004).

La variedad de compuestos químicos aislados a partir del género *Codium* muestran un potencial de aplicación en el área biomédica, el cual se ve aumentado si se considera la posibilidad de ser modificados estructuralmente para incrementar su actividad biológica (Matsubara *et al.*, 2001; Kintzios & Barberaki, 2003; Matsubara *et al.*, 2003; Smit, 2004; Fusetani, 2010).

Las algas agrupadas en el género *Codium* pertenecen a la División: Chlorophyta; Clase: Bryopsidophyceae; Orden: Bryopsidales; Familia: Codiaceae. Actualmente, se reconocen 134 especies dentro del género y se caracterizan morfológicamente por ser de talo esponjoso regularmente de color verde oscuro con una gran variación morfológica de forma cilíndrica o de forma aplanada, irregularmente, puede desarrollar talos muy largos o cortos regularmente dicotómicos o ramificaciones o talos irregulares, globulares, petaloides, erectos o reptantes. *Codium* es de distribución mundial, llegando a considerar a *C. fragile* como especie invasora (Guiry & Guiry, 2013). En las costas de Baja California Sur, el género está representado por *C. amplivesiculatum*, *C. brandegeei*, *C.*

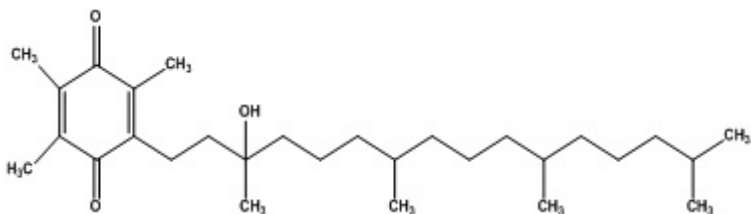
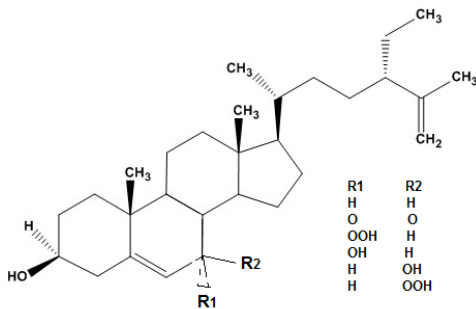
cuneatum y *C. fragile*. Con excepción de esta última, las demás especies no han sido estudiadas más allá de la actividad de sus extractos y composición polisacárida. Por lo que se consideró de interés explorar el potencial de estos organismos como fuente de compuestos de bajo peso molecular con actividad biológica.

2. ANTECEDENTES

Los metabolitos aislados a partir de algas del género *Codium* y su actividad biológica son presentados en la Tabla 1. Donde se puede observar que hasta ahora, el estudio de algas pertenecientes al género *Codium* ha derivado en el aislamiento de metabolitos esteroidales como el clerosterol, un esteroide cuya ocurrencia en el medio marino está restringido exclusivamente al género *Codium*, pero es común en muchas plantas terrestres. Los derivados oxigenados del clerosterol mostraron potente actividad contra líneas celulares de cáncer humano, mientras que los derivados glucosilados presentan interesante actividad antibacteriana (Romeo & Toscano, 1983; Anjaneyulu *et al.*, 1991; Akinin *et al.*, 1992; Sheu *et al.*, 1995; Alí *et al.*, 2002; Kapetanovic *et al.*, 2005; Shuai *et al.*, 2005; He *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha aislado, el α -tocoferol (De Sousa *et al.*, 2008), algunas quinonas preniladas con actividad antihipertensiva y fitotóxica (Alí *et al.*, 2001), así como glucoglicerolípidos (codiósidos A, B, C y D) derivados del transfitol, el cual resulta de significancia quimiotaxonómica en el género (Saleem, 2000). Por otro lado, en muestras de *C. fragile* se han identificado compuestos volátiles, tales como: ácido acrílico, benzaldehído, dimetilsulfuro, 2-furaldehído, furfural alcohol, geraniol, α -metilfurfural, sifonoxantina, sifoneína y terpinoleno, de los cuales se conocen muy bien sus propiedades antisépticas y citotoxicidad (Zhou *et al.*, 2011).

Tabla 1. Productos naturales obtenidos a partir del género *Codium*.

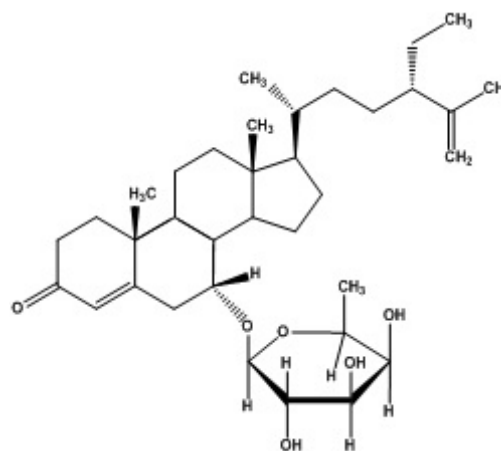
Especie	Compuesto/Actividad	Referencia
<p><i>Codium arabicum</i> <i>C. bursa</i>, <i>C. decorticatum</i>, <i>C. fragile</i>, <i>C. dichotomum</i>, <i>C. divaricatum</i></p>	<p>Clerosterol y derivados oxigenados/Anticáncer.</p>	<p>Sheu <i>et al.</i>, 1995; Shuai <i>et al.</i>, 2005; Romeo & Toscano, 1983; Aknin <i>et al.</i>, 1992; Kapetanovic <i>et al.</i>, 2005; He <i>et al.</i>, 2010.</p>
<p><i>C. iyengarii</i></p>	<p>α-tocoferol-hidroquinonas/ Antihipertensivo y fitotóxico</p>	<p>Alí <i>et al.</i>, 2001</p>



C. iyengarii

Iyengarósido-A/Antibacterial

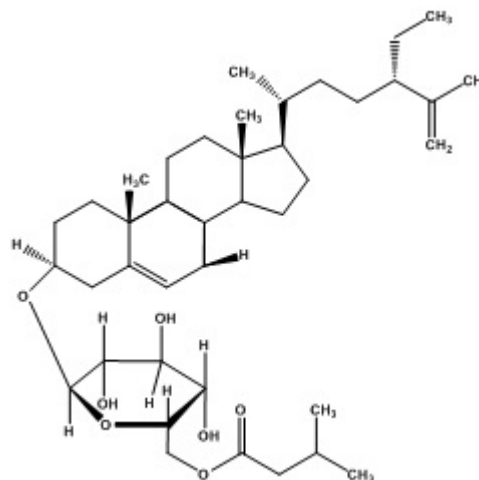
Alí *et al.*, 2002



C. iyengarii

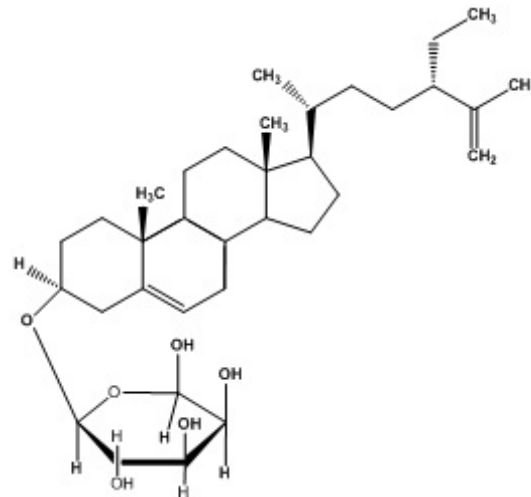
Iyengarósido-B

Alí *et al.*, 2002



C. iyengarii,
C. dwarkense, *C. divaricatum*

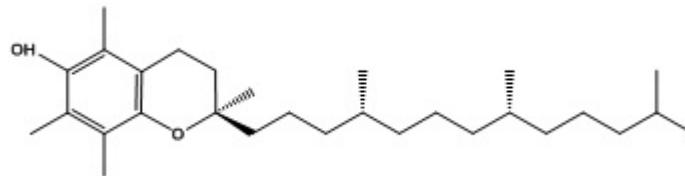
Galactósido de clerosterol/Antibacterial



Ahmad *et al.* 1993;
Alí *et al.*, 2002; Ivanchina *et al.*, 2011; He *et al.*, 2010

C. decorticatum

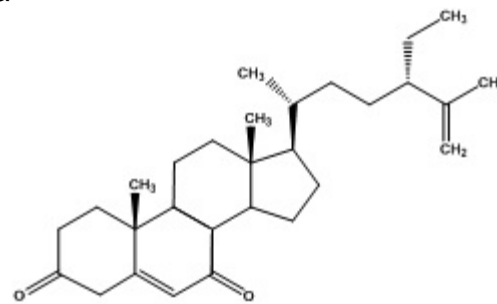
α -Tocoferol/Antioxidante



De Sousa *et al.*, 2008

C. iyengarii

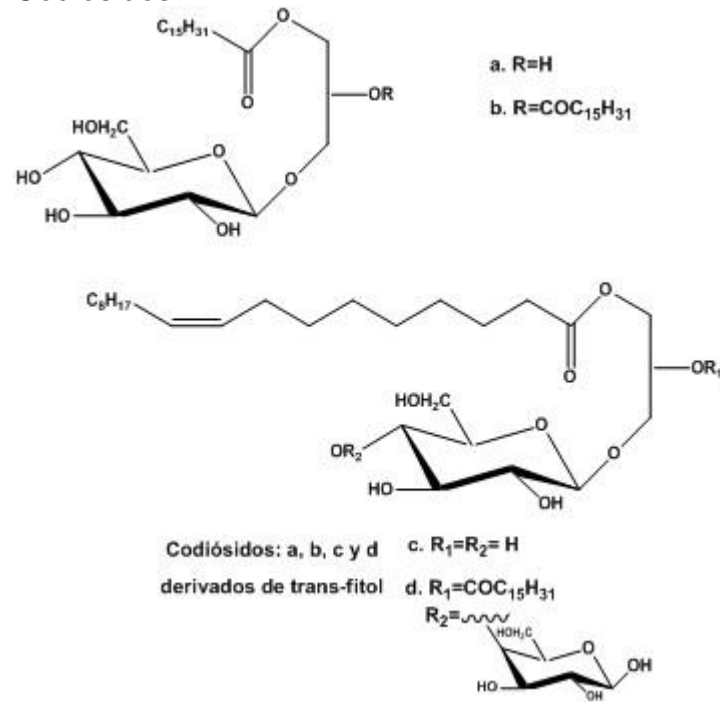
Iyengadiona



Alí *et al.*, 2002; Blunt *et al.*,
2004

C. iyengarii

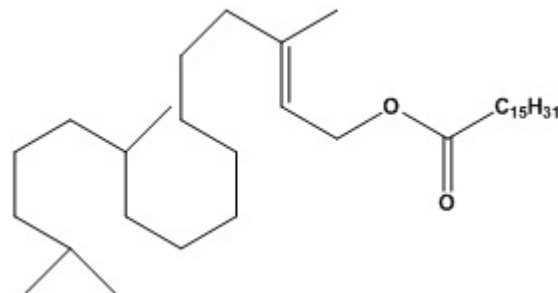
Codiósidos



Alí *et al.*, 2001; Blunt *et al.*, 2003

C. iyengarii

Codioéster

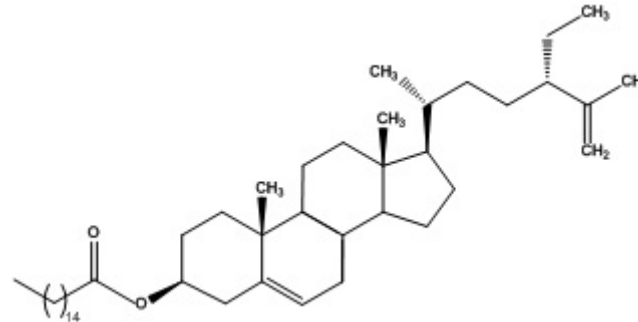


Alí *et al.*, 2001; Blunt *et al.*, 2003

C. fragile

Palmitil-clerosterol

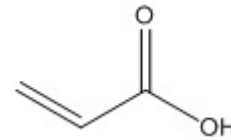
Blunt *et al.*, 2007



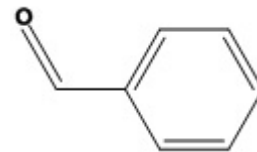
C. fragile

Ácido acrílico

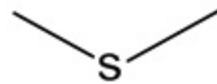
Zhou *et al.*, 2011



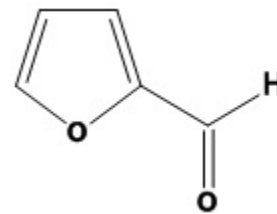
Benzaldehído



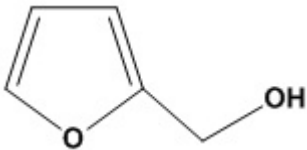
Dimetilsulfuro



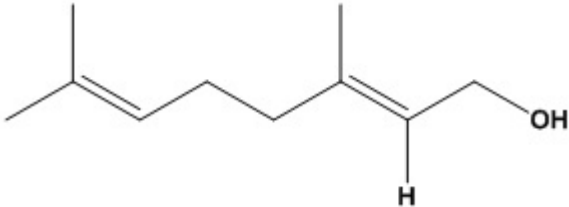
2-Furaldehído



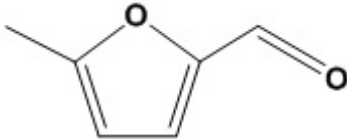
Furfuril alcohol



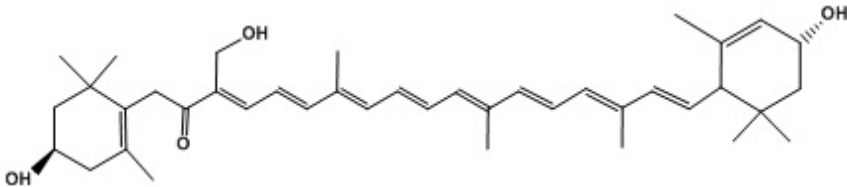
Geraniol



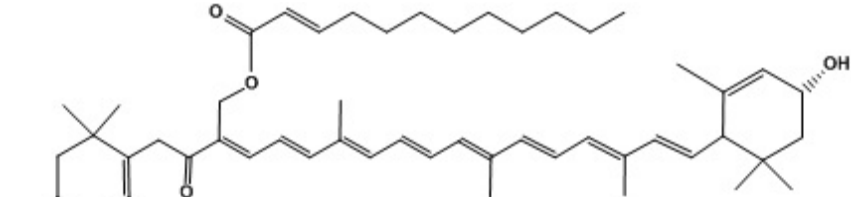
α -Metilfurfural



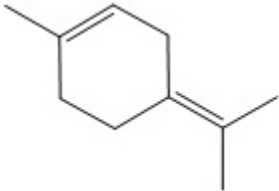
Sifonoxantina



Sifoneína



Terpinoleno



Además de los compuestos de bajo peso molecular, se han aislado proteoglucanos y polisacáridos sulfatados con propiedades anticoagulantes (Matsubara *et al.*, 2000). Por último, se ha reportado el aislamiento de compuestos tipo lectinas, con importantes funciones a nivel de membrana celular, causantes de aglutinamiento (Stamps *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1995; Cisar *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Nagano, 2007).

Los compuestos aislados de *Codium* son del tipo esteroidal, glucósidos esteroidales, acilglucósidos, polisacáridos sulfatados, carotenoides, benzaldehído, derivados furfurales y ésteres de fitol, con diferentes actividades a nivel membrana celular (Kovganko & Kashkan, 1999). Los glucósidos esteroidales tienen diferentes usos terapéuticos en fallas y arritmias cardíacas, además de tener un potencial de uso en terapias contra el cáncer. Los glucósidos obtenidos de *Codium* tienen diversas actividades biológicas, como antibacteriana, antiviral, antitumoral y citotóxico (Ivanchina *et al.*, 2011), así como el clerosterol y el compuesto loliolido obtenidos de *Codium divaricatum*, que por su estructura química pudieran evaluarse en otro tipo de bioensayo (He *et al.* 2010; He *et al.* 2006; Zhou *et al.*, 2011).

2.1 Actividad antibacteriana

Se han reportado numerosos casos de actividad antibacteriana dentro del género *Codium*, tal es el caso de *C. shamelli*, que resultó ser activo contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aureoginosa*, con halos de inhibición entre 12 y 13 mm, a una concentración de 2.0 mg mL⁻¹ (Rizvi & Shameel, 2005).

El compuesto iyengarosido-A de *C. iyengarii*, mostró moderada actividad antibacteriana a una concentración de 0.39 µg mL⁻¹ en dimetilsulfóxido (DMSO), contra *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus* y el galactósido de clerosterol de esta misma especie, mostró actividad contra *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (Alí *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los extractos de algas marinas de Baja California Sur, tienen una variedad de actividades antimicrobianas y citotóxicas contra bacterias que representan altas morbilidades a nivel nacional, como son *Mycobacterium tuberculosis* y *E. coli*, además de demostrar la citotoxicidad de

células VERO (Muñoz *et al.*, 2010a). Dentro de los primeros experimentos contra bacterias utilizando *Codium amplivesiculatum*, *C. cuneatum* y *C. simulans*, se encuentran los de Muñoz y colaboradores (2010b), quienes obtuvieron incremento en los halos de inhibición contra las bacterias resistentes a antibióticos de *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*, combinando la concentración mínima inhibitoria de antibiótico a la cual resiste el microorganismo con extractos etanólicos de estas algas, concluyendo que los extractos contribuyen a la inhibición del mecanismo de resistencia bacteriana.

Morales y colaboradores (2006), determinaron la actividad biológica de seis especies de macroalgas de las costas de Yucatán, México, dentro de las cuales se encontraba *C. decorticatum*, obteniendo concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) para *Staphylococcus aureus* de 1.56 mg mL⁻¹ y 12.5 mg mL⁻¹ respectivamente y para *Bacillus subtilis* de 0.78 mg mL⁻¹ y 13.13 mg mL⁻¹, respectivamente. Sunilson y colaboradores (2009), describen la presencia de aminoácidos, carbohidratos, saponinas, fitosteroles alcaloides y glucósidos de *C. decorticatum*, resaltando buena actividad antibacterial contra *Streptococcus pneumoniae* y *Klebsiela pneumoniae* a concentraciones de 25, 50 y 100 mg mL⁻¹ de extractos de éter de petróleo, cloroformo y metanol, tomando a gentamicina y ampicilina como controles, a una concentración de 30 mg mL⁻¹.

2.2 Actividad antifúngica

Se ha reportado la actividad antifúngica de extractos metanólicos de *C. iyengarii*, con un promedio de 50% de inhibición con respecto a un control de miconazol, contra hongos con actividad patógena en humanos: *Aspergillus niger*, *Pseudoallescheria boydii* y *Trichophyton schoenleinii*, hongos patógenos de animales: *Microsporum canis* y *Trichophyton simii* y un hongo patógeno de plantas: *Fusarium solani*, resultados considerados moderados por el grado de inhibición (Rizvi & Shameel, 2005) y actividad efectiva de extracto metanólico de *C. intertextum* contra levaduras, especie localizada en la zona de las Canarias, España (Febles *et al.*, 1995).

2.3 Actividad antiviral

Entre los recursos marinos correspondientes a las especies de *Codium*, se mencionan a *C. adhaerens*, *C. fragile*, *C. latum*, *C. decorticatum* y *C. spongiosum* como fuente de agentes antivirales derivados de galactanos y polisacáridos sulfatados, contra el virus del herpes simplex (HSV-1), del herpes simplex tipo 2 (HSV-2), el virus de la papa X (PVX) y sindbis (SINV) (Hudson *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Pardee *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2011; Thanh *et al.*, 2011). En la Tabla 2 se muestran concentraciones y efectos de inhibición de virus, demostrando efectos similares para algunos casos, independientes de la zona geográfica de recolecta de las algas.

El mecanismo de acción de los polisacáridos sulfatados son debido a la formación de complejos que bloquean la interacción virus-células, por lo que se hacen correlaciones entre los parámetros de la estructura mínima, iónica e hidrofóbica y la correspondiente actividad antiviral (Damonte *et al.*, 2004).

Tabla 2. Actividad antiviral de especies de *Codium*

	Tipo de virus					Referencia
	HSV-1	HSV-2	PVX	SINV	IFV-A	
<i>Codium fragile</i>	-	-	-	IC ₅₀ =62.5 µg mL ⁻¹	-	Hudson <i>et al.</i> , 1999
<i>Codium latum</i>	IC ₅₀ =6.9 µg mL ⁻¹	-	-	-	-	Lee <i>et al.</i> , 2004
<i>Codium fragile</i>	-	-	93% _{inh} a 10 µg mL ⁻¹	-	-	Pardee <i>et al.</i> , 2004
<i>Codium fragile</i>	-	IC ₅₀ =4.7 µg mL ⁻¹	-	-	IC ₅₀ >1.0 mg mL ⁻¹	Ohta <i>et al.</i> , 2009
<i>Codium decorticatum</i>	99% _{inh} a 200 µg mL ⁻¹	0%	-	-	-	Soares <i>et al.</i> , 2011
<i>Codium spongiosum</i>	55.3% _{inh} a 50 µg mL ⁻¹	55.3% _{inh} a 50 µg mL ⁻¹	-	-	-	Soares <i>et al.</i> , 2011

HSV-1 y HSV-2 (virus de herpes simplex tipo1 y 2), PVX (Virus de la papa X), SINV (virus Sinbis), IFV-A (Virus de influenza).

2.4 Actividad anticáncer y citotóxica

La citotoxicidad es la cualidad de una sustancia natural o sintética, tóxica a las células, provocándoles necrosis y lisis. El porcentaje de contribución de los productos naturales que han generado compuestos químicos con actividad citotóxica en ensayos contra cáncer, es del 62 % en el período comprendido entre 1981 y 2002, con diferentes modificaciones a nivel síntesis química, para investigar efectos específicos sobre células cancerosas (Newman *et al.*, 2003). Kintzios & Barberaki (2003), reportaron actividad de extractos de 22 especies de clorofitas de origen marino contra células cancerosas. Solo *Codium pugniformis*, se mostró citotóxico contra tumores de cáncer Ehrlich ascites y contra sarcoma-180 (Nakazawa *et al.*, 1976).

La Tabla 3 enlista las especies del género *Codium* y compuestos aislados con actividad antitumoral y citotóxica, donde puede verse que el extracto metanólico de *Codium fragile* mostró inhibición de células de leucemia RBL-2H3 a una concentración de 200 µg mL⁻¹ (Kimiya *et al.*, 2008).

Tabla 3. Actividad citotóxica de extractos y compuestos obtenidos de *Codium* spp.

Alga	Sustancia	Actividad citotóxica	Referencia
<i>Codium fragile</i>	Clerosterol	Muerte por apoptosis de células de melanoma humano (A2058).	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Codium decorticatum</i>	Extracto metanólico	Citotóxico	Khan <i>et al.</i> , 2012
<i>Codium fragile</i>	Extracto metanólico	Inhibición de la degranulación de células de leucemia RBL-2H3.	Kimiya <i>et al.</i> , 2008
<i>Codium contractum</i>	Extracto acuoso	Citotóxico vs. células tumorales de leucemia promielocítica, HL-60	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Codium fragile</i>	Extracto acuoso	Citotóxico vs. células de cáncer de colon de ratón, CT-26	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Codium arabicum</i>	Clerosterol oxigenado	Citotóxico contra líneas celulares de cáncer humano.	Sheu <i>et al.</i> , 1995
<i>Codium tomentosum</i>	Extracto metanólico	Antitumoral en papas	El-Masry <i>et al.</i> , 1995
<i>Codium pugniformis</i>	Extracto acuoso	Citotóxico contra tumores de cáncer Ehrlich ascites y contra sarcoma-180.	Nakazawa <i>et al.</i> , 1976

El compuesto identificado como clerosterol de *Codium arabicum* ha sido probado contra varias líneas celulares cancerosas de leucemia linfoide de ratón (P-388), cáncer nasofaríngeo humano (KB), cáncer de pulmón humano (A-549) y cáncer de colon humano (HT-29), mostrando la mayor actividad contra las líneas celulares A-549 ($ED_{50} = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$) y P-388 ($ED_{50} = 1.7 \mu\text{g mL}^{-1}$). No hubo actividad contra las líneas celulares KB y HT-29 (Sheu *et al.*, 1995). El clerosterol obtenido de *Codium fragile*, inhibió el crecimiento de células de melanoma humano (A2058), induciendo muerte por apoptosis a una IC_{50} de $150 \mu\text{M}$ (Kim *et al.*, 2013)

2.5 Actividad anticoagulante y antiangiogénica

Los compuestos con actividad anticoagulante obtenidos a partir de especies de *Codium* son proteoglucanos y polisacáridos sulfatados, cuyas propiedades han sido comparadas con las de la heparina. El compuesto anticoagulante aislado de *C. pungiformis* mostró ser un proteoglucano compuesto por glucosa, arabinosa y galactosa altamente sulfatada. El proteoglucano aumentó el tiempo normal de trombina, mientras que no afectó el tiempo normal de protrombina (Matsubara *et al.*, 2000).

De manera similar, a partir de *C. cylindricum* se obtuvo un polisacárido con actividad anticoagulante caracterizado por contener galactosa sulfatada y cantidades menores de glucosa. Al compararlo con la heparina, el galactósido no mostró ningún efecto frente al ensayo de tiempo de protrombina, mientras que en los ensayos de tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de trombina resultaron prolongados (Matsubara *et al.*, 2001). En contraste, *C. fragile* además de galactanos sulfatados, también contiene residuos de arabinosa en forma de arabinogalactanos sulfatados (Bilan *et al.*, 2007).

La identificación y purificación de los polisacáridos sulfatados de *Codium fragile*, ha generado controversias en cuanto al nivel de actividad anticoagulante y el grado de agregación de plaquetas de las especies de *Codium* en experimentación, debido a la variabilidad de los polisacáridos sulfatados presentes con diferentes cantidades de iones de calcio y la presencia de glucoproteínas (Ciancia *et al.*, 2007).

A partir de *Codium dwarkense* se aislaron un arabinogalactano y otro polisacárido rico en arabinosa sulfatada. El último mostró una actividad

anticoagulante más potente que el arabinogalactano (Siddantha *et al.*,1999), aunque cuando estos compuestos fueron obtenidos simultáneamente de *C. dwarkense* y *C. tomentosum* por purificación de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel, las actividades anticoagulantes fueron diferentes (Shanmugam *et al.*, 2001). La variación observada en la actividad anticoagulante llevó a considerar las diferencias estructurales de los polisacáridos, observándose que los polisacáridos más activos eran aquellos con mayor contenido de arabinosa (Siddhanta *et al.*, 1999; Shanmugam *et al.*, 2002). En el mismo sentido, se han reportado que compuestos del tipo galactanos sulfatados de *Codium isthmocladum* (Blunt *et al.*, 2010), cuya aplicación ha tomado relevancia en la detección de nuevos anticoagulantes, presentan una composición química principal, que corresponde a la unión de residuos 3-β-D-galactopiranosas, que se encuentran sulfatados principalmente en la posición 4 y ocasionalmente en la posición 6. En menores cantidades hay uniones en la posición 6-β-D-galactopiranosas y la presencia de grupos piruvato, formando residuos cetales como el 3,4-O-(1'-carboxi)-etilideno-β-D-galactosa (Farías *et al.*, 2008).

La angiogénesis tiene una importante función en los procesos fisiológicos, involucrada en varias condiciones patológicas como crecimiento de tumores y metástasis, arterioesclerosis y retinopatía diabética. Al inhibir la angiogénesis, se detiene el crecimiento de tumores y la metástasis (Folkman, 1995). Entre los compuestos antiangiogénicos se encuentran los polisacáridos sulfatados de las algas pardas, conocidos por su funcionamiento como potentes anticoagulantes. Las algas rojas y pardas son la principal fuente de polisacáridos sulfatados y en menor proporción las algas verdes (Hoffman *et al.*, 1996). El primer reporte con evidencia del efecto antiangiogénico de un galactano sulfatado aislado de la alga verde *C. cylindricum*, es el presentado por Matsubara y colaboradores (2003), donde se suprimió la formación de micro vasos sanguíneos, en un cultivo celular de matriz libre de suero *ex vivo*, utilizando el modelo de anillo aórtico de rata.

La caracterización estructural de los compuestos con propiedades antiangiogénicas, ha llevado a definir enzimas con propiedades fibrinolíticas, como la aislada de *Codium latum*, similar a la tripsina, llamada *C. latum proteasa* (CLP), la cual tiene una actividad máxima a pH 10 y es completamente inhibida por di-isopropil fluorofosfato (DFP) (Matsubara *et al.*,1999). Kadokami y

colaboradores (1990), aislaron enzimas con un peso molecular de 38 000 y otra de 39 000, determinadas por filtración de gel por HPLC, con un rango óptimo de actividad entre un pH de 7 y 9, respectivamente y con una actividad 30 veces mayor hacia Boc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA, cuando se comparó con tripsina. Se inhibió con DFP y parcialmente con fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), benzamidina, leupeptina y antipaina (Kadokami *et al.*, 1990).

2.6 Actividad de lectinas

Las lectinas se han definido como compuestos de origen no immune que tienen una estructura polisacárida enlazada a proteínas, que aglutinan células y precipitan polisacáridos o glucoproteínas. Se utilizan en la detección, identificación y evaluación funcional de carbohidratos y como marcadores en varios procesos bioquímicos en medicina (Hoekstra *et al.*, 1985; Sharon & Lis, 2007). Las principales aplicaciones corresponden a la detección, aislamiento y estudios estructurales de glucoproteínas, investigación de carbohidratos en las células y organelos subcelulares, estudios de glucosilación de proteínas, mapeo de trayectorias neuronales, separación e identificación celular, estimulación mitogénica de linfocitos y selección de mutantes lectino-resistentes (Goldstein & Poretz, 1986).

De *Codium fragile* tomentosoides se ha obtenido una lectina específica N-acetil-alfa-D-galactosamina acoplada a oro coloidal, que llegó a nivel comercial como reactivo histoquímico y cuyas amplias aplicaciones se han dado en modelos para determinar conjugados que influyen en procesos de aglutinación sanguínea humana, así como en estudios de superficie celular (Griffin *et al.*, 1995). El sitio específico de combinación de las lectinas de *C. fragile*, reconoce exclusivamente secuencias GalNAc α 1 cadenas determinantes de carbohidratos, lo que da a dichas lectinas un uso como reactivo químico comercial, para detectar específicamente las cadenas de secuencias GalNAc α 1, GalNAc α 1-3(LFuc α 1-2)Gal(A_b), Gal β 1-3GalNAc (T) y GalNAc α 1-Ser/Thr (Tn) (Wu *et al.*, 1995), demostrándose la inhibición para las secuencias de lectinas Tn en combinación con dendrímeros, cuya característica es expresarse por la mayoría de tumores malignos, 90% en los carcinomas humanos, con expresión en más del 70% de carcinomas de pulmón, colon y estómago, por lo que al hacer reaccionar las

secuencias Tn y formar glucopéptidos conjugados complejos, se pueden desarrollar vacunas contra la formación de tumores y alergias, ya que se encuentran directamente relacionados con respecto a las respuestas inmunes celulares (Vepřeck *et al.*, 2006). Las lectinas obtenidas de *Codium fragile*, var. *tomentosoides* (CFT), han sido purificadas y caracterizadas por precipitación cuantitativa (QPA) e inhibición por ensayo de enlace lectina-enzima, obteniendo una N-acetilgalactosamina-específica, la cual reacciona con diferentes glucoproteínas aisladas de hámster y ovejas y definiendo sitios de interacción específicos (Wu *et al.*, 1997). Las lectinas purificadas de *C. fragile*, subespecie *atlanticum*, han reaccionado con el grupo sanguíneo A, llamado Apae. Este tipo sanguíneo no tuvo reacción con otro tipo de lectinas anti-A (Stamps *et al.*, 1987). Un compuesto llamado tomentina fue aislado de *C. tomentosum*, la cual es una lectina N-acetilglucosamina-específica compuesta por treonina, valina y glicina, con 39% de carbohidratos (Fábregas *et al.*, 1988). *Codium fragile* aglutinó oocitos de *Cryptosporidium parvum*, con una concentración de 0.5 mg mL⁻¹ en 60 minutos, indicando con esto que son altamente reactivos a las lectinas N-acetilgalactosamina, por lo que esta sustancia ayuda a los oocitos a unirse a las células huésped (Stein *et al.*, 2006).

La aplicación de lectinas de *C. fragile* en larvas de insectos de *Diabrotica undecimpunctata howardi*, fue tóxico a una concentración del 2% aplicado tópicamente en la dieta artificial (Czapla & Lang, 1990). Las lectinas de *C. fragile* también causan aglutinación en cepas de *Salmonella typhimurium*, utilizando la inmovilización de estas lectinas en columna de cromatografía de afinidad sobre agarosa, adsorbiendo bacterias con elución subsecuente con N-acetilgalactosamina (Patchett *et al.*, 1991). La aplicación de las lectinas de *C. fragile* del tipo Gal β →3GalNAc, son de los más potentes inhibidores de la co-agregación microbiana en la colonización de la dentadura humana, ya que las lectinas GalNAc-sensitivas de las bacterias, se ven inhibidas por las lectinas de *C. fragile* y ya no se realiza la co-agregación entre grupos bacterianos (Cisar *et al.*, 1995).

Otra especie de la cual se han aislado lectinas es *Codium giraffa*, la cual es una especie endémica de México, con un peso molecular de 17,800 y un punto isoeléctrico de 6.4. Su actividad fue inhibida con bajas concentraciones de N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina (Álvarez *et al.*, 1999).

Las lectinas de *C. fragile*, ya como reactivo comercial, se han utilizado en la determinación del grado de combinación que pueden tener con sustancias como fluoropolímeros super-ramificados combinados con polietilenglicol (HBFP-PEG), determinando la mejor adhesión por microscopía por fluorescencia y evaluando el mejor efecto antiincrustante de zoosporas de *Ulva* en diferentes superficies (Gudipati *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

La identificación de metabolitos secundarios de las algas marinas, ha tenido objetivos científicos orientadas a aspectos tanto ecológicos (Blunt *et al.*, 2006; Amsler, 2008), como de aplicación farmacéutica en función de la actividad biológica presentada, con énfasis en el combate al problema de la multirresistencia bacteriana (Barret & Barret, 2003), antivirales (Thanh *et al.*, 2011), anticoagulantes (Hahnenberger & Jakobson, 1991; Hoffman *et al.*, 1996) y a la identificación de sustancias anticancerígenas (Bakuni & Rawat, 2005; Jiang *et al.*, 2008), como las de la familia de los kahalalidos, pasando las etapas clínicas I y II contra el cáncer de próstata (Roussis *et al.*, 2004; Blunt *et al.*, 2012).

El problema de la resistencia bacteriana a fármacos tradicionales para el combate de enfermedades, ha generado que se tome en cuenta la gran diversidad de metabolitos secundarios que se generan por los organismos marinos, debido a que han demostrado actividades biológicas aplicables en el tratamiento de enfermedades como el cáncer y tuberculosis (Blunt *et al.* 2012 y anteriores).

El número de compuestos aislados a partir de clorofitas marinas hasta el año 2012, corresponde a 187 compuestos caracterizados químicamente, de los cuáles el género *Codium* contribuyó con 17 compuestos sintetizados por la ruta de los isoprenoides, sin considerar los compuestos que contienen polisacáridos sulfatados (McClintock & Baker, 2001; Folmer *et al.*, 2010; Blunt, *et al.*, 2011 y anteriores).

El género *Codium*, ha tomado importancia al ser fuente de compuestos con actividad antibacteriana (Alí *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2010b; Morales *et al.*, 2006; Sunilson *et al.*, 2009), antifúngica (Febles *et al.*, 1995; Rizvi & Shameel, 2005), antiviral (Kim *et al.*, 1997; Hudson *et al.*, 1999; Damonte *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Pardee *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2011; Thanh *et al.*,

2011), citotóxica (Nakazawa *et al.*, 1976; El-Masry *et al.*, 1995; Sheu *et al.*, 1995; Kim *et al.* 2006, 2008; Kimiya *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2012), anticoagulante y antiangiogénico (Kadokami *et al.*, 1990; Folkman, 1995; Siddantha *et al.*, 1999; Matsubara *et al.*, 1999, 2000, 2001; Shanmugam *et al.*, 2001; Shanmugam *et al.*, 2002; Nika *et al.*, 2003; Matsubara *et al.*, 2003; Bilan *et al.*, 2006, 2007; Ciancia *et al.*, 2007; Farías *et al.*, 2008; Blunt *et al.*, 2010) y de lectinas selectivas sobre procesos de transferencia a través de la membrana celular (Stamps *et al.*, 1987; Fábregas *et al.*, 1988; Czaplá & Lang, 1990; Patchett *et al.*, 1991; Griffin *et al.*, 1995; Cisar *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995, 1997; Álvarez *et al.*, 1999; Gudipati *et al.*, 2005; Vepřeck *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2006). Con la obtención de compuestos bioactivos derivados de especies de *Codium* seleccionadas de Baja California Sur, México, se pretende aumentar el conocimiento sobre la distribución de estos metabolitos en el ambiente marino y el potencial bioactivo que pueden presentar.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los extractos, fracciones y metabolitos secundarios de *Codium amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile* de Bahía Magdalena, de San Juan de la Costa y de Bahía Tortugas, poseen actividad antimicrobiana contra cepas resistentes, antiviral y citotóxica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Detectar y evaluar el potencial bioactivo de *C. amplivesiculatum*, *Codium simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile* de algas recolectadas en las costas de Baja California Sur, México, a partir de extractos y compuestos aislados.

4.2 Objetivos particulares

1. Detectar, evaluar y caracterizar estructuralmente los principales productos naturales de las algas *C. amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile*.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos, fracciones y productos naturales puros obtenidos de *C. amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile*.

3. Evaluar la actividad citotóxica y antiviral de productos naturales puros de *C. amplivesiculatum*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Recolección del material biológico

El material biológico se recolectó en la zona de San Juan de la Costa (Verano de 2010), Bahía Magdalena (Verano de 2006) y Bahía Tortugas, Baja California Sur (Verano de 2006 y 2009, Figura 1). El material biológico previamente etiquetado se conservó en hielo para su traslado al Laboratorio de Química de Algas Marinas del CICIMAR-IPN. Posteriormente el material se secó a temperatura ambiente y se conservó a -20°C hasta su procesamiento químico y biológico.

Las especies de *Codium* recolectadas, fueron identificadas como: *C. fragile*, de Bahía Tortugas; *C. amplivesiculatum*, de Bahía Magdalena; *C. cuneatum* y *C. simulans* de San Juan de la Costa, Baja California Sur.

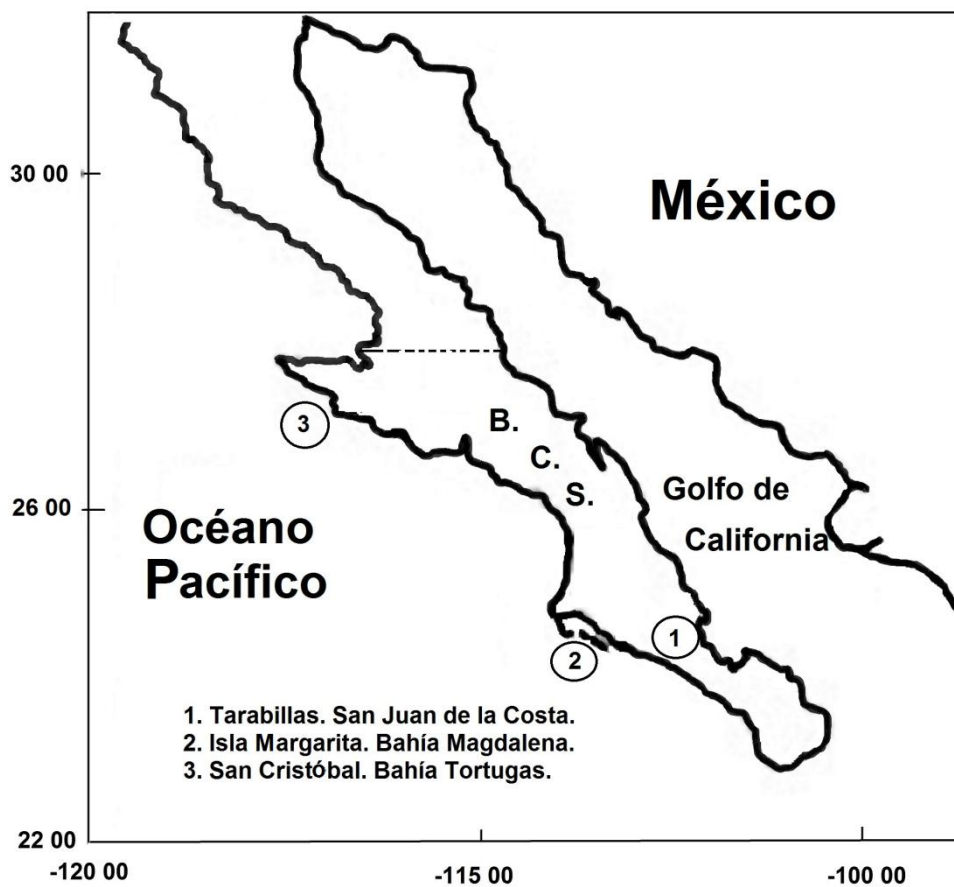


Figura 1. Zonas de recolecta de *Codium* spp.

5.2 Aislamiento y caracterización estructural de los principales productos naturales de las algas *Codium amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile*.

5.2.1 Obtención de extractos orgánicos

Los especímenes recolectados y deshidratados de *C. amplivesiculatum* (1.764 kg), *C. simulans* (0.630 kg), *C. cuneatum* (0.220 kg) y *C. fragile* (1.060 kg), se maceraron por separado durante una semana en etanol destilado a temperatura ambiente (22-35°C) con 3.5 L, 1.5 L, 1 L y 3 L x 3 veces, respectivamente. La disolución resultante se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador Yamato a 40°C, obteniendo los correspondientes extractos etanólicos, los cuales fueron sometidos a extracción líquido-líquido con diclorometano (CH₂Cl₂) y agua destilada, en proporción 1:1, colocados en un embudo de separación (50 mL x 8 veces), posteriormente la fase orgánica fue concentrada a presión reducida.

5.2.2 Fraccionamiento y aislamiento de compuestos

El fraccionamiento de cada extracto se realizó mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyentes mezclas de disolventes de polaridad creciente, comenzando con n-hexano, diclorometano, etanol y agua, en las proporciones correspondientes para cada alga y las cantidades de muestra procesadas. De acuerdo con un análisis cromatográfico en capa fina (CCF), los eluatos se agruparon en fracciones de polaridad creciente. Las fracciones con los compuestos a separar, fueron sometidas a sucesivas separaciones en cromatografía en columna (CC) con silica gel de 60 Å, 230-400 de malla marca Whatman International®, de dimensiones de acuerdo a la cantidad de la fracción orgánica obtenida para cada especie de *Codium*, hasta la obtención de compuestos puros.

5.2.2.1 Fraccionamiento de *Codium amplivesiculatum*

Se fraccionaron 7.5 g de extracto orgánico en columna cromatográfica de silica gel en las condiciones mencionadas anteriormente, con dimensiones de 50.0 × 2.0 cm, en una proporción de muestra adsorbente 1:20, estabilizada y eluída con 1 L de mezcla hexano:diclorometano (Hxn:CH₂Cl₂) 1:1, seguida con la

misma cantidad de eluyentes de CH₂Cl₂; CH₂Cl₂:EtOH (97:3), (93:7), (9:1); CH₂Cl₂:EtOH:H₂O (7:3:1), (6:3:1), (6:4:1); EtOH 100% y agua destilada 100%. Se colectaron 450 eluatos de aproximadamente 15 mL cada uno en tubos de ensayo y el patrón de fraccionamiento se determinó por medio de cromatografía de capa fina (TLC), con fase estacionaria de sílica gel de 60 Å, K6F marca Whatman International®.

Se obtuvieron 16 fracciones, de las cuales se purificaron los compuestos del **1** al **5** (Figura 2). Se utilizaron columnas cromatográficas con sílica gel de 60 Å, 230-400 de malla fase normal para las fracciones CC2F2, CC2F3, CC2F4 y CC2F13 y con sílica gel de 60 Å de fase reversa C-18, las fracciones CC2F10 y la CC2F12 (Figura 2).

La fracción CC2F2, se procesó en la columna CC12, de la cual la fracción F3 (CC12F3), correspondió al **compuesto 1**. La fracción CC2F4, se procesó en la columna CC13, con la F2 de esta columna como **compuesto 2(a)**. El mismo **compuesto 2(a)** (CC15F3), se obtuvo de la fracción CC2F4, después de fraccionar sucesivamente la F2 de CC11, F2 de CC14, correspondiendo a la F3 de CC15, a dicho compuesto. El **compuesto 3** correspondió a la fracción 2F2CCF10, con origen en el fraccionamiento de CC2F10, como resultado del fraccionamiento de dos columnas sucesivas: la F2 de CC3F2 y la F2 de F2CF10. El **compuesto 4** se obtuvo de la F2 de la fracción F12-F2, originada del fraccionamiento de CC2F12 y procesando las columnas CC4F2 y F12-F2. El **compuesto 5(a)** se derivó de la fracción F5 de la columna cromatográfica CC20, la derivó a su vez, de las columnas CC2F13 y CC16F5 (Apéndice A.5, A.6, A.6.1).

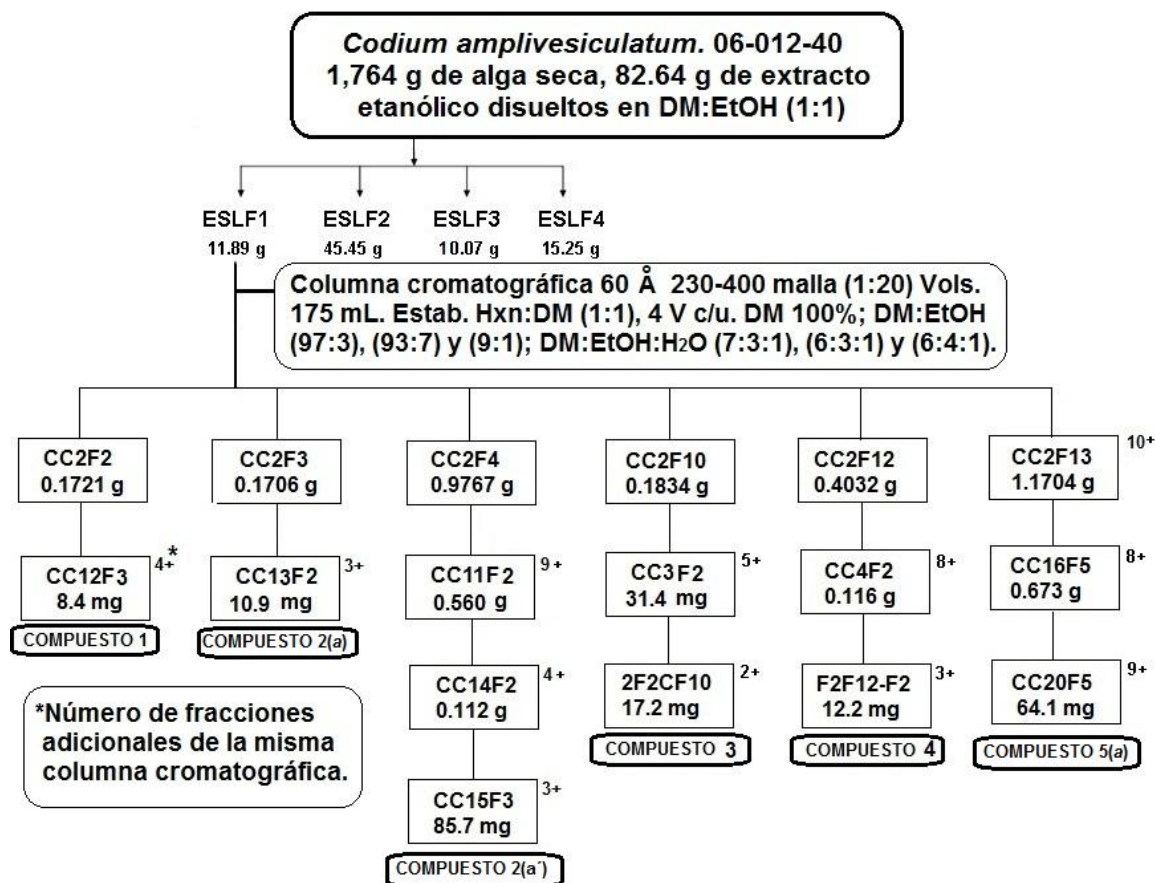


Figura 2. Diagrama de fraccionamiento de *Codium amplivesiculatum*.

5.2.2.2 Fraccionamiento de *Codium simulans*

Se redisolviaron 52 g de extracto etanólico en diclorometano (CH₂Cl₂) y se mezclaron con 50 g de sílica gel de 60 Å (230-400 de malla). La fase sólida obtenida después de evaporado el CH₂Cl₂ fue sometida a extracción sólido-líquido con disolventes de polaridad creciente: CH₂Cl₂ al 100%, EtOH al 100% y agua destilada. Se obtuvieron 3 fracciones: ESLF1 (18.50 g), ESLF2 (14.46 g) y ESLF3 (8.54 g). 10 g de la fracción ESL1 se fraccionó en una columna cromatográfica sobre sílicagel de 60 Å (230-400 de malla), en una proporción 1:10 extracto-sílica gel, utilizando los sistemas de Hexano:CH₂Cl₂ (1:1, 3:7, 2:8), CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:EtOH (9:1, 8.5:1.5, 8:2, 7:3, 6:4 y 4:6), EtOH (100%), EtOH:H₂O (5:5) y H₂O (100%), 90 mL x 5 para cada sistema. Se obtuvieron 14 fracciones que se agruparon de acuerdo a la polaridad creciente de los compuestos contenidos (Figura 3).

Se realizó la columna cromatográfica con sílica gel de 60 Å, 230-400 de malla de fase normal, para la unión de las fracciones F3 y F4, la cual fue nombrada con la clave C2ESL, con la proporción extracto:sílica gel de 1:20, estabilizada con hexano al 100% y eluída con los sistemas de disolventes siguientes: Hexano:CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:EtOH (9.5:0.5, 9:1., 8:2), CH₂Cl₂: EtOH:H₂O (7.5:2.8:0.2) y EtOH 100%. Se obtuvieron 9 fracciones que al realizar las TLC correspondientes, la F4 de esta columna mostró un compuesto cristalizado, purificado en la **columna C5ESL1** en las mismas condiciones de separación y obteniendo 5 fracciones, de las cuáles la fracción **F2C5ESL1** mostró cristales blancos, correspondiendo al **compuesto 2(s)** (Figura 3). La fracción **F3C5ESL1** (13.8 mg), se procesó en la **columna C6ESL1**, en las mismas condiciones de separación y obteniendo dos fracciones en la cual la **F1C6ESL1**, correspondió al **compuesto 5(s)**, con características de cristales blancos (Figura 3).

Las fracciones F7 y F8 se unieron para fraccionar el extracto en columna cromatográfica de sílicagel, en las mismas condiciones que la anterior y con la clave asignada C3ESL1, estabilizada con CH₂Cl₂ al 100% y eluída con los sistemas de disolventes siguientes: CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:EtOH (9.8:0.2, 9:5:0.5, 9:1, 8.5:1.5, 8:2) y CH₂Cl₂: EtOH:H₂O (7:3:0.2) y EtOH 100%. De esta columna se obtuvieron 7 fracciones de las cuales se unieron las fracciones 5 y 6 para montar la columna cromatográfica C4ESL1 (24.1 mg), con sílica gel en proporción 1:50, de la cual se obtuvieron cuatro fracciones y la fracción 2 de esta columna se lavó sucesivamente con MeOH, para eliminar el pigmento amarillo y cuando se eliminó todo lo posible con los lavados, se montó la columna cromatográfica C7ESL1, aislando la fracción única F1 (19.8 mg), resultando el **compuesto 5(s')** (**F1C7ESL1**) (Figura 3).

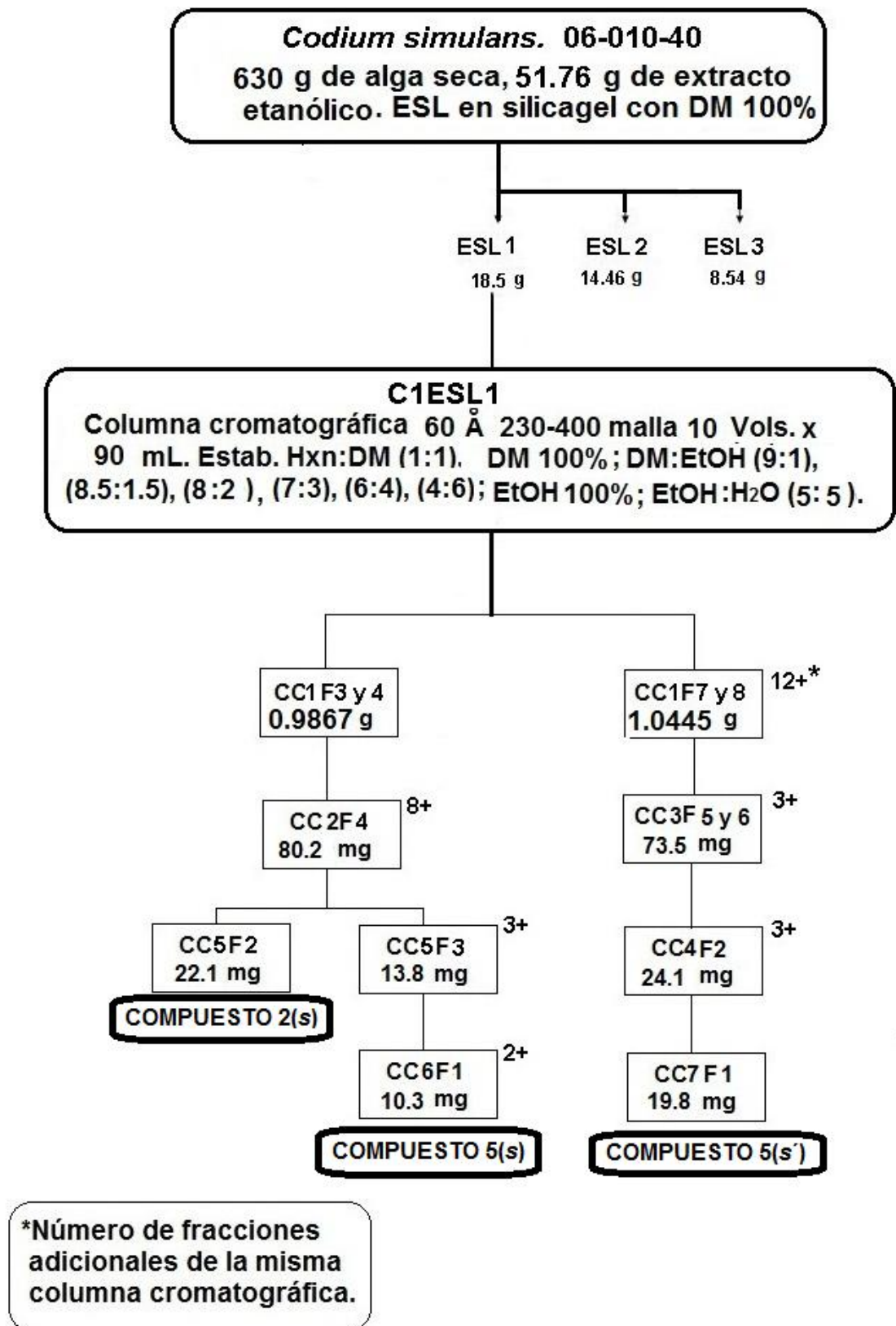


Figura 3. Diagrama de fraccionamiento de *Codium simulans*.

5.2.2.3 Fraccionamiento de *Codium cuneatum*

El extracto etanólico de *C. cuneatum* (21.55 g), se disolvió en CH_2Cl_2 , al cual se agregó sílica gel de 60 Å (230-400 de malla) y evaporando todo el disolvente, se realizó extracción sólido-líquido con los disolventes de CH_2Cl_2 , EtOH y Agua destilada (600 mL c/u). El extracto orgánico ESL1 (6.4 g), se redisolvió nuevamente en CH_2Cl_2 al 100% y se agregaron 13 g de sílica gel. Una vez evaporado el disolvente, el adsorbente impregnado se eluyó con 300 mL de los siguientes sistemas: Hexano (Hxn) 100%; Hxn: CH_2Cl_2 1:1; CH_2Cl_2 :EtOH 9:1; 8:2; 7:3 y 5:5; EtOH 100%, obteniendo 7 fracciones que de acuerdo a la caracterización por TLC, se agruparon en los compuestos de acuerdo a la polaridad creciente. De acuerdo al patrón de los compuestos obtenido de realizar las TLC de las fracciones, se realizó la unión de las fracciones F1, F2 y F3 y se realizó la columna cromatográfica identificada como C2PESL1F3, de la cual se obtuvieron 7 fracciones. Se realizó la unión de las fracciones F1 y F2 y se montó la columna cromatográfica C5PESLIF3, con la obtención de tres fracciones, procesando nuevamente la F2 al identificar el compuesto más separado por TLC. Para acabar de purificar esta F2, se montó la columna C6PESL1F3, de la cual se obtuvieron cuatro fracciones, con un compuesto cristalizado en la F3, identificado como el **compuesto 2(c)** (Figura 4).

Con la fracción F6 de ESL1, se montó una columna cromatográfica C3ESL1F6, en las condiciones ya descritas, estabilizada con CH_2Cl_2 al 100%. La elución de la columna se realizó con los siguientes sistemas de disolventes: CH_2Cl_2 (100%) hasta eliminar la mayor parte de pigmento, CH_2Cl_2 :EtOH (9:1, 8:2), CH_2Cl_2 :EtOH:H₂O (7:3:0.2), CH_2Cl_2 :MeOH:H₂O (8:3:0.5), EtOH (100%) y EtOH:H₂O (1:1). De esta columna se obtuvieron 10 fracciones de la cual la fracción 3 (F3), mostró la presencia de un compuesto con pigmento ligeramente amarillo en la TLC, en un sistema de elución en la fase móvil de CH_2Cl_2 :EtOH:H₂O (6.5:3.5:0.05), sometiendo a esta fracción a la columna cromatográfica C4PESL1, de la cual se obtuvieron cuatro fracciones, de las cuales la fracción 2 (F2) fue la que presentó mayor cantidad (343.3 mg) y se sometió a lavados sucesivos con MeOH y con la F2C4PESL1F6 ya despigmentada (24.0 mg), se montó la columna C7PESL1F6, obteniendo una única fracción con el **compuesto 5(c)** con aspecto de polvo blanco (9.7 mg), (Fig.4).

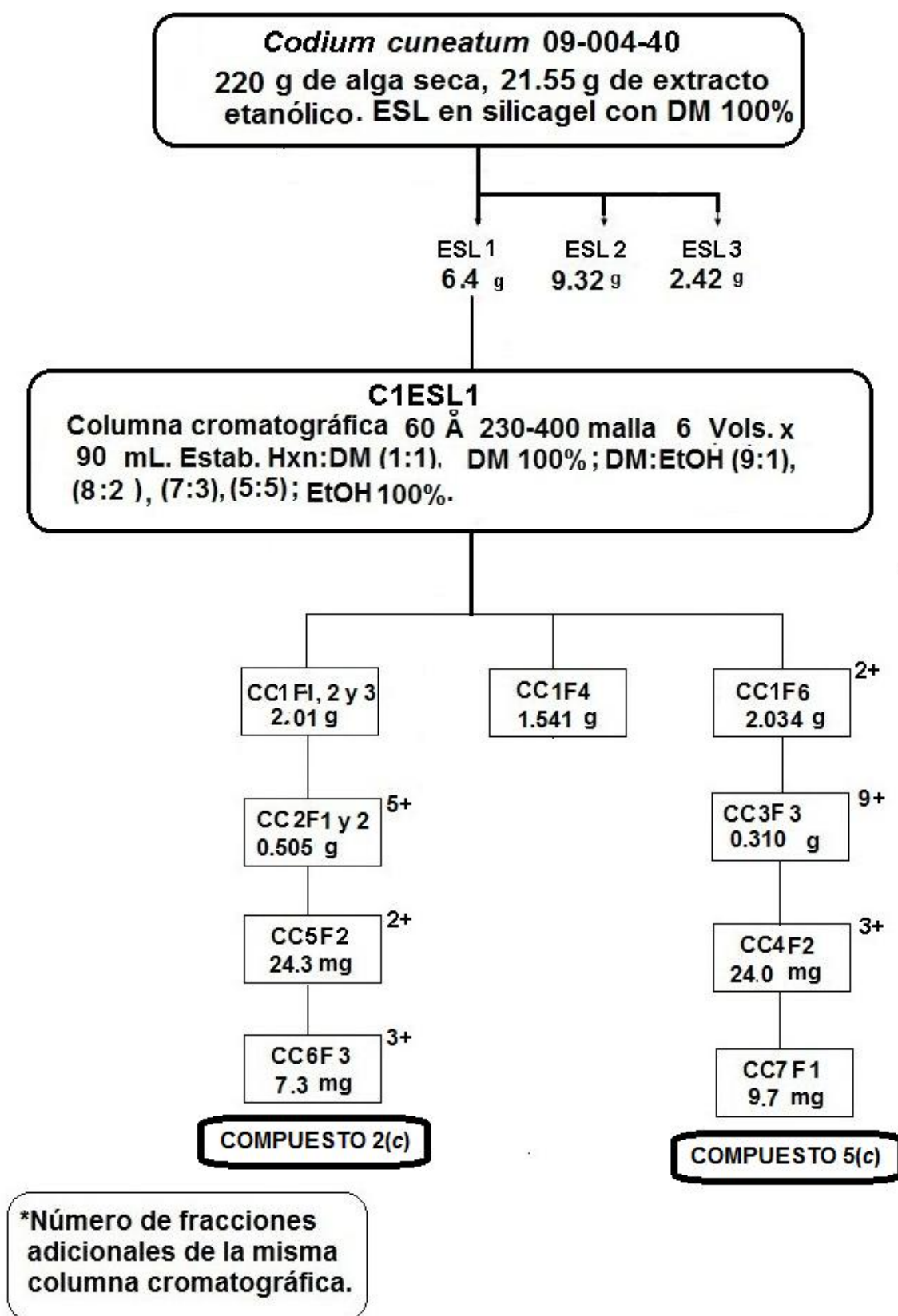


Figura 4. Diagrama de fraccionamiento de *Codium cuneatum*.

5.2.2.4 Fraccionamiento de *Codium fragile*

La separación del extracto ESL1 de *C. fragile* (21.16 g), se realizó con extracción sólido-líquido impregnando el extracto con sílica gel en proporción 1:2, debido a la gran cantidad de pigmento que mostró este extracto, aplicando 500 mL de los sistemas de Hxn 100%, Hxn:CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:EtOH (9:1, 8:2, 7:3, 5:5) y EtOH 100%. La cromatografía en capa fina mostró un patrón de compuestos agrupados en 8 fracciones.

La separación de la fracción F7 de ESL1 se realizó en la columna cromatográfica en las condiciones que muestra la Figura 5, estabilizada con CH₂Cl₂ al 100% identificada con la clave C2PESL7 y cuyos sistemas de elución correspondieron a CH₂Cl₂ (100%), CH₂Cl₂:EtOH (9:1, 8:2) (en este sistema de 8:2 se aplicaron ocho volúmenes debido a la gran cantidad de pigmento presente), CH₂Cl₂:EtOH:H₂O (7:3:0.2), CH₂Cl₂:MeOH:H₂O (8:3:0.5), EtOH (100%) y H₂O (100%).

Se obtuvieron once fracciones de las cuáles se apreció por medio de cromatografía de capa fina el compuesto en la fracción 7 (F7), que por arrastrar todavía pigmento amarillo, se le hicieron lavados sucesivos con MeOH. Esta fracción F7, se procesó en la columna cromatográfica C3PESL7 (173.1 mg), obteniendo la fracción única de características de polvo blanco (23.5 mg), con la clave **F1C3PESL7** e identificado como **compuesto 5 (f)** (Fig. 5).

Las fracciones F3, F4 y F5 de ESL1 se unieron para el montaje de la columna cromatográfica C1PESLF3 (Fig. 5), de la cual se obtuvieron diez y seis fracciones que por las características del patrón mostrado en cromatografía de capa fina, hay compuestos diferentes en la fracción 1 y de la 2 hasta la 7 se unieron, dejando aislada la fracción 8 y de la fracción 9 hasta la 16 se unieron en una sola. De estas uniones ya no se separaron compuestos debido al gran arrastre de pigmentos.

5.3 Caracterización estructural de los productos naturales

La caracterización estructural de los compuestos puros se realizó mediante técnicas espectroscópicas. Los espectros de protón ¹H-RMN y de ¹³C-RMN, se realizaron en un equipo Mercury 300. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum equipado con escáner ATR en un rango de frecuencia de 350 a 4500 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹.

El punto de fusión, se determinó en un fusiómetro marca Mel-Temp, Lab. Device, USA. Estos análisis se llevaron a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

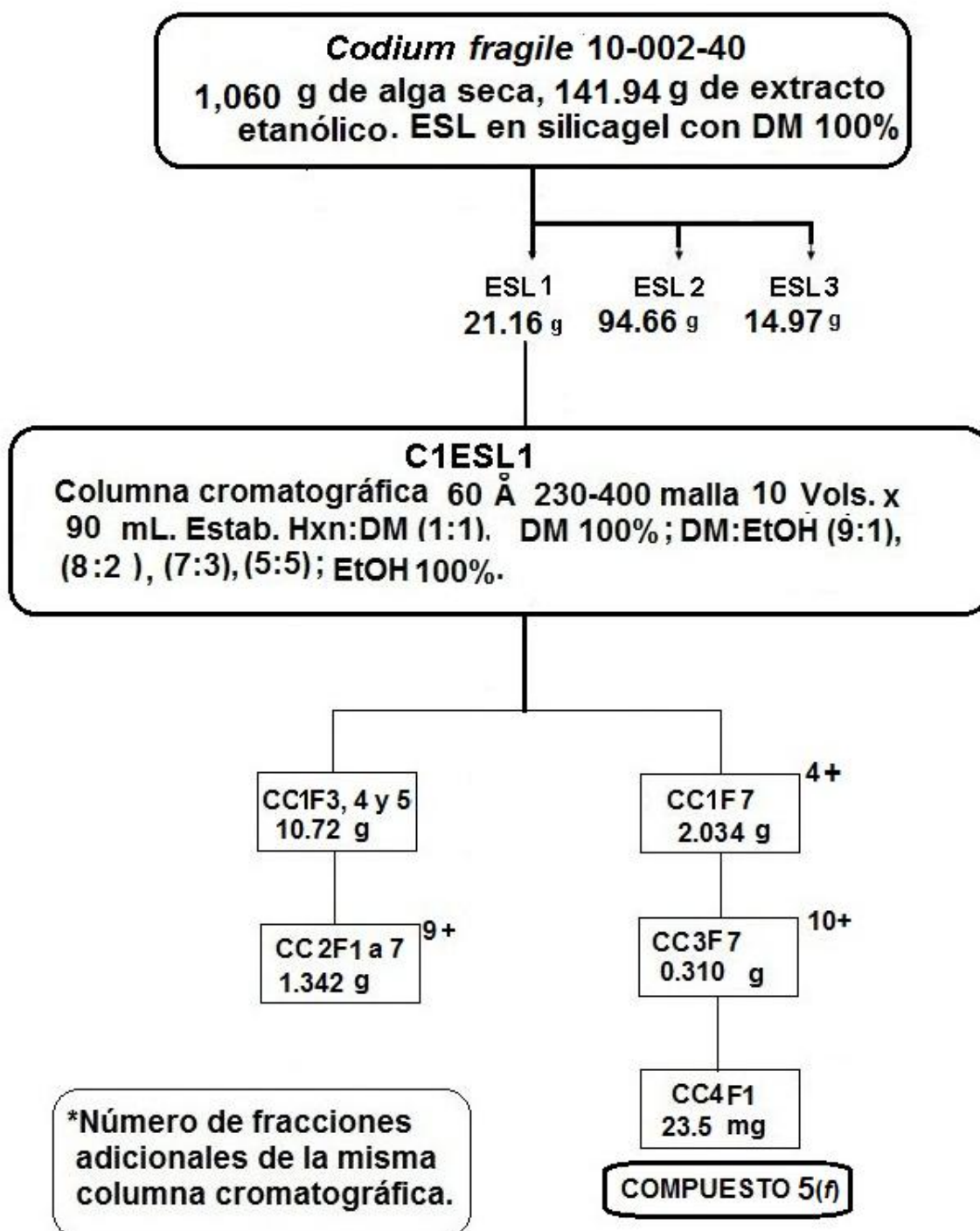


Figura 5. Diagrama de fraccionamiento de *Codium fragile*.

5.4 Evaluación de la actividad antibacteriana

Para las pruebas de la actividad antibacteriana, los extractos y las fracciones purificadas se redisolviéron en el disolvente apropiado, cargando discos de papel filtro Whatman No. 42 de 6 mm de diámetro, con 0.1 mL de los extractos con una concentración de 2 mg por disco, colocados en una siembra masiva en medio de cultivo Muller-Hilton, con hisopo en la caja de petri, con una suspensión de un cultivo de 24 h de cada tipo de microorganismo a $DO_{585}=1$, con una concentración aproximada de 10^9 UFC mL⁻¹, en solución salina al 0.85 %. Los microorganismos utilizados fueron *S. aureus* (ATCC-BAA-42) (resistente a meticilina, penicilina, ampicilina/sulbactam oxacilina), *E. coli* (ATCC- BAA-196) (resistente a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, gentamicina, piperacilina, tobramicina y trimetropim/ácido clavulánico) *S. pyogenes* (ATCC-BAA-946) (resistente a eritromicina), *V. parahaemolyticus* (ATCC- 17802), *V. alginolyticus* (ATCC-17749) y *V. harveyi* (ATCC-14126). Cada placa se sembró por duplicado agregando los discos con control positivo de antibiótico (eritromicina a una concentración de $10 \mu\text{g disco}^{-1}$) y control negativo de discos impregnados con el residuo de la concentración de 100 mL del disolvente de extracción, como blanco de inactividad de cada disolvente. Las cajas cultivadas y con los discos de extractos colocados, se incubaron a 37°C y se midieron los halos de inhibición a las 24 h. Las pruebas se realizaron tanto con los extractos orgánicos como con los productos puros.

A las fracciones activas se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), por el método de dilución en caldo Muller-Hilton, preparando series de dilución de cinco tubos reduciendo a la mitad la concentración inicial de cada fracción, desde $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto, hasta $15.125 \mu\text{g mL}^{-1}$, inoculados con 0.05 mL de suspensión bacteriana con una densidad de 2.5×10^4 UFC mL⁻¹, dicha densidad de siembra obtenida de la suspensión bacteriana en soluciones salinas correspondientes a cada cepa a 5×10^5 UFC mL⁻¹. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (NCCLS, 2000).

5.4.1 Evaluación de la actividad antituberculosis

La actividad antituberculosis se determinó contra la cepa *Mycobacterium tuberculosis* HR37Rv (27294), sensible a isoniacida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y pirazinamida, mediante la microtécnica de "Alamar Azul". La CMI de

las 12 fracciones obtenidas de *C. amplivesiculatum* se realizó con el cultivo de microorganismos en microplacas de 96 pozos en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), suplementado con 12% de glicerol y 10% de ácido oleico-dextrosa - catalasa (AODC). Se utilizó como inóculo una suspensión celular de 6×10^6 células mL^{-1} y rifampicina como control positivo. Se utilizaron filas de 6 pozos para el ensayo de cada extracto al que se agregan 100 μL de medio Middlebrook 7H9, el rango de concentraciones de extractos fue de 100, 25, 12.5, 6.25 y 3.13 $\mu\text{g mL}^{-1}$, disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a un nivel subtóxico del disolvente para la cepa micobacteriana. Se adicionó el inóculo en una proporción 1:20. Se dispuso de un control del medio solo con 200 μL para garantizar su esterilidad, un control de inóculo positivo 1:100, para garantizar el crecimiento del 1% de la población bacilar y un control de inóculo bacteriano sin antibiótico. Se realizó duplicado para todos los casos (Molina-Salinas *et al.*, 2006).

5.5 Evaluación de la actividad antiviral

Previo al ensayo antiviral, se evaluó la citotoxicidad de los compuestos aislados de *C. amplivesiculatum*: CC13/F2 y CC20/F5, para determinar la viabilidad celular a la mejor dosis (por encima o igual al 80%), utilizando el kit Cytotox 96, Promega™, para detectar por colorimetría, la liberación de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL) por las células muertas de la línea celular de hepatocitos humanos utilizada (Huh-7). Las concentraciones probadas fueron de 10 a 150 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Como control negativo se realizó el cultivo sin la presencia de los compuestos y evaluados de la misma forma. Todas las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

La evaluación antiviral se realizó utilizando los extractos puros de *C. amplivesiculatum*, utilizando la técnica de multiplicidad de infección (Castañeda, 2007), determinada con mezclas de una cantidad fija de virus de dengue DENV 2 cepa "New Guinea C", incubando durante una hora a 37°C con las concentraciones de 100 y 150 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de cada compuesto CC13F2 y CC20F5. El control se realizó con la mezcla del virus y dimetilsulfóxido (DMSO) en suero fetal bovino (SFB) al 0.5%. Después de la incubación, se infectaron monocapas de las líneas celulares Huh-7 durante una hora y transcurridas 48 h post-infección, se determinó la proteína no estructural del virus (NS1), secretada al medio de cultivo por las células infectadas y liberada al sobrenadante mediante el kit de Platelia™

Dengue NS1 AG BioRad™. Los niveles secretados de proteína están correlacionados con los títulos virales. Los bioensayos se hicieron por cuadruplicado.

5.6 Evaluación citotóxica de las fracciones purificadas obtenidas de *C. amplivesiculatum*

La actividad citotóxica de compuestos aislados de *C. amplivesiculatum*, se evaluó frente a líneas celulares tumorales de cáncer de próstata (PC-3), de cáncer de colon (HCT-15) y de cáncer de mama (MCF-7), mediante bioensayo de inhibición de crecimiento celular con sulforhodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990).

Medida de la inhibición del crecimiento celular por ensayo colorimétrico con sulforhodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990)

Las células se sembraron en placas de microdilución de 96 pozos, con 5×10^3 células por pozo en alícuotas de 190 μL de medio y se dejaron crecer durante 18 h hasta que se adhirieron a la superficie de la placa. A continuación se añadieron alícuotas de 10 μL de los compuestos a ensayar disueltos en DMSO/H₂O (1:9), a una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Después de 48 h de exposición, el efecto antitumoral se midió mediante la metodología SRB. Para ello el contenido de las celdas se fijó con ácido trifluoroacético al 50% y se incubó a 4°C durante 60 minutos, tras los cuales, las placas se lavaron con agua desionizada y se secaron. A continuación se añadieron 100 μL de una disolución de SRB (0.4% (p/v) al 1%, se secaron y se solubilizaron con una disolución tampón Tris. La densidad óptica se registró mediante un lector espectrofotométrico automático a 490 nm de longitud de onda.

Se midió la actividad del compuesto en porcentaje de inhibición de crecimiento (% IC) a la concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, registrando los resultados de la siguiente forma:

%IC = 0. No hay inhibición del crecimiento.

%IC entre 0-49. Débil inhibición del crecimiento.

%IC entre 50-99. Inhibición del crecimiento de moderada a alta.

%IC = 100. Inhibición total de crecimiento.

%GI > 100. Muerte celular.

El registro de la actividad de los compuestos se expresó como IC₅₀, que es la concentración que causa el 50% de inhibición del crecimiento, realizando también un control de células sanas.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento y purificación de los extractos

Con respecto a la obtención de extractos etanólicos y fracción orgánica, la Tabla 4 muestra el rendimiento porcentual en base seca, el cual muestra variación particularmente en el rendimiento de los extractos crudos, mientras que el rendimiento de fase orgánica resultó más homogéneo con excepción del caso de *C. amplivesiculatum*.

Tabla 4. Rendimiento porcentual en base seca de extracto etanólico y fase orgánica obtenidos de las especies de *Codium* estudiadas.

	<i>C. amplivesiculatum</i>	<i>C. simulans</i>	<i>C. cuneatum</i>	<i>C. fragile</i>
Extracto etanólico	4.7	8.2	9.8	13.4
Fase orgánica	0.68	2.9	2.9	2.0

6.2.1 Productos naturales aislados de *Codium amplivesiculatum*

1-Octadecanol (1), semisólido blanquesino a temperatura ambiente. IR-ATR [ν en cm^{-1} (%T)]; 3324 (75.3), 2974 (84.1), 2942 (82.1), 2831 (84.2), 1449 (85.9), 1414 (86.5), 1088 (84.1), 1024 (30.8), 880 (85.3), 737 (73.7), 623 (73.8). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃); δ 0.89 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-18), 1.20 (2H, s amplio, H-16), 1.28 (s amplio), 1.56 (2H, m, H-2), 3.64 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-1). El compuesto **1**, mostró bandas de absorción de infrarrojo características de un alcohol primario de naturaleza alifática (Apéndice A.1). Esa asignación fue confirmada al analizar los datos de ¹H-RMN (Apéndice A.1). Después de integrar cuidadosamente el área bajo cada pico se determinó que la longitud de la cadena hidrocarbonada debía ser de 18. Esto último permitió suponer que la estructura química de **1** podría ser 1-octadecanol. Lo cual fue confirmado al comparar la información espectroscópica obtenida contra aquella reportada en la Spectral Database for Organic Compounds, SDBS (2003) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de las señales obtenidas por RMN de ^1H del **compuesto 1**, con las reportadas en la base de datos SDBS (2003).

Señal	SDBS (2003)	Compuesto 1	Fórmula del 1-Octadecanol
	δ (ppm)	δ (ppm)	
	90 MHz CDCl ₃	300 MHz CDCl ₃	
A	3.62	3.64	
B	1.56	1.56	CH ₃ —(CH ₂) ₁₅ —CH ₂ —CH ₂ —OH
C	1.55		(E) (D) (B) (A) (C)
D	1.26	1.20-1.28	
E	0.89	0.89	

Clerosterol 2(a) (CC13F2 y CC15F3): Cristales blancos, punto de fusión: 131-132°C. IR-ATR (ν en cm^{-1} , %T) 3327 (97), 2933 (87), 2850 (90), 1644 (96), 1452 (90), 1332 (94), 1244 (96), 1193 (95) 1108 (95), 1043 (83), 1022 (88), 884 (81), 839 (93), 800 (91), 739 (93), 626 (90), 558 (89) (Apéndice A.4). ^1H -RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0.69 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-29), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 1.58 (3H, s, H-27), 3.51 (1H, m, H-3), 4.66 (1H, doblete amplio, $J = 2.3$ Hz, H-26), 4.73 (1H, doblete amplio, $J = 2.3, 1.4$ Hz, H-26), 5.36 (1H, doblete amplio, $J = 5.2$ Hz, H-6) (Apéndice A.3). El compuesto 2 fue identificado por comparación de la información espectral de ^1H -RMN (Tabla 6) como (24S) -24-metilcolesta-5,25-dien-3- β -ol, comunmente conocido como clerosterol (Figura 6).

Tabla 6. Comparación de señales de ^1H -RMN (δ en ppm) del **compuesto 2(a)** con aquellas reportadas en la literatura para clerosterol.

Compuesto 2(a) (CDCl_3 , 300 MHz)	Ahmad, <i>et al.</i> (1993) (CDCl_3 , 400 MHz)	Sheu, <i>et al.</i> (1995) (CDCl_3 , 400 MHz)	Saleem (2000) (CDCl_3 , 400 MHz)
0.69 (3H, s, H-18)	0.66 (3H, s, H-18)	0.67 (3H, s, H-18)	0.66 (3H, s, H-18)
0.82 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-29)	0.79 (3H, t, H-29)	0.80 (3H, t, H-29)	0.67 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-29)
0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-21)	0.89 (3H, d, H-21)	0.90 (3H, d, H-21)	0.77 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21)
1.02 (3H, s, H-19)	0.99 (3H, s, H-19)	0.95 (3H, s, H-19)	0.99 (3H, s, H-19)
1.58 (3H, s, H-27)	1.55 (3H, s, H-27)	1.57 (3H, s, H-27)	1.65 (3H, s, H-26)
3.51 (1H, m, H-3)	3.5 (1H, m, H-3)	4.12 (1H, m, H-3)	3.51 (1H, m, H-3)
4.66 (1H, d amp., $J = 2.3$ Hz, H-26)	4.62 (1H, s amp., H-26)	4.64 (1H, s amp., H-26)	4.63 (1H, amp., H-27)
4.73 (1H, dd amp., $J = 2.3$, 1.4 Hz, H-26)	4.71 (1H, s amp., H-26)	4.73 (1H, s amp., H-26)	4.51 (1H, amp., H-27)
5.36 (1H, d amp., $J = 5.2$ Hz, H-6)	5.34 (1H, t dist., H-5)	5.60 y 5.83 (1H, dd, H-6 y H-7)	5.32 (1H, t dist., H-5)

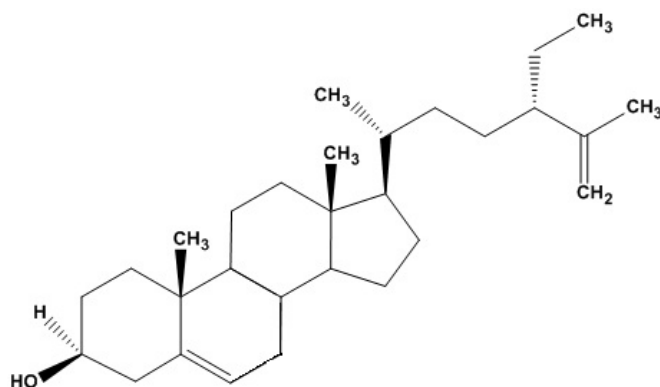


Figura 6. Estructura del clerosterol.

Compuestos 3 (2F2CF10 igual a 5F2CF10) y 4 (F2CC1F12-F2) no pudieron ser identificados debido a problemas técnicos.

Diacilglucoglicérido (5 (a), CC20F5): Polvo amorfo de color blanco. IR-ATR [ν en cm^{-1} , (%T)]; 3490 (96), 2920 (72), 2836 (77), 1745 (82), 1732 (81), 1633 (98), 1493 (89), 1324 (94), 1332 (93), 1294 (87), 1243 (80), 1215 (77), 1122 (82), 1050 (70), 1034 (66), 911 (96), 821 (96), 750 (90), 580 (88), 523 (84.5) (Apéndice A.8). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ 5.30 (1H, s), 4.93 (1H, s), 4.45 (1H, d), 4.18 (1H, s), 4.07 (1H, d), 3.81 (1H, m), 3.74 (1H, m), 3.65 (2H, m), 3.35 (2H, m), 3.23 (1H, m), 3.13 (1H, s), 2.95 (5H, m), 2.7 (s), 2.2 (s), 1.9 (s), 1.66 (s), 1.22 (s), 0.85 (s) (Apéndice A.5 y A.5.1). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3); δ 172.5, 172.3, 104.4, 98.0, 72.5, 72.5, 71.2, 69.2, 67.6, 65.1, 62.0, 53.7, 33.4, 33.2, 31.0, 28.8, 28.7, 28.6, 28.6, 28.4, 28.4, 28.2, 24.0, 24.0, 21.7, 13.3 (Apéndice A.6 y A.6.1). La estructura química del **compuesto 5(a)** no fue completamente determinada. Sin embargo, con base en la interpretación de los datos espectroscópicos se logró definir como un diacilglucoglicérido. El espectro de infrarrojo de **5(a)**, mostró bandas de absorción características de un carbonilo tipo éster y una función hidroxilo. El espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ mostró señales de glicerol esterificado a δ 69.2, 67.6, 65.1 ppm. Adicionalmente se observó la resonancia de dos carbonilos a δ 172.5 y 172.3 ppm, lo que dio la idea de dos ácidos grasos sustituyentes. Además se observó una señal a 104.4 ppm asignable al carbón anomérico de un azúcar. También se observaron los metinos oxigenados respectivos. En conjunto, esta

información sugiere que el compuesto **5(a)** podría ser establecido como un diacilglucoglicérido. Estos datos son consistentes con los reportados para el codiósido A extraído a partir de *Codium iyengarii* (Saleem, 2000). Sin embargo, existen diferencias notables entre ellos, lo que permite suponer que el compuesto **5 (a)**, podría ser una adición a la serie de codiósidos conocidos.

6.2.2 Productos naturales de *Codium simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile*

Clerosterol (compuesto 2(s), F2C5ESL1): El compuesto **2(s)** obtenido de *C. simulans* mostró el mismo R_f que el compuesto **2(a)** aislado a partir de *C. amplivesiculatum*. Una comparación rápida por medio de espectroscopia de infrarrojo confirmó que el **compuesto 2(s)** es clerosterol (Apéndice A.11). De la misma manera, el **compuesto 2(c)** aislado a apartir de *C. cuneatum* (Apéndice A.7).

Diacilglucoglicérido (compuesto 5(s), F1C6ESL1): El compuesto **5(s)** mostró las mismas características de absorción de infrarrojo que el diacilglucoglicérido obtenido a partir de *C. amplivesiculatum*. Adicionalmente, fue re-aislado de la unión de fracciones F6 y F7 del procesamiento del extracto orgánico inicial en la columna C2ESL1 [**compuesto 5(s') (F1C7ESL1)**]. La identificación se realizó por medio de una comparación rápida de los espectros de infrarrojo correspondientes, según se muestra en la Figura 7. De la misma manera los **compuestos 5(c)** y **5 (f)** aislados a partir de *C. cuneatum* y *C. fragile* (Apéndice A.9 y A.10, respectivamente).

6.2.3 Evaluación de la actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antimicrobiana de fracciones del extracto orgánico de cada especie de *Codium* ensayada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42), *Escherichia coli* (ATCC-BAA-196), *Streptococcus pyogenes* (ATCC-BAA-946), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802), *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749) y *Vibrio harveyi* (ATCC-14126) se muestran en las Tablas 7 a 10.

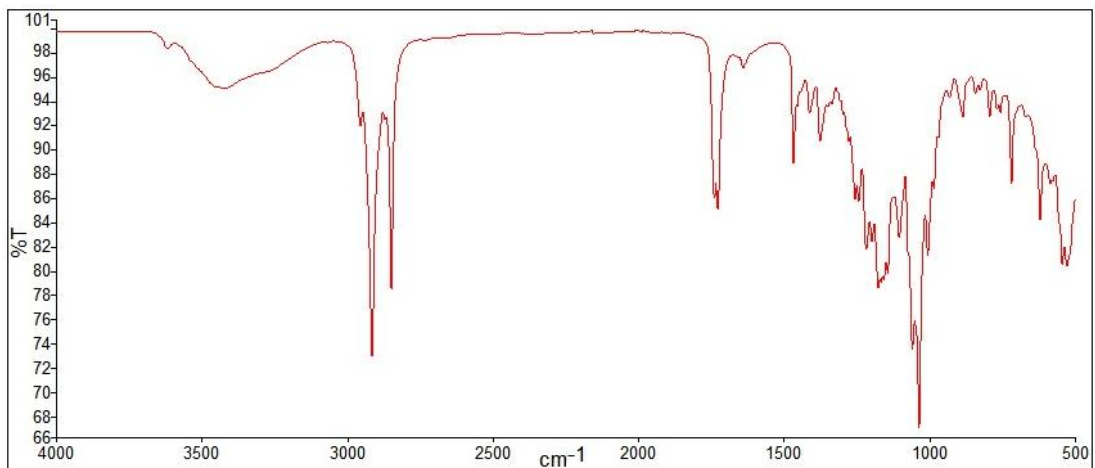
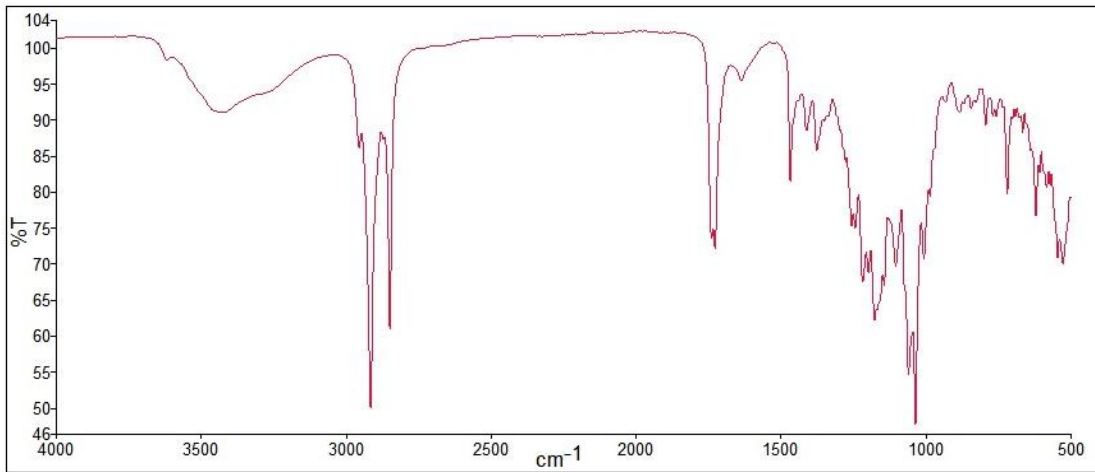
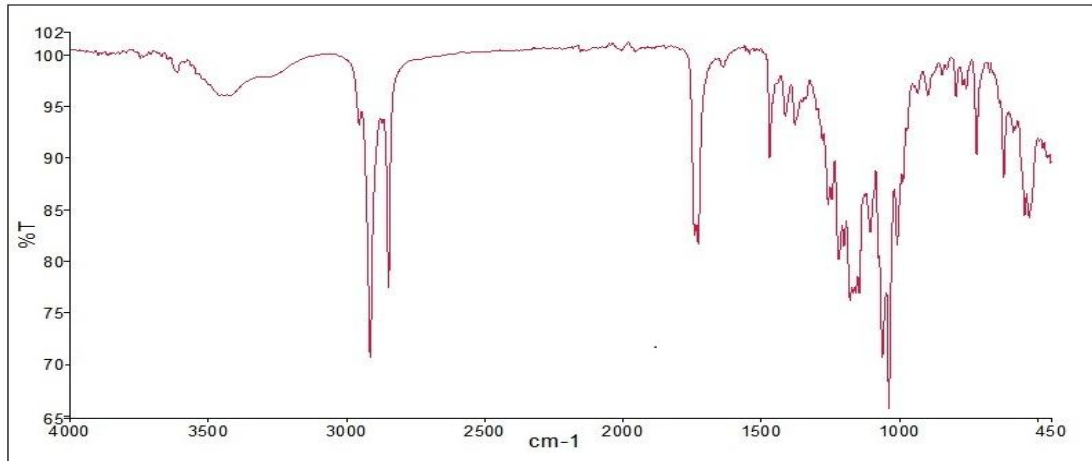


Figura 7. Comparación de los espectros de infrarrojo del diacilglucoglicérido **5 (a)**, (CC20F5) obtenido de *C. amplivesiculatum* (arriba), el **compuesto 5(s)**, (F1C6ESL1, medio) y **compuesto 5(s')** (F1C7ESL1, abajo) aislados de *Codium simulans*.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de fracciones y productos puros de *Codium amplivesiculatum* determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).

Fracciones/ Compuestos	Microorganismo					
	1	2	3	4	5	6
ESLF1	9	-	-	-	-	-
ESLF2	-	-	-	8	-	-
ESLF3	7	-	-	-	-	-
ESLF4	-	-	17.5	-	-	-
ESLF5	8	-	11	-	-	-
ESLF6	8	-	14	-	-	-
ESLF8	-	-	-	-	-	-
ESLF13	9.5	-	14	-	-	-
ESLF14	-	-	7	-	-	-
ESLF15	-	-	9.5	-	-	-
ESLF16	-	-	7	-	-	-
ESLF17	-	-	9.5	-	-	-
ESLF20	-	-	-	-	-	-
ESLF21	-	-	-	-	-	-
ESLF22	-	-	-	-	-	-
ESLF24a	-	-	-	-	-	-
Clerosterol CC13F2	-	-	-	-	-	-
Codiósido CC20F5	-	-	-	-	-	-

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42); 2. *Escherichia coli* (ATCC-BAA-196); 3. *Streptococcus pyogenes* (ATCC-BAA-946); 4. *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802); 5. *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749); 6. *Vibrio harveyi* (ATCC-14126).

Tabla 8. Actividad antibacteriana del extracto orgánico y fracciones de *Codium simulans* determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).

Fracciones	Microorganismo				
	1	2	4	5	6
ESLF1	-	-	-	12.5	-
ESLF2	-	-	5	7	7.5
ESLF3	-	-	5	8.5	9
ESLF4	-	-	7	23	10.5
ESLF5	-	-	-	21	10.5
ESLF6	-	-	-	-	-
ESLF7	-	-	-	-	-
ESLF8	-	-	-	-	-
ESLF9	-	-	-	-	-
ESLF10	-	-	7	6.5	-
ESLF11	-	-	-	-	-
ESLF12	-	-	-	-	-
ESLF13	-	-	-	-	-
ESLF14	-	-	-	-	-
Extr. Orgánico	-	-	-	-	-

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42); 2. *Escherichia coli* (ATCC-BAA-196); 4. *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802); 5. *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749); 6. *Vibrio harveyi* (ATCC-14126).

Tabla 9. Actividad antibacteriana del extracto orgánico y fracciones de *Codium cuneatum* determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).

Fracciones	Microorganismo				
	1	2	4	5	6
ESLF1	-	-	-	-	-
ESLF2	8	-	-	-	-
ESLF3	14	-	9.5	-	11.5
ESLF4	-	-	8	-	9.5
ESLF5	-	-	-	-	8
ESLF6	-	-	-	-	-
ESLF7	-	-	-	-	-
ESLF8	-	-	-	-	-
ESLF9	-	-	-	-	-
ESLF10	-	-	-	-	-
ESLF11	-	-	-	-	-
ESLF12	-	-	-	-	-
ESLF13	-	-	-	-	-
ESLF14	-	-	-	-	-
Extracto orgánico	-	-	-	-	-

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42); 2. *Escherichia coli* (ATCC-BAA-196); 4. *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802); 5. *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749); 6. *Vibrio harveyi* (ATCC-14126). n/e = no evaluada.

Tabla 10. Actividad antibacteriana del extracto orgánico y fracciones de *Codium fragile* determinada por el método de difusión en agar (halos en mm, n = 2).

Fracciones	Microorganismo*					
	1	2	4	5	6	
ESLF1	-	-	-	-	-	-
ESLF2	8	-	-	-	-	-
ESLF3	8.5	-	8	-	-	9
ESLF4	-	-	-	-	-	9
ESLF5	8	-	-	-	-	8
ESLF6	-	-	-	-	-	10
ESLF7	-	-	-	-	-	10
ESLF8	-	-	-	-	-	-
ESLF9	-	-	-	-	-	-
ESLF10	-	-	-	-	-	-
ESLF11	-	-	-	-	-	-
ESLF13	-	-	-	-	-	-
ESLF14	-	-	-	-	-	-
Extracto Orgánico	-	-	-	-	-	-

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42); 2. *Escherichia coli* (ATCC-BAA-196); 4. *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802); 5. *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749); 6. *Vibrio harveyi* (ATCC-14126). n/e = no evaluada

De los resultados obtenidos de las cuatro especies de *Codium*, se observa que el efecto antibacteriano es mayor con las primeras fracciones del extracto orgánico, donde se obtuvieron fracciones menos polares, ya que la elución inicial se realizó con disolventes de baja polaridad.

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CMI) de las fracciones activas por el método de dilución en caldo mostró que la fracción F3 de *C. amplivesiculatum* y la F11 de *C. simulans* fueron capaces de inhibir el desarrollo de *S. aureus* y *V. parahaemolyticus*, respectivamente a una concentración de 125 µg mL⁻¹. El resto de las fracciones mostraron valores de CMI > 250 µg mL⁻¹.

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones activas vs. microorganismos ensayados del extracto orgánico de *Codium* spp.

Alga	Microorganismo						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>C. amplivesiculatum</i>	F3 (125); F4, F5, F6 y F8 (>250).	-	F4, F5, F6, F8, F9, F10, F11, F12, F13 (n/e)	F2 (>250)	CC13F2 y CC20F5 (n/e)	-	F2 (100); (demás fracciones: >100)
<i>C. simulans</i>	-	-	n/e	F3, F4 y F5 (>250); F11 (125).	F1, F2, F3, F4, F5, F10 (n/e).	F2, F3, F4 y F5 (>250).	(n/e)
<i>C. cuneatum</i>	F2 y F3 (>250),	-	n/e	F3 y F4 (>250).	-	F3, F4 y F5 (>250).	(n/e)
<i>C. fragile</i>	F2, F3 y F5 (>250).	-	n/e	F3 (>250)	-	F3, F4, F5, F6 y F7 (>250)	(n/e)

1. *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42); 2. *Escherichia coli* (ATCC-BAA-196); 3. *Streptococcus pyogenes* (ATCC-BAA-946); 4. *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802); 5. *Vibrio alginolyticus* (ATCC-17749); 6. *Vibrio harveyi* (ATCC-14126); 7. *Mycobacterium tuberculosis* (HR37Rv-27294). CMI en $\mu\text{g mL}^{-1}$ (entre paréntesis). n/e=no evaluada. n = 2

6.3 Evaluación de la actividad antituberculosis

Doce fracciones de *C. amplivesiculatum* fueron evaluadas contra *M. tuberculosis* (cepa: HR37Rv-27294), de las cuales solo la fracción F2, mostró una CMI de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El resto mostraron CMI > 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabla 11).

6.4 Evaluación de la actividad antiviral

Los resultados del efecto del clerosterol (compuesto **2(a)**) y el diacilglucoglicérido (compuesto **5(a)**) sobre la viabilidad celular de la línea Huh-7, fueron superiores al 80% de supervivencia, manteniendo niveles por arriba del 90% con el diacilglucoglicérido y de 84% con el clerosterol a la máxima concentración de prueba (Tabla 12).

Tabla 12. Citotoxicidad de los compuestos **2(a)** y **5(a)** (CC13F2 y CC20F5) sobre la línea celular Huh-7 (derivada de hepatocitos humanos), los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular.

Compuesto	Concentraciones $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$				
	Control	10	50	100	150
CC13F2	84.1 \pm 0.75	88.1 \pm 0.63	92.5 \pm 0.82	91.1 \pm 0.71	83.9 \pm 0.91
CC20F5	84.1 \pm 0.73	88.1 \pm 0.70	91.1 \pm 0.81	91.1 \pm 0.74	93.2 \pm 0.89

Después de verificar la viabilidad celular se condujo el ensayo de infección viral. Los resultados de la actividad antiviral sobre las monocapas de células Huh-7 de hepatocitos humanos, pretratados con clerosterol (compuesto **2**) y el diacilglucoglicérido (compuestos **5**) mostraron una inhibición de la infección del virus del dengue DENV2, con valores de 40% y 74% de inhibición, respectivamente, a 150 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ durante 48 horas post-infección, comparados con los valores obtenidos con la infección de las células y sin la infección celular, solamente con el vehículo (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad antiviral de clerosterol y el diacilglucoglicérido contra el virus del dengue DENV2 expresada como porcentaje de la infección.

Compuesto	Concentraciones ng μL^{-1}		
	Control	100	150
clerosterol	99.8 \pm 0.47	69.8 \pm 0.45	59.9 \pm 0.33
diacilglucoglicérido	99.8 \pm 0.41	62.2 \pm 0.70	26.2 \pm 0.81

*Técnica de multiplicidad de infección. Se utilizó el kit de Platelia™ Dengue NS1 AG BioRad™, para determinar la proteína no estructural del virus (NS1) secretada al medio de cultivo por las células infectadas y correlacionada con los títulos virales.

6.5 Evaluación citotóxica de compuestos puros obtenidos de *C. amplivesiculatum*

La Tabla 14 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de varias líneas tumorales frente a clerosteroles (CC13F2 y CC15F3) y el diacilglucoglicérido. De acuerdo con ello, ninguno de los compuestos probados mostró reducción significativa del crecimiento celular a la concentración de prueba. Se confirma el resultado de baja citotoxicidad contra células Huh-7 de hepatocitos humanos, El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento fue obtenido por el diacilglucoglicérido sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7, seguido de la línea celular de cáncer de colon HCT-15. Sin embargo y de acuerdo a la clasificación para el nivel de citotoxicidad sobre las líneas celulares ensayadas, se considera una débil inhibición del crecimiento, respaldando este resultado el ensayo previo de citotoxicidad para la determinación de actividad antiviral, sobre células Huh-7 de hepatocitos humanos, donde se obtuvo una viabilidad celular entre el 84% y el 93% con los mismos compuestos.

Tabla 14. Citotoxicidad* de clerosteroles (compuestos 2(a) y 2(a´) y el diacilglucoglicérido, en porcentaje de inhibición del crecimiento sobre líneas celulares cancerosas humanas. Probadas a 50 µg mL⁻¹.

Compuesto	PC-3	HCT-15	MCF-7
Diacilglucoglicérido	11.8 ±5.0	34.6 ±0.76	36.3 ±0.81
Clerosterol 2(a)	21.0 ±0.3	11.9 ±3.2	9.5 ±1.1
Clerosterol 2(a´)	0.0	7.1 ±2.0	4.3 ±4.0

*Inhibición del crecimiento celular por ensayo colorimétrico con sulforhodoamina B (SRB, Skehan et al. 1990) Células cancerosas humanas PC-3;próstata; HCT-15:Colon; MCF-7: Mama. Promedio ± error estándar por triplicado de experimentos independientes.

7. DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento y purificación de los productos naturales

El rendimiento porcentual de los extractos crudos etanólicos obtenidos de las especies de *Codium* ensayadas, varía entre un intervalo del 4 al 13%. El contenido de metabolitos secundarios no solo depende del organismo, sino que también del ambiente que proporciona diferentes condiciones, tales como: depredación, competencia espacial, epibiosis, estadio fisiológico, intensidad de luz, temperatura, disposición de nutrientes entre muchas otras (Hay *et al.*, 1994; Amsler *et al.*, 2005; Amsler, 2008; Rindi *et al.*, 2012).

7.1.1 Productos naturales aislados a partir de *C. amplivesiculatum*, *C. simulans*, *C. cuneatum* y *C. fragile*

Para el caso de *C. amplivesiculatum*, el aislamiento e identificación de **1-octadecanol** (CC12F3) y **clerosterol** (CC13F2, Figuras 5 y 6), corresponden al primer reporte sobre su composición. El aislamiento de clerosterol a partir de esta especie de *Codium*, aumenta la robustez de este metabolito como marcador quimiotaxonómico del género, ya que hasta donde se sabe, las algas de este género son los únicos productores marinos de clerosterol (Ahmad *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 1993; Sheu *et al.*, 1995; Shuai *et al.*, 2005; He *et al.*, 2010). Por otro

lado, la presencia de 1-octadecanol en *C. amplivesiculatum*, parece sugerir que esta alga, además de contener una variedad de ácidos grasos insaturados, contiene alcoholes de cadena larga, derivados del correspondiente ácido graso, generando interrogantes en cuanto a su biosíntesis. Sin embargo, debido a que este es uno de los escasos reportes de alcoholes de cadena larga en algas marinas desconocemos su significancia biológica. Esto último ofrece una nueva oportunidad para investigar y comparar las rutas biosintéticas de los metabolitos, la influencia del ambiente, en las relaciones tróficas, por mencionar algunos (Silva *et al.* 1984; Aliya *et al.*, 1991; Sanhueza *et al.*, 2002; Dembitsky *et al.*, 2003; Goecke *et al.*, 2010; Holdt & Kraan, 2011).

El alcohol de cadena larga **1-octadecanol** mostró un punto de fusión bajo, con las bandas características en el espectro de infrarrojo, grupo funcional hidroxilo, sin que se observen bandas para otros grupos funcionales como carbonilos, alquenos y aros. Las señales coinciden con el espectro de infrarrojo obtenido con disco de KBr de la base de datos de SDBS (2003), donde la única diferencia es la intensidad de transmitancia de las señales debido al tipo de espectro de infrarrojo obtenido. El espectro de ^1H -RMN se caracterizó por exhibir un triplete a δ 3.64 ppm ($J=6.4$ Hz) de protones geminales a un grupo hidroxilo, con señales remanentes, consistentes con un alcohol primario saturado. La estimación de la cadena de 18 carbonos se determinó por el promedio del área de integración de las señales a δ 1.56, 1.28, 1.20 y 0.89. Una vez comparados estos desplazamientos con los reportados en la base de datos SDBS (2003) se estableció su identidad, siendo el primer reporte de alcoholes de cadena larga en especies de algas del género *Codium*. Los alcoholes de cadena larga son de amplia distribución en el medio terrestre y regularmente están asociados al contenido de ácidos grasos (Kaya *et al.*, 2003; Boussaada *et al.*, 2008; Tlili *et al.*, 2011). Este, es el primer reporte de 1-octadecanol en clorofitas y específicamente en *C. amplivesiculatum*, lo cual aumenta la incertidumbre con respecto a su significancia.

El **compuesto 2** fue identificado como clerosterol por comparación de las señales de ^1H -RMN con respecto a la literatura (Ahmad *et al.*, 1993; Sheu, *et al.*, 1995; Saleem, 2000) e identificado por primera vez a partir de *Codium fragile* (Rubinstein & Goad, 1974), *C. bursa* (Romeo & Toscano, 1983). Aunque en espectros de infrarrojo de esteroides similares como el fucosterol, demosterol,

estigmasterol y colesterol entre otros, se obtengan similitudes en las señales principales debido al núcleo que define el esteroide, la diferencia se hace visible en la orientación que tienen los grupos metilos y etilos. En el caso del estigmasterol (Figura 8), que tiene un espectro de infrarrojo muy parecido al clerosterol, las señales contienen metilos con otra orientación del doble enlace a partir del C-22, con un porcentaje de transmitancia entre el 90-95% en el rango de frecuencia entre el 0 y 700 cm^{-1} del espectro de infrarrojo, indicando que disminuyen los grupos metilos presentes (Figura 9), no así en el clerosterol, cuyos grupos metilos se encuentran más alejados del núcleo esteroide y muestra el porcentaje de transmitancias de grupos metilos en el mismo rango.

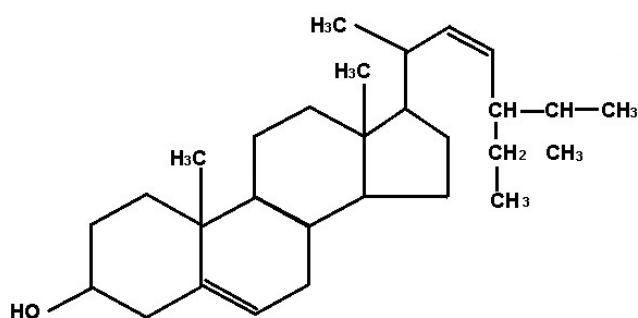


Figura 8. Estructura química del estigmasterol (24-etil-5,22-colestadien-3- β -ol), SDBS (2003).

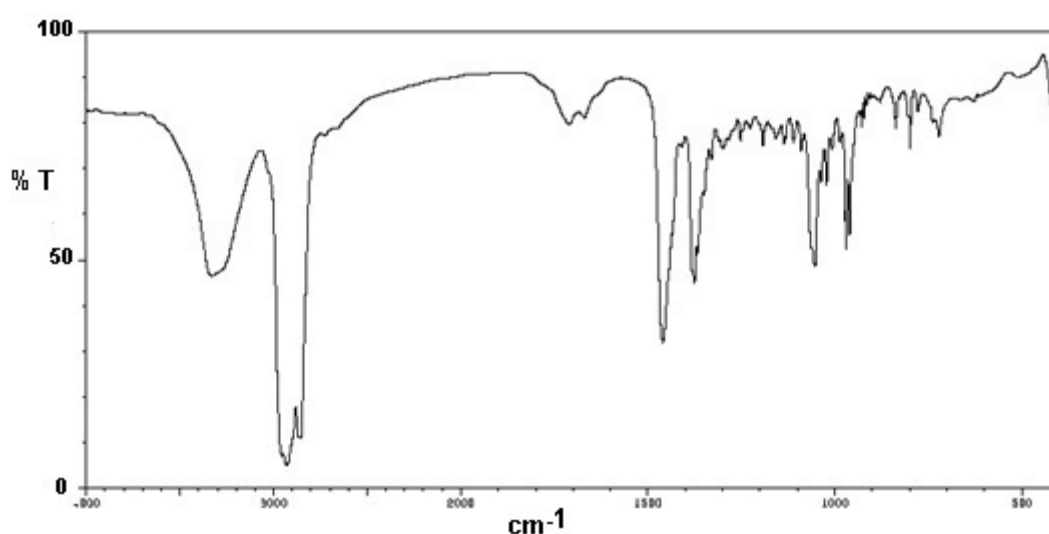


Figura 9. Espectro de IR-nujol de estigmasterol con diferencia de la orientación de metilos hacia la frecuencia entre 0 y 850 cm^{-1} (SDBS, 2003).

Además del clerosterol [(24S)-24-etilcolesta-5,25-dien-3 β -ol] se ha reportado el aislamiento de algunos derivados oxigenados a partir de *C. arabicum* (Sheu *et al.*, 1995), glucosilados de *C. iyengarii* (Ahmad *et al.*, 1992) y esterificados con cadenas de ácidos grasos (He *et al.*, 2010).

Hasta ahora queda manifiesta la importancia quimiotaxonómica del clerosterol, ya que de todos los géneros de macroalgas, *Codium* es la única macroalga que lo contiene y los esteroides son una base para clasificación de macroalgas. Las Rhodophyceae, que tienen esteroides de 27 carbonos predominando el colesterol, las Pheophyceae de 29 carbonos, con el fucosterol como componente principal.

La síntesis del clerosterol en plantas terrestres indica que hay transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-metionina, hacia la posición del carbono 28 del precursor de esteroles: 24-metileno-esteroles. Existe migración de protones del carbono 25 al 24 y posterior desprotonación del carbono 26, revelándose que la biosíntesis es por la alimentación del carbono 28 desde una posición 28-*si* (Koami *et al.*, 2002). Es precursor de fitoecdisteroides como ciasterona, isociasterona y 29-norciasterona en la planta *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* (Okuzumi *et al.*, 2003; Fujimoto *et al.*, 2000), lo que deja interrogantes en cuanto a la función como precursor y los alcances que pudiera tener en el metabolismo del género *Codium*.

Los compuestos **3** y **4** de *C. amplivesiculatum* quedaron pendientes de identificación debido a problemas técnicos.

El **compuesto 5(a)** (diacilglucoglicérido) mostró un R_f=0.44, similar al de los codiósidos, nombre propuesto para los compuestos provenientes de *C. iyengarii*, cuyas estructuras fueron definidas con ayuda de cromatografía de gases acoplado a masas, espectroscopía positiva FAB de masas y RMN de ¹H y ¹³C, hidrólisis ácida, de la cual se obtuvieron cuatro codiósidos (A, B, C y D, Figura 10) (Saleem, 2000). Estos codiósidos están compuestos por moléculas de glicérido unidos a una molécula de glucosa y en algunos casos de diterpenos acíclicos, esterificados con las cadenas de ácidos grasos.

La coincidencia de las señales de RMN de ¹H y ¹³C del **compuesto 5(a)** (CC20F5) con los desplazamientos químicos reportados por Saleem (2000), sugieren una estructura similar. Adicionalmente, el espectro de IR-ATR del compuesto **5** presentó bandas de absorción a 3490 cm⁻¹ características de los

grupos OH, 1745-1732 cm^{-1} atribuible al grupo funcional carbonilo (C=O), 1633 cm^{-1} para la insaturación del ácido graso (C=C) y de 1122 cm^{-1} para los enlaces éster (C-O).

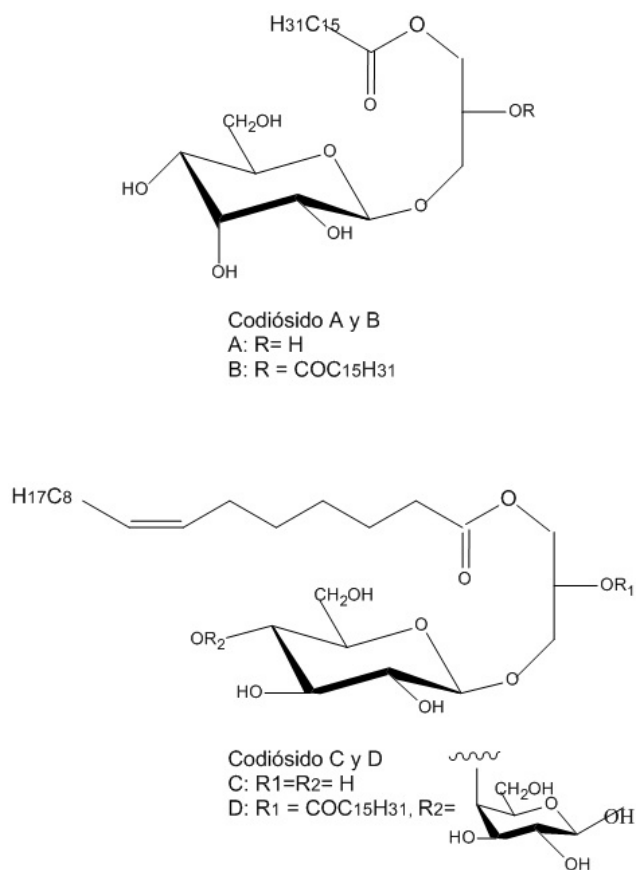


Figura 10. Estructura química del codiósido A, B, C y D. (Saleem, 2000).

Los productos naturales aislados de *C. simulans* de acuerdo al diagrama de fraccionamiento de la fracción orgánica (Figura 3), también correspondieron a clerosterol (**F2C5ESL1**) (**compuesto 2 (s)**) y el diacilglucoglicérido, **compuesto 5(s)** (**F1C6ESL1**) y **compuesto 5(s)** (**F1C7ESL1**), similar al reportado a partir de *C. iyengarii* (Saleem, 2000). Esto resulta interesante en el sentido de su utilidad como marcadores quimiotaxonómicos, al igual que el clerosterol. Esa idea se robustece con el aislamiento de los mismos compuestos a partir de *C. cuneatum* y *C. fragile*. Lo que sugiere que la maquinaria biosintética necesaria para la producción de estos metabolitos es altamente conservada en el género. En ese sentido, falta demostrar hasta que punto los glucoglicerolípidos como los codiósidos, son exclusivos de este género (Shuai *et al.*, 2005). Es necesario

comentar que aunque ya son compuestos conocidos, es la primera vez que se reportan para las especies del presente estudio.

7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de *Codium* spp. de B.C.S.

La actividad antimicrobiana de las fracciones de las especies de *Codium* ensayadas en este estudio no mostró ningún patrón específico. Esto último no resulta sorprendente, ya que la variación de la composición química de un organismo está influenciada por el ambiente en que se desarrolla y su estado fisiológico (Amsler, 2008). En el norte de Sri Lanka, se encontró que los extractos crudos etanólicos de *C. fragile* mostraron inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus* con halos de 10 y 9.2 mm respectivamente. En contraste con los resultados de este estudio, ningún extracto/fracción/compuesto mostró actividad contra *E. coli*. Las diferencias pueden ser explicadas en términos de las diferencias en los procedimientos de manejo de muestra y fraccionamiento (Jeyaseelan *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente estudio cinco fracciones de *C. amplivesiculatum*, dos de *C. cuneatum* y tres de *C. fragile* presentaron actividad contra *S. aureus*. Por otro lado, en las costas del Mar Caribe en Costa Rica, no se obtuvo efecto contra *S. aureus*, *E. coli*, *Erwinia carotovora* y el hongo *Geotrichum candidum*, ensayando con *C. isthmocladum* (Borbón *et al.*, 2012). En contraste, los extractos de *C. bursa*, *C. tomentosum* y *C. dichotomum* recolectados en costas de Marruecos resultaron activos contra *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y dos cepas diferentes de *Enterococcus faecalis* (Chiheb *et al.*, 2009). Adicionalmente, el extracto crudo de *C. fragile* mostró una CMI=1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra las microalgas *Neorhodella cynea* y *Prymnesium calathiferum*, causantes de la formación de biofilms en ambientes marinos. Los mismos extractos resultaron negativos contra *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. epidermis* (Águila, *et al.*, 2012), mientras que el extracto crudo de *C. fragile* recolectada de dos zona diferentes de Ensenada, B.C. México mostró una CMI=140.1 y 196.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, contra *Proteus mirabilis*, con resultados negativos para *Klebsiella pneumoniae* (Villarreal *et al.*, 2010). Sin embargo, el extracto obtenido con diclorometano de *C. decorticatum* recolectado en San Juan de los Cayos en Venezuela, fue moderadamente (++) activo contra *K. pneumoniae* y negativo contra *Candida albicans*, *Pseudomona aeuroginosa* y *S. aureus* (Ríos *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la variación estacional tiene efecto sobre la

síntesis de metabolitos antimicrobianos, como en el caso de macroalgas colectadas en la costa atlántica y la costa mediterránea de la península Ibérica, donde las especies de *Codium* fueron ensayadas como algas frescas y liofilizadas contra las bacterias *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, observándose que en el estado fresco y en todas las estaciones del año, no hubo ninguna actividad contra todos los microorganismos, donde las algas de *Codium* pertenecieron casi todas a la costa mediterránea de dicha península. Solo *C. coralloides* tuvo actividad en el verano contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *S. aureus*, con valores de halos de inhibición de 10.6, 12.6 y 12.6 mm respectivamente y *C. vermilara* tuvo actividad en el verano contra *Bacillus cereus* y *S. aureus* con 11.9 y 11.9 mm respectivamente y en el otoño, tuvo actividad contra *Bacillus subtilis* 24.7 mm de halo de inhibición (Salvador *et al.*, 2007). Esto demuestra que las condiciones ambientales y las condiciones de procesamiento de las algas, tienen un efecto primordial y que la investigación para la identificación de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, deberá estar enfocada también a la identificación de las condiciones más idóneas para el tiempo y el lugar de recolecta de las algas. También las especies con actividad antimicrobiana deberán situarse en localidades determinadas, ya que hay recolectas como la de *C. giraffa* de Cacalotepec, Oaxaca, que no tuvieron actividad biológica contra *S. aureus* y *S. pyogenes* (De Lara-Isassi *et al.*, 1996).

Con respecto a la variación de actividad antibacteriana de los diferentes tipos de clerosterol (clerosterol, galactósido de clerosterol y el iyengarósido-B), se confirma la molécula de clerosterol base, no es activa contra las bacterias, ya que se ha reportado inactiva contra *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, pero el galactósido de clerosterol (con esterificación de galactosa en el carbono 3 del núcleo esteroideal) fue activo contra bacterias con halos de inhibición de 16 mm, 14 mm y 14 mm respectivamente, a una concentración de 21 µg/100 mL en DMSO, con referencia de amoxicilina y ampicilina para *E. coli* y de tetraciclina para las otras bacterias. Y a su vez, el iyengarósido-B (7-O-β-D-fucosido-3-oxo-4-en clerosterol), mostró actividad moderada contra las bacterias *Corynebacterium diphtheriae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* y *S. aureus*, con halos de inhibición de 14 mm para todas las bacterias, a una concentración de 39 µg/100 mL en DMSO, con referencia de tetraciclina para todas las bacterias (Saleem, 2000). Al contrastar con la actividad antimicrobiana de los compuestos

de clerosterol y posibles codiósidos de las especies de *Codium* de este estudio, se confirma que la estructura base de clerosterol es más limitada para dicha actividad antibacteriana y que el hecho que en la molécula de clerosterol se tengan sustituciones de carbohidratos, incrementa la actividad, además de los efectos que pueden causar otros grupos funcionales como cetónicos ó ácidos carboxílicos.

Como puede apreciarse, los efectos de los diferentes tipos de extractos contra cepas bacterianas de diferentes zonas geográficas, el tipo de cepa adaptada al medio y su clasificación internacional que tiene, difieren a tal grado que se requiere la obtención de sustancias activas bactericidas de estos microorganismos y de acuerdo a la influencia sobre el metabolismo microbiano, seguir utilizando los metabolitos secundarios, como una base para la síntesis química de los medicamentos contra las cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

7.3 Evaluación de la actividad antituberculosis

Dentro de las fracciones obtenidas del extracto orgánico etanólico de *C. amplivesiculatum*, la fracción 2 tuvo efecto significativo con una CMI=100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, contra *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que el resto de la fracción CC2F2, se continuó fraccionando hasta la obtención del **compuesto 1** que se presentaba en mayor cantidad, dando como resultado el compuesto CC12F3, con una cantidad de 8.4 mg.

El **1-octadecanol (compuesto 1)** (8.4 mg) y el **clerosterol (compuesto 2(a))**, no se ensayaron contra *M. tuberculosis*, cepa HR37Rv, debido a problemas técnicos con la campana de bioseguridad.

En función de de los antecedentes de actividad antituberculosis con alcoholes de cadena entre C₅ y C₁₃, donde la mejor actividad contra dos cepas del género *Mycobacterium*: *M. smegmatis* mc² 155 (ATCC 25618) y *M. tuberculosis* H₃₇R_v, fueron inhibidas a diferentes concentraciones con los alcoholes siguientes: [4.4 mM μL^{-1} con 1-heptanol, 1.96 mM μL^{-1} con 1-octanol, 0.88 mM μL^{-1} con 1-nonanol, 0.40 mM μL^{-1} con 1-decanol, 1.28 mM μL^{-1} con 1-undecanol] y [3.93 mM μL^{-1} con 1-octanol, 1.77 mM μL^{-1} con 1-nonanol, 0.80 mM μL^{-1} con 1-decanol, 2.97 mM μL^{-1} con 1-undecanol] respectivamente, con mayor afinidad sobre los lípidos de las membranas de estas cepas (Mukherjee *et al.*, 2013).

También una mezcla de 1-alcanoles de cadena larga (C₂₈-C₃₂), tuvo efecto sobre la cepa HR37Rv, de *M. tuberculosis*, obtenidos de la planta terrestre *Alpinia purpurata* (Gengibre rojo), Villaflores *et al.*, 2010). En bioensayos de utilización de alcanoles dentro de los que se probó 1-octadecanol obtuvo un efecto inhibitorio contra *S. aureus* cepa FDA209P, inhibiendo el crecimiento totalmente en 24 h. Los alcanoles de 1-nonanol, 1-tetradecanol y 1-pentadecanol, tuvieron más tiempo de retraso para el crecimiento de la bacteria (Togashi *et al.*, 2007). La distribución en la naturaleza de los alcoholes de cadena larga es ampliamente conocida (Kaya *et al.*, 2003; Boussaada *et al.*, 2008; Tlili *et al.*, 2011), pero para el caso del contenido de 1-octadecanol en *C. amplivesiculatum*, es la primera vez que se reporta. La importancia de este resultado, es uno de los pocos reportes existentes de alcohol de cadena larga en clorofitas (Hayee-Memom *et al.* 1991).

7.4 Evaluación de la actividad antiviral

Los ensayos antivirales con extractos de algas se han enfocado principalmente a determinar su efecto en la inhibición del virus del herpes simplex (HSV-1 y HSV-2). Las moléculas investigadas, corresponden a polisacáridos sulfatados de algas clorofitas, rodofitas y feofitas (Tabla 17) (Hudson *et al.*, 1999; Cassolato *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Ohta *et al.*, 2009; Bouhlal *et al.*, 2010; Jung-Bum *et al.*, 2011).

Codium fragile tuvo efecto virucida con una concentración de 62.5 µg mL⁻¹ contra el virus sindbis (SINV), causante de una enfermedad parecida al dengue, con fiebre y artralgia, transmitida por mosquitos culex y mamíferos (Hudson *et al.*, 1999).

Es importante apreciar que la obtención de los compuestos activos obedece nuevamente a las condiciones de extracción, al estado metabólico del alga y los múltiples factores ecológicos en el que se desarrollaba (Amsler, 2008). Las condiciones de secado o afectación de los metabolitos por la exposición a diferentes condiciones ambientales en el momento de la extracción (presión de vapor, temperatura, vapores de otros solventes de químicos de uso común en el laboratorio, etc.) (Levy *et al.*, 2000).

Un elemento a considerar para aplicar una sustancia antiviral en humanos, es que ésta sea lo más inocua posible, ya que también en la desición

de utilizar una sustancia que es virucida, está el concepto de “índice selectivo”, el cual se refiere al mayor efecto de inhibir el desarrollo de la infección, con la menor citotoxicidad en las células huésped (Wang *et al.*, 2008).

Los reportes actividad antiviral de especies de *Codium* se enfocan al estudio de polisacáridos sulfatados, los cuáles se han obtenido a partir de extractos acuosos que después se dializan en columnas de celulosa (Ohta *et al.*, 2009). Con los dos compuestos aislados en este estudio: **clerosterol - compuesto 2(a)-** y **posible codiósido –compuesto 5(a)-**, se demostró una actividad antiviral efectiva contra el virus del dengue DENV 2 cepa Nueva Guinea C, con una concentración de $150 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para obtener una infección del 59.92% y 26.21% respectivamente para cada compuesto.

El mejor índice selectivo (SI) obtenido con el **compuesto 5(a)**, nos indicó una menor infección con alta viabilidad celular (células Huh-7), con el porcentaje de inhibición de la infección igual a 73.79%.. Esto nos permite plantear nuevas hipótesis sobre el efecto antiviral de los compuestos conocidos como codiósidos, ya que también se han realizado bioensayos de actividad profiláctica con polisacáridos sulfatados y se puede realizar este ensayo con los codiósidos de *Codium* (Ohta *et al.*, 2009).

7.5 Evaluación citotóxica de las fracciones purificadas obtenidas de *C. amplivesiculatum*

Los efectos citotóxicos débiles de los compuestos **compuestos 2(a), 2(a')** y **5(a)**, no permiten considerarlos para pasar a otra fase de experimentación, ya que los tipos de clerosteroles **2(a), 2(a')** y el posible codiósido **5(a)**, mostraron valores de citotoxicidad bajos (Tabla 14) y que la diferencia de citotoxicidad de las dos sustancias identificadas como clerosteroles (a los niveles de 4.39% de inhibición del crecimiento para la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y de 7.18% para las células de cáncer de colon HCT-15), es debida a una diferencia en la estructura química, como lo confirma la mayor actividad de los clerosteroles oxigenados contra líneas celulares de cáncer humano, reportados por Sheu y *colaboradores* (1995), quienes encontraron que la molécula de clerosterol, pero con sustituciones de grupos funcionales (O^{-2} , OH^{-1} y OOH^{-1} en los carbonos 4, 5, 6 y 7) mostraron ED_{50} entre 0.2 y $2.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre líneas celulares de cáncer

humano nasofaríngeo (KB), de leucemia linfocítica de ratón (P-388), de cáncer humano de pulmón (A-549) y de cáncer humano de colon (HT-29).

El compuesto 5(a) confirma que es inócuo para las paredes celulares de las células cancerosas, ya que la máxima citotoxicidad del 36.3% de inhibición de células cancerosas de mama (MCF-7) a una concentración de 150 ng μL^{-1} , contrasta con la baja citotoxicidad sobre la línea celular de hepatocitos humanos (Huh-7) del 16% (Tabla12), obtenida previamente como condición para compuestos destinados a uso antiviral.

8. CONCLUSIONES

Las fracciones de extractos orgánicos de *Codium amplivesiculatum* (11 fracciones), *C. simulans* (6 fracciones), *C. cuneatum* (4 fracciones) y *C. fragile* (6 fracciones), contienen sustancias antibióticas contra las bacterias de *Staphylococcus aureus* (ATCC-BAA-42), *Streptococcus pyogenes* (ATCC-BAA-946), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC-17802), *V. alginolyticus* (ATCC-17749) y *V. harveyi* (ATCC-14126).

La actividad antibacteriana de las fracciones de los extractos orgánicos de cada especie de *Codium* probada, puede potenciarse al purificar los compuestos que posean esta actividad.

La diferencia de tamaño en los halos de inhibición obtenidos con el extracto orgánico de las especies de *Codium* en estudio, confirman la presencia de diferentes principios activos que pueden actuar en conjunto contra el tipo de bacterias ensayadas, como lo mostraron los halos máximos de inhibición obtenidos con extractos orgánicos de *C. amplivesiculatum* (9.5 mm, 17.5 mm y 8 mm) contra las bacterias de *S. aureus*, *S. pyogenes* y *V. parahaemolyticus*; de *Codium simulans* (7 mm, 12.5 mm y 10.5 mm) contra *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. harveyi*; de *Codium cuneatum* (14 mm, 8.5 mm y 11.5 mm) contra *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*; de *Codium fragile* (8.5 mm, 8.0 mm y 10 mm) contra *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* respectivamente.

Los compuestos de clerosterol 2(a) y 2(a') y los posibles codiósidos obtenidos, de acuerdo con la estructura química confirmada con los espectros de protón ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN, son inactivos contra los tipos de bacterias

ensayadas en este estudio, debido a que estas configuraciones químicas no tienen efecto sobre las paredes celulares bacterianas, como sucede con las estructuras de clerosterol con grupos funcionales sustituidos de azúcares, cetonas y ácido carboxílico.

La actividad antituberculosis del **compuesto 1 (1-octadecanol)**, no se demostró como compuesto puro, pero las características de experimentos anteriores con alcoholes de cadena larga, nos inducen a aceptar que este compuesto fue el responsable de la actividad antituberculosis, ya que fue aislado de la fracción correspondiente (CC2F2) de *C. amplivesiculatum*, con una CMI de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y que no se pudo ensayar por problemas técnicos para realizar la determinación.

El **compuesto 5(a)**, con una estructura química de glucoglicerolípido, generó un nivel aceptable de actividad antiviral (73.8% de inhibición de la infección), contra el virus del dengue tipo 2 (DENV2) con una concentración de $150 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, cumpliendo con la condición de un buen índice selectivo de inhibir el desarrollo de la infección y no ser citotóxico a la línea celular de hepatocitos humanos (Huh-7), contrastando con los registros bibliográficos de actividad antiviral de polisacáridos sulfatados derivados de extractos de *Codium*, lo que nos permite plantear nuevas hipótesis sobre la actividad antiviral de los compuestos conocidos como codiósidos.

Los **compuestos 2(a)** (clerosterol) y **5(a)** (glucoglicerolípido), no se consideraron efectivos contra las líneas celulares de carcinoma humano: de próstata (PC-3), de cáncer de colon (HCT-15) y de cáncer de mama (MCF-7), con un débil porcentaje de inhibición del crecimiento. El resultado de la baja citotoxicidad del **compuestos 5(a)** en células cancerosas, contrasta con el obtenido para la citotoxicidad de este compuesto en la línea celular de hepatocitos humanos (Huh-7) (93% a concentración de $150 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$).

Los compuestos aislados de las cuatro especies de *Codium* de este estudio, confirmaron la importancia quimiotaxonómica que representa el clerosterol, obtenido por primera vez en *C. amplivesiculatum*, *C. simulans* y *C. cuneatum* y reafirmado para *C. fragile*, confirmado con los espectros de $^1\text{H-RMN}$ para *C. amplivesiculatum* y de IR-ATR para las cuatro especies.

La obtención de glucoglicerolípidos (codiósidos) similares en las cuatro especies de *Codium* en estudio, sugiere que también representa importancia

quimiotaxonómica, aunque no exclusiva para las especies de *Codium*, ya que son moléculas ampliamente distribuidas en macroalgas. Es la primera vez que se realiza la identificación de compuestos tipo codiósido en las especies de *Codium* en el presente estudio.

9. REFERENCIAS

- Águila-Ramírez, R.N., A. Arenas-González, C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta, J.M. Borges-Souza, B. Verón, J. Pope & C. Hellio. 2012. Antimicrobial and antifouling activities achieved by extract of seaweeds from Gulf of California, Mexico. *Hidrobiológica*, 22(1):8-15.
- Ahmad, V.U., R. Aliya, S. Perveen & M. Shameel. 1992. A sterol glycoside from marine green alga *Codium iyengarii*. *Phytochemistry*, 31(4):1429-1431.
- Ahmad, V.U., R. Aliya, S. Perveen & M. Shameel. 1993. Sterols from marine green alga *Codium decortiatum*. *Phytochemistry*, 33:1189-1192.
- Aknin, M., R. Moellet-Nzaou, J.M. Kornprobst, E.M. Gaydou, A. Samb & J. Miralles. 1992. Sterol composition of twelve chlorophyceae from the senegalese coast and their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, 31(12):4167-4169.
- Alí, M.S., M. Saleem, S. Shameel & U. Ahmad. 2001. Phytol and glycerol derivatives from the marine green alga *Codium ivengarii* of Karachi-coast (Arabian sea). *J. Naturforsch.*, 56b:837-841.
- Alí, M.S., M. Saleem, R. Yamdagni & M.A. Alí. 2002. Steroids and antibacterial steroidal-glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* Borgesen. *Nat. Prod. Lett.*, 16(4):407-413.
- Aliya, R., M. Shameel, K. Usmanghani & V.U. Ahmad. 1991. Analysis of fatty acids from *Codium iyengarii* (Bryopsidophyceae). *Pak. J. Pharm. Sci.*, 4(2):103-111.
- Alvarez-Hernández, S., de Lara-Isassi, G., Arreguin-Espinoza, R., Arreguin, B., Hernández-Santoyo, A. & Rodríguez-Romero, A. 1999. Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. *Bot. Mar.*, 42: 573-580.
- Amsler, CH.D., K. Iken, J.B. McClintock, M.O. Amsler, K.J. Peters, J.M. Hubbard, F.B. Furrow & B.J. Baker. 2005. Comprehensive evaluation of the palatability and chemical defenses of subtidal macroalgae from the Antarctic Peninsula. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 294:141–159.
- Amsler, CH.D. 2008. Algal Chemical Ecology. Amsler CH.D. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 321 p.

- Anjaneyulu, A.S.R., C.V.S. Prakash & U.V. Mallavadhani. 1991. Two caulerpin analogues and sesquiterpene from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 30(9):3041-3042.
- Bhakuni, D.S. & D.S. Rawat. *Bioactive marine natural products*. 2005. Springer. N.Y. USA, with Anamaya Publisher. Nueva Deli, India. 396 pp.
- Barrett, C.T. & J.F. Barrett. 2003. Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems?. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(6):621-626.
- Bhakuni, D.S. & D.S. Rawat. *Bioactive marine natural products*. 2005. Springer. N.Y. USA, with Anamaya Publisher, New Delhi India, 396 pp.
- Bilan, M.I., E.V. Vinogradova, A.S. Shashkov & A. Usov. 2006. Isolation and preliminary characterization of a highly pyruvylated galactan sulfate from *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Bot. Mar.*, 49:259–262.
- Bilan, M.I., E.V. Vinogradova, A.S. Shashkov & A.I. Usov. 2007. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Carb. Res.*, 342:586-596.
- Blunt J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2003. Marine Natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 20:1-48.
- Blunt J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. 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.R. Prinsep. 2005. Marine Natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 22:15-61.
- Blunt J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. 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.R. Prinsep. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 24:31-86.
- Blunt J.W., B.R. Copp, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2008. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 25:35-94.
- Blunt J.W., B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 26:170-244.
- Blunt J.W., B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2010. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 27:165-237.
- Blunt J.W., B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2011. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 28:166-268.

- Blunt, J.W., B.R. Copp, R.A. Keyzers, H.G. Munro & M.R. Prinsep. 2012. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 29:144-222.
- Borbón, H., J.M. Herrera, M. Calvo, H. Trimiño, L. Sierra, R. Soto & I. Vega. 2012. Antimicrobial activity of most abundant marine macroalgae of the Caribbean coast of Costa Rica. *J. Asian Sci. Res.*, 2(5):292-299.
- Bouhlal, R., H. Riadi & N. Bourgougnon. 2010. Antiviral activity of the extracts of Rhodophyceae from Morocco. *Afr. J. Biotech.*, 9(46):7968-7975.
- Boussaada, O., S. Ammar, S. Saidana, J. Chriaa, I. Charif, M. Daami, A. N. Helal & Z. Mighri. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiol. Res.*, 163(1): 87-95.
- Cassolato, J.E.F., M. D. Nosedá, C.A. Pujol, F.M. Pellizzari, E. B. Damonte & M.E.R. Duarte. 2008. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carb. Res.*, 343():3085-3095.
- Chiheb, I., H. Riadi, J. Martínez-López, J.F. Domínguez-Seglar, J.A. Gómez-Vidal, H. Bouziane & M. Kadiri. 2009. Screening of antibacterial activity in marine green and Brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr. J. Biotech.*, 8(7):1258-1262.
- Ciancia, M., I. Quintana, M.I. Vizcargüénaga, L. Kasulin, A. De-Dios, J.M. Estevez & A.S. Cerezo. 2007. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 41:641–649.
- Cisar, J.O., A.L. Sandberg, Ch. Abeygunawardana, G.P. Reddy & C.A. Bush. 1995. Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharides. *Glycobiology*, 5(7):655-662.
- Cisar, J.O., A.L. Sandberg, G.P. Reddy, Ch. Abeygunawardana, & C.A. Bush. 1997. Structural and antigenic types of cell wall polysaccharides from viridans group streptococci with receptors for oral actinomyces and streptococcal lectins. *Infect. Immun.*, 65(12):5035-5041.
- Czapla, T. H. & B. A. Lang. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 83(6):2480-2485.

- Damonte, E.B., M.C. Matulewicz & A.S. Cerezo. 2004. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.*, 11(18):2399-2419.
- De Lara-Isassi, G., S. Álvarez-Hernández & C. Lozano-Ramírez. 1996. Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, 44(2):895-898.
- Dembitsky, V.M., H. Rezanková, T. Rezanka & L.O. Hanus. 2003. Variability of the fatty acids of the marine green algae belonging to the genus *Codium*. *Bioch. Syst. Ecol.*, 31:1125-1145.
- De Sousa M.B., K.M. Pires, D.B. De Alencar, A.H. Sampaio & S. Sampaio. 2008. α - and β -carotene and α -tocopherol in fresh seaweeds. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28(4):953-958.
- El-Masry, M.H., M.H. Mostafa, A.M. Ibrahim & M.M.A. El-Nagar. 1995. Marine algae that display anti-tumorigenic activity against *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microb. Lett.*, 128(2):151-155.
- Etahiri, S., V. Bultel-Ponce, C. Caux & M. Guyot. 2001. New bromoditerpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. *J. Nat. Prod.*, 64:1024-1027.
- Fabregas J., A. Muñoz, J. Llovo & A. Carracedo. 1988. Purificación and partial characterization of tomentina. An N-acetylglucosamine-specific lectin from green alga *Codium tomentosum* (Huds.) Stackh. *J. of Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 124(1):21-30.
- Farias, E.H.C., V.H. Pomin, A.P. Valente, H.B. Nader, H.A.O. Rocha & P. A. S. Moura. 2008. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology*, 18(3):250-259.
- Febles, C.I., A. Arias, A. Hardisson, A.S. López & M.C. Gil. 1995. Antimicrobial activity of extracts from some Canary species of Phaeophyta and Chlorophyta. *Phyt. Res.*, 9(5):385-387.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1(1):27-31.
- Folmer F., Jaspars M., Dicato M. & Diederich M. 2010. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. *Phytochem. Rev.*, 9:557-579.

- Fujimoto, Y., K. Ohyama, K. Nomura, R. Hyodo, K. Takahashi, J. Yamada & M. Morisaki. 2000. Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga* hairy roots. *Lipids*, 35(3):279-288.
- Fusetani, N. 2010. Biotechnological potential of marine natural products. *Pure Appl. Chem.*, 82(1):17-26.
- Goecke, F., V. Hernández, M. Bittner, M. González, J. Becerra & M. Silva. 2010. Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.*, 45(2):325-330.
- Goldstein, I. J., & R. D. Poretz. 1986. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (Liener, I. E., Sharon, N. & Goldstein, I. J., eds.), Academic Press, Orlando, FL., pp. 35-247.
- Griffin, R.L., D.J. Rogers, P.T. Spencer-Phillips & L. Swain. 1995. Lectin from *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* conjugated to colloidal gold: a new histochemical reagent. *Br. J. Biomed. Sci.*, 52:225-227.
- Gudipati, C.S., J.A. Finlay, J.A. Callow, M.E. Callow & K.L. Wooley. 2005. The antifouling and fouling-release performance of hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-Poly(ethyleneglycol) (PEG) composite coatings evaluated by adsorption of biomacromolecules and the green fouling alga *Ulva*. *Langmuir*, 21(7):3044-3053.
- Guiry, M.D. & G.M. Guiry. 2013. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado: 1 de Marzo de 2013.
- Hahnenberger, R. & A. Jakobson. 1991. Antiangiogenic effect of sulphated and nonsulphated glycosaminoglycans and polysaccharides in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Glycoconjugate J.*, 8(4):50-353.
- Hay, M. E., Q. E. Kappel & W. Fenical. 1994. Synergisms in plant defenses against herbivores: interactions of chemistry, calcification, and plant quality. *Ecology*, 75:1714.
- Hayee-Memom, A., M. Shameel, M. Ahmad, V. U. Ahmad & K. Usmanhani. 1991. Phytochemical studies on *Gracilaria foliifera* (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 34(2):107-111.
- He, Z., X. Lei, Y. Zhou, J. Sun & A. Zhang. 2006. Crystal structure of stigmasta-4,25-diene-3 β ,6 β -diol, C₂₉H₄₈O₂. *Z. Kristallogr.*, 221:477-478.

- He, Z., A. Zhang, L. Ding, X. Lei, J. Sun & L. Zhang. 2010. Chemical composition of the green alga *Codium divaricatum* Holmes. *Fitoterapia*, 81(8):1125-1128.
- Hoekstra, D., N. Düzgünes & J. Wilschut. 1985. Agglutination and fusion of globoside GL-4 containing phospholipid vesicles mediated by lectins and calcium ions. *Biochemistry*, 24(3):565-572.
- Hoffman, R., D.H. Paper, J. Donaldson & H. Vogl. 1996. Inhibition of angiogenesis and murine tumor growth by laminarin sulphate. *Br. J. Cancer*. 73:1183-1186.
- Holdt, S.L & S. Kraan. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.*, 23(3):543-597.
- Hudson, J.B., J.H. Kim, M.K. Lee, M.E. DeWreede & Y.K. Hong. 1999. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *J. Appl. Phycol.*, 10:427–434.
- Ivanchina, N.V., A.A. Kicha, V.A. Stonik. 2011. Steroid glycosides from marine organisms. *Steroids*, 76:425-454.
- Jeyaseelan, E.C., S. Kothai, R. Kavitha, S. Tharmila & A.C. Thavaranjit. 2012. Antibacterial activity of some selected algae present in the costal lines of Jaffina Peninsula. *Int. J. Pharm. & Biol. Arch.*, 3(2):352-356.
- Jiang R.W., Lane A.L., Mylacraine L., Hardcastle K.I., Fairchild C.R., Hay M.E. & Kunanek J. 2008. Structures and absolute configurations of sulfate-conjugated triterpenoids including an antifungal chemical defense of the green macroalga *Tydemania expeditionis*. *Nat. Prod.*, 71(9):1616-9.
- Jung-Bum, L., T. Azumi, H. Kyoko & H. Toshimitsu. 2011. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*. *Carb. Polym.*, 86:995-999.
- Kadokami, K., N. Yoshida, K. Mizusaki, K. Noda & S. Makisumi. 1990. Some properties of trypsin-like proteases extracted from the seaweed *Codium fragile* and their purification. *Mar. Biol.*, 107:513-517.
- Kapetanovic, R., D. Sladic, S. Popov, M. Zlatovic, Z. Kljajic & M.J. Gasic. 2005. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. *J. Serb. Chem. Soc.*, 70(12):1395-1400.
- Kaya, A., B. Demirci & K. H. C. Baser. 2003. Glandular trichomes and essential oils of *Salvia glutinosa* L. *S. Afr. J. Bot.*, 69(3):422-427.

- Khan, A.M., M. Ameen, S. Naz & S. Noureen. 2012. Bioscreening of Marine Organisms from the coasts of Pakistan. *J. Chem. Soc. Pak.*, 34(1):184-194.
- Kim, J.H., J.B. Hudson, A.M. Huang, K. Bannister, H. Jin & T.J. Choi. 1997. Biological activities of seaweed extracts from British Columbia, Canada, and Korea. I. Antiviral activity. *Can. J. Bot.*, 75:1656–1660.
- Kim, K.N., K.W. Lee, C.B. Song & Y.J. Jeon. 2006. Cytotoxic activities of green and brown seaweeds collected from Jeju Island against four tumor cell lines. *J. Food Sci. Nutr.*, 11:17–24.
- Kim, S.K., Y.D. Ravichandran, S.B. Khan & Y.T. Kim. 2008. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotech. & Bioproc. Eng.*, 13:511-513.
- Kim, A.D., Y. Lee, S.H. Kang, G.Y. Kim, H.S. Kim & J.W. Hyung. 2013. Cytotoxic effect of clerosterol isolated from *Codium fragile* on A2058 human melanoma cells. *Mar. Drugs*, 11:418-430.
- Kimiya, T., K. Ohtani, S. Satoh, Y. Abe, Y. Ogita, H. Kawakita, H. Hamada, Y. Konishi, S. Kubota & A. Tominaga. 2008. Inhibitory effects of edible marine algae extracts on degranulation of RBL-2H3 cells and mouse eosinophils. *Fish. Sci.*, 74:1157-1165.
- Kintzios, S.E. & M.G. Barberaki. 2003. *Plant that fight cancer*, CRC Press, 314 pp.
- Koami, T., K. Ohyama & Y. Fujimoto. 2002. Mechanism of clerosterol biosynthesis in *Ajuga hairy* roots: stereochemistry of C-28 methylation of 24-methylene sterol. *Tetrahedron Lett.*, 43:5479-5781.
- Kovganko, N.V. & Zh.N. Kashkan. 1999. Sterol glycosides and acylglycosides. *Chem. Nat. Comp.*, 35(5):229-259.
- Lee, J.B., K. Hayashi, M. Maeda & T. Hayashi. 2004. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. *Planta Med. Sep.*, 70(9):813-817.
- Levy, L.M., G.M. Cabrera, J.E. Wright & A.M. Seldes. 2000. Bioactive Metabolites Produced by Fungi Cultures. *Molecules*, 5:354-355
- Lincoln, R. A., K. Strupinski & J. M. Walker. 1991. Bioactive compounds from algae. *Life Chem. Rep.*, 8:97-183.
- Masuda, M., S.Kawaguchi, Y. Takahashi, K. Okamoto & M. Suzuki. 1999. Halogenated secondary metabolites of *Laurencia similis* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 42:199-202.

- Matsubara K., K. Hori, Y. Matsuura & K. Miyazawa. 1999. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry*, 52(6):993-999.
- Matsubara, K., Y. Matsuura, K. Hori & K. Miyazawa. 2000. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. *J. Appl. Phycol.*, 12:9–14.
- Matsubara K., Y. Matsuura, A. Bacic, M.L. Liao, K. Hori & K. Miyazawa. 2001. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 28:395-399.
- Matsubara, K., M. Mori, H. Matsumoto, K. Hori & K. Miyazawa. 2003. Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *J. Appl. Phycol.*, 15:87-90.
- McClintock J.B. & Baker B.J. 2001. *Marine Chemical Ecology*, CRC Press LLC. 610 pp.
- 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 *Floreunsia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Med. Res.* 37(1):45-49.
- Morales, J.L., Z.O. Cantillo, I. Sánchez, G.J. Mena. 2006. Screening of antibacterial and antifungal activities of six marine macroalgae from coasts of Yucatán peninsula. *Pharm. Biol.*, 44(8):632-635.
- Mukherjee, K., P. Tribedi, B. Mukhopadhyay & A. K. Sil. 2013. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against mycobacteria. *FEMS Microb. Lett.* 338(2):177-183.
- Muñoz, M., A. Murillo, G. Molina & J. Vargas. Antibacterial and cytotoxic screening of algal extracts from Baja California, México. XX International Seaweed Symposium. Ensenada, Baja California, México. February 22-26. 2010a.
- Muñoz, M., A. Murillo, L. Zermeño, S. Martínez & R. Rodríguez. 2010b. Screening of extracts of algae from Baja California Sur, México as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 14:739-747.
- Nagano, C.S. 2007. *Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y de vegetales superiores*. Tesis de doctorado. Instituto de Biomedicina de Valencia. Universidad de Valencia, España. 140 p.

- Nakazawa, S., F. Abe, H. Kuroda, K. Kohno, T. Higashi & I. Umezaki. 1976. Antitumor effect of water extracts from marine algae (III) *Codium pugniformis* Okamura. *Chemotherapy (Japan)*, 24:448–450.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; 5th Ed. NCCLS document M7-A5. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Newman, D.J., G.M. Cragg & K.M. Snadder. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66(7):1022-1037.
- Nika, K., B.Mullo, B. Carpenter & R. Gibbs. 2003. Specific recognition of immune cytokines by sulphated polysaccharides from marine algae. *Eur. J. Phycol.*, 38:257-264.
- Okuzumi, K., N. Hara, Y. Fujimoto, J. Yamada, A. Nakamura, K. Takahashi & M. Morisaki. 2003. Biosynthesis of phycoecdysteroids in *Ajuga hairy* roots: clerosterol as precursor of cyasterone, isocyasterone and 29-norcyasterone. *Tetrahedron Lett.*, 44:323-326.
- Otha, Y., L. Jung-Bum, H. Kyoko & H.Toshimitsu, 2009. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Biol Pharm. Bull.*, 32(5):892-898.
- Pardee, K.I., P. Ellis, M. Bouthillier, G.H.N. Towers & C.J. French. 2004. Plant virus inhibitors from marine algae. *Can. J. Bot.*, 82:304-309.
- Patchett, R.A., A.F. Kelly & Kroll R.G. 1991. The adsorption of bacteria to immobilized lectins. *J. Appl. Microb.*, 71(3):277-284.
- Rindi, F., A. Soler-Vila & M.D. Guiry. 2012. Taxonomy of marine macroalgae used as sources of bioactive compounds. In: *Marine Bioactive Compounds. Sources, Characterization and Applications*. Chap. 1. Maria Hayes Ed. Springer. 229 p.
- Ríos, N., G. Medina, J. Jiménez, C. Yáñez, M.Y. García, M.L. Di-Bernardo & M. Gualtieri. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. Peru. Biol.*, 16(1):97-100.
- Rizvi, M. A. & M. Shameel. 2005. Pharmaceutical biology of seaweeds from Karachi coast of Pakistan. *Pharm. Biol.*, 43(2):97-107.
- Romeo, G. & M.A. Toscano. 1983. The isolation and characterization of (24S)-metilcolesta-5,25-dien-3 β -ol from siphonous marine alga *Codium bursa*. *J. Nat. Prod.*, 46(2):187-189.

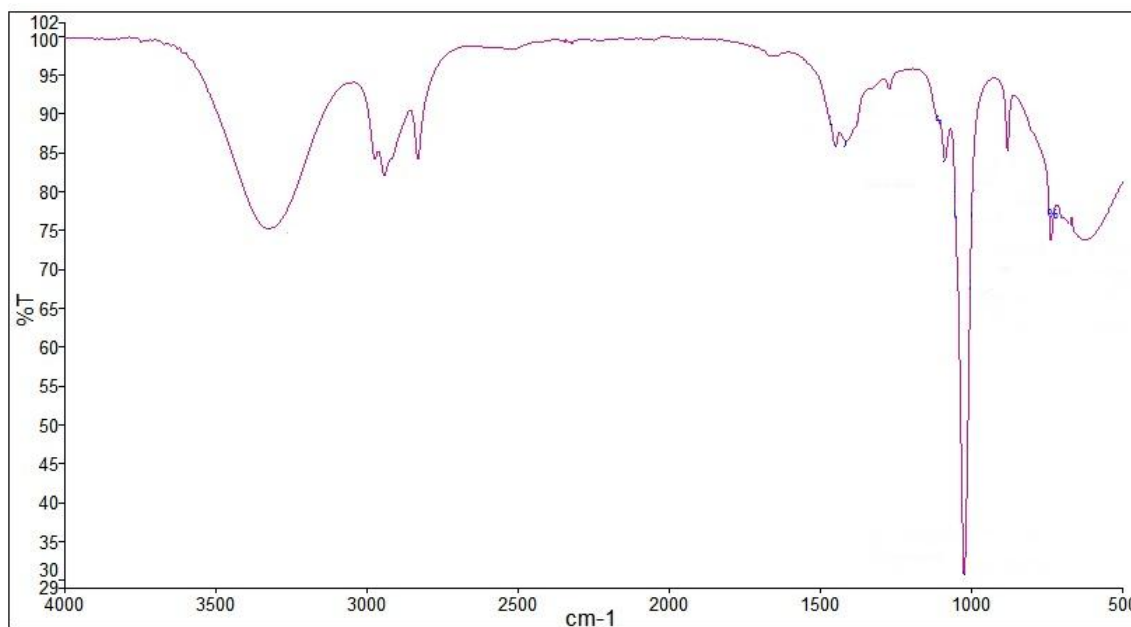
- Roussis, V., C. Vagias & L.A. Tziveleka. 2004. Cytotoxic metabolites from marine algae, 195-241. En: Kintzios S.E. & M.G. Barberaki (Eds.) *Plants that Fight Cancer*, CRC Press. Washington, USA.
- Rubinstein, I. & L.J. Goad. 1974. Sterols of the siphonous marine alga *Codium fragile*. *Phytochemistry*, 13(2):481-484.
- Saleem, M. 2000. *Chemical and biological screening of some relatives of Lamiaceae (Labiatae) family and marine algae Codium iyengarii*. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Karachi. Karachi, Pakistan. 194 p.
- Salvador, N., A. Gómez-Gareta, L. Lavelli & M.A. Ribera. 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci. Mar.*, 71(1):101-113.
- Sanhueza, J., S. Nieto & A. Valenzuela. 2002. Ácido linolénico conjugado: un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. *Rev. Chil. Nutr.*, 29(2):98-105.
- SDBS. National Institute of Advance Industrial Science and Technology. 2003. <http://sdb.sriodb.aist.go.jp>. Accessed 2013-01-22.
- Shanmugam, M., K.H. Mody & A.K. Siddhanta. 2001. Blood anticoagulant sulphated polysaccharides of the marine green algae *Codium dwarkense* (Boergs.) and *C. tomentosum* (Huds.) Stackh. *Indian J. Exp. Biol.*, 39(4):365-370.
- Shanmugam, M., K.H. Mody, B.K. Ramavat, A.S.K. Murthy & A.K. Siddhanta. 2002. Screening of Codiacean algae (Chlorophyta) of the Indian coasts for blood anticoagulant activity. *Indian J. Mar. Sci.*, 31(1):33-38.
- Sharon, N. & H. Lis. 2007. *Lectins*. 2nd. Ed. Springer. Dordrecht. The Netherlands. ISBN: 978-1-4020-6605-4. 464 p.
- Sheu, J.H., Ch. Liaw, & Ch.Y. Duh. 1995. Oxygenated clerosterols isolated from the marine alga *Codium arabicum*. *J. Nat. Prod.*, 58:1521
- Shuai W.Y., Y.W. Chang, L.M. Xiao & W.G. Bin. 2005. A new clerosterol derivative, trans-phytol, and related metabolites from marine green alga *Codium fragile* (Codiaceae) and their chemotaxonomic significance. *Bioch. Syst. Ecol.*, 33:1288-1292.
- Siddhanta A.K., M. Shanmugam, K.H. Mody, A.M. Goswami & B.K. Ramavat. 1999. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the

- west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 26(2):151-154.
- Silva, M., f. González & S. Pantoja. 1984. Química de la flora y fauna de Chile. 111-131. En: Aguilera, J.M., J.A. Guzmán & M. Rutman (Eds.) Recursos renovables chilenos: una visión multidisciplinaria. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Skehan, P., R. Storeng, D. Scudeiro, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd.1990. New colorimetric assay cytotoxicity for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:1107.
- Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.*, 16:245-262.
- Soares, A.R., M.C. Robaina, G.S. Mendes, T.S. Silva, M.S. Gestinari, O.S. Pamplona, Y. Y. Valentin, C.R. Kaiser & M.T.V. Romanos. 2011. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Rev. Bras. Farmacogn.*, ISSN 0102-695X.
- Stamps, R., R.J. Sokol, M. Leach, R. Herron & G. Smith. 1987. A new variant of blood group A. *Apae. Transfusion*, 27(4):315-318.
- Stein, B., L. Stover, A. Gillem, K. Winters, J.H. Lee & Ch. Chauret. 2006. The effect of lectins on *Cryptosporidium parvum* oocyst *in vitro* attachment to host cells. *J. Parasitol.*, 92(1):1-9
- Sunilson, A.J., R. Suraj, K. Anandarajagopal, G. Rejitha, M. Vignesh & P. Promwichit. 2009. Preliminary phytochemical analysis, elemental determination and antibacterial screening of *Codium decortatum*, a marine green algae. *Int. J. of Biol. Chem.*, 3(2):84-89.
- Thanh, S.V., D.H. Ngo, Q.V. Ta & S.K. Kim. 2011. Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 44:11-20.
- Tlili, N., T. E. Guizani, N. Nasri, A. Khaldi & S. Triki. 2011. Protein, lipid, aliphatic and triterpenic alcohol content of caper seeds "*Capparis spinosa*". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88(2):265-270.
- Togashi, N., A. Shiraishi, M. Nishizaka, K. Matsuoka, K. Endo, H. Hamashima & Y. Inoue. 2007. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 12(2):139-148.

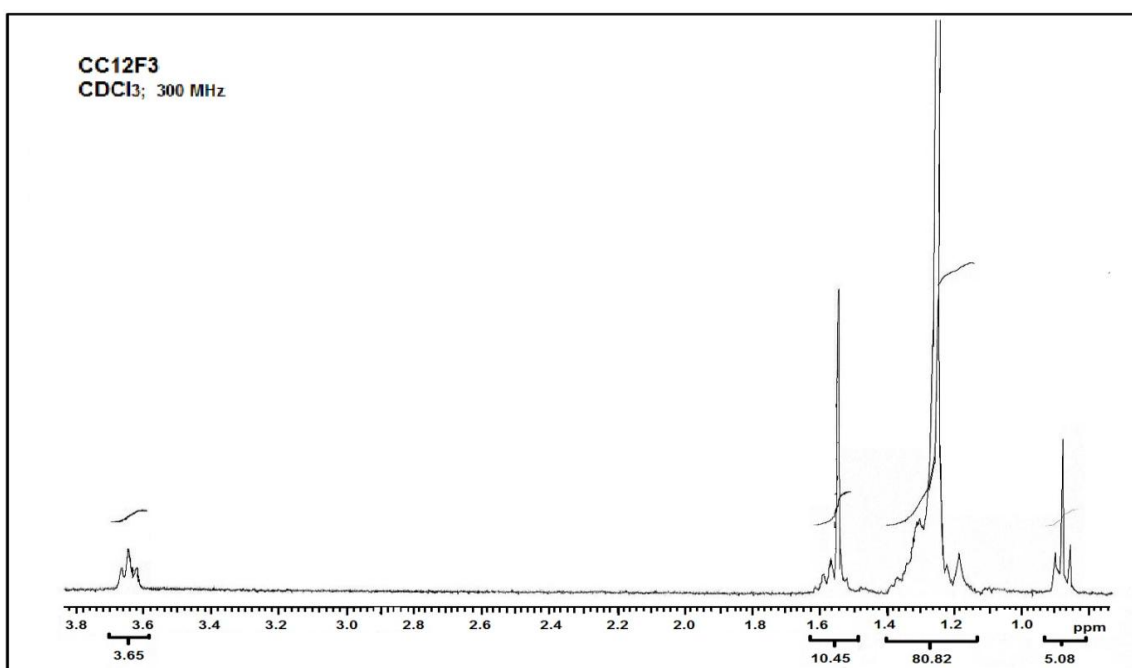
- Vepřeck, P., M. Hajduch, P. Dzubak, R. Kuklik, J. Poláková & K. Bezouska. 2006. Comblike dendrimers containing Tn antigen modulate natural killing and induce the production of Tn specific antibodies. *J. Med. Chem.* 49(21):6400-6407.
- Villaflores, O. B., A. P. G. Macabeo, D. Gehle, K. Krhn, S. G. Franzblau & A. M. Aguinaldo. 2010. Phytoconstituentes from *Alpinia purpurata* and their *in vitro* inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharmacogn. Mag.* 6(24):339-344.
- Villarreal-Gómez, L. J., I.E. Soria-Mercado, G. Guerra-Rivas & N.E. Ayala-Sánchez. 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Rev. Biol. Mar. Oceanol.*, 45(2):267-275.
- Wang, H., E.V. Ooi & P.O. Ang. 2008. Antiviral activities from Hong Kong seaweeds. *J. Zhjiang Univ. Sci. B.*, 9(12):969-976.
- Wu, A.M., S.C. Song, P.Y. Hwang, J.H. Wu & K.S. Chang. 1995. Binding studies on the combining site of a GalNAc α 1-specific lectin with Thomsen-Friedenreich activity prepared from green marine algae *Codium fragile* subspecies *tomentosoides*. *Eur. J. Biochem.*, 233:145-151.
- Wu, A.M., S.C. Song, S.Ch. Chang, J.H. Wu, K.S.S. Chang & E.A. Kabat. 1997. Further characterization of the binding properties of a GalNAc α 1-specific lectin from *Codium fragile* subspecies *tomentosoides*. *Glycobiology*, 7(8):1061-1066.
- Zhou J., G. Xie & X. Yan. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine*. V1, V2, V3, V4 y V5, Springer-Verlag. Heidelberg Berlin. 2011.

Apéndice. Espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e IR-ATR de compuestos aislados.

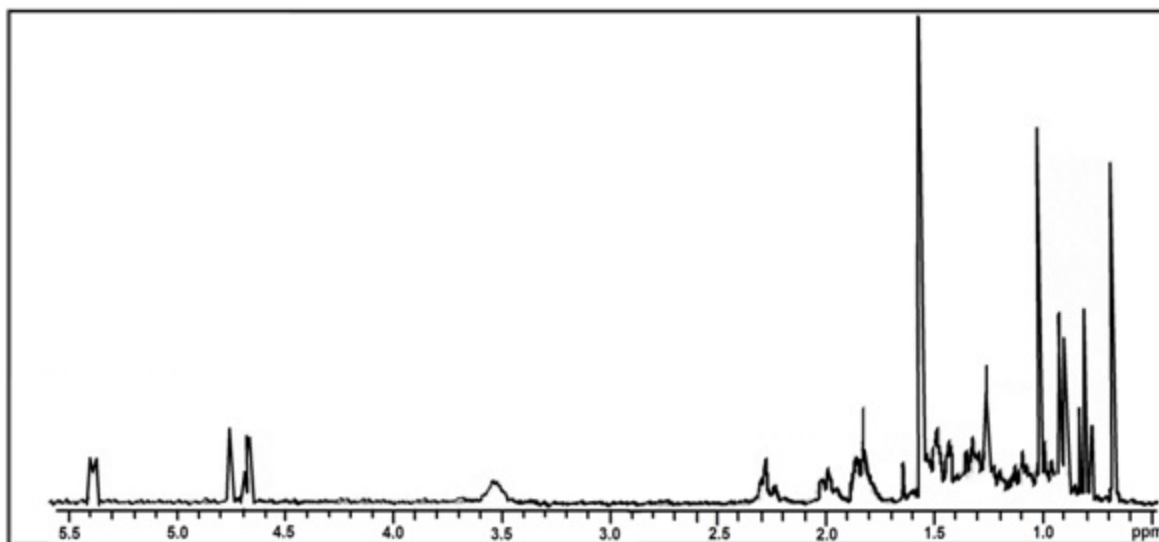
A.1. Espectro de Infrarrojo del **compuesto 1 (CC12F3)** (ATR Perkin-Elmer).



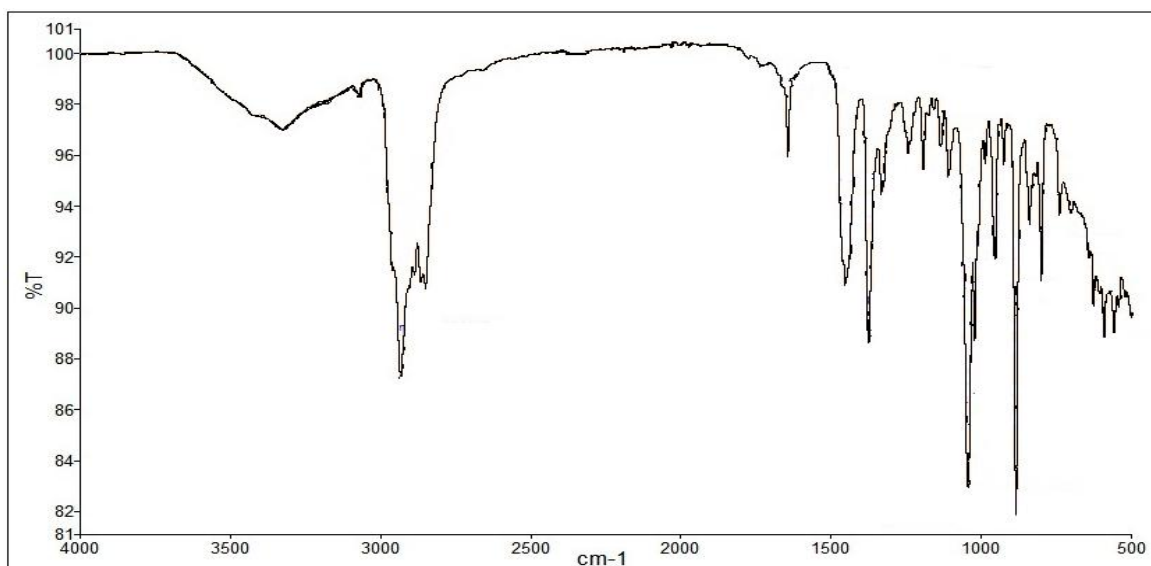
A.2. Espectro de RMN de ^1H obtenido con el **compuesto 1 (CC12F3)**: **1-Octadecanol**. 400 MHz y en CDCl_3 como solvente.



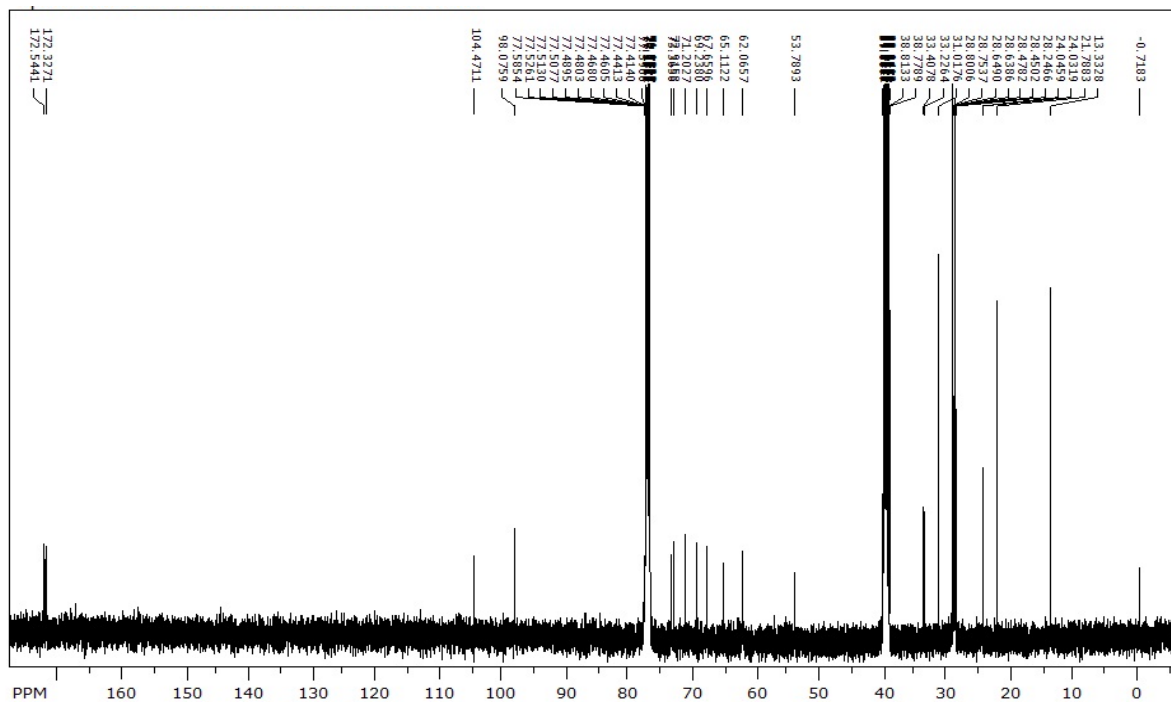
A.3. Espectro de RMN de ^1H del **compuesto 2(a)** e identificado como **clerosterol**.



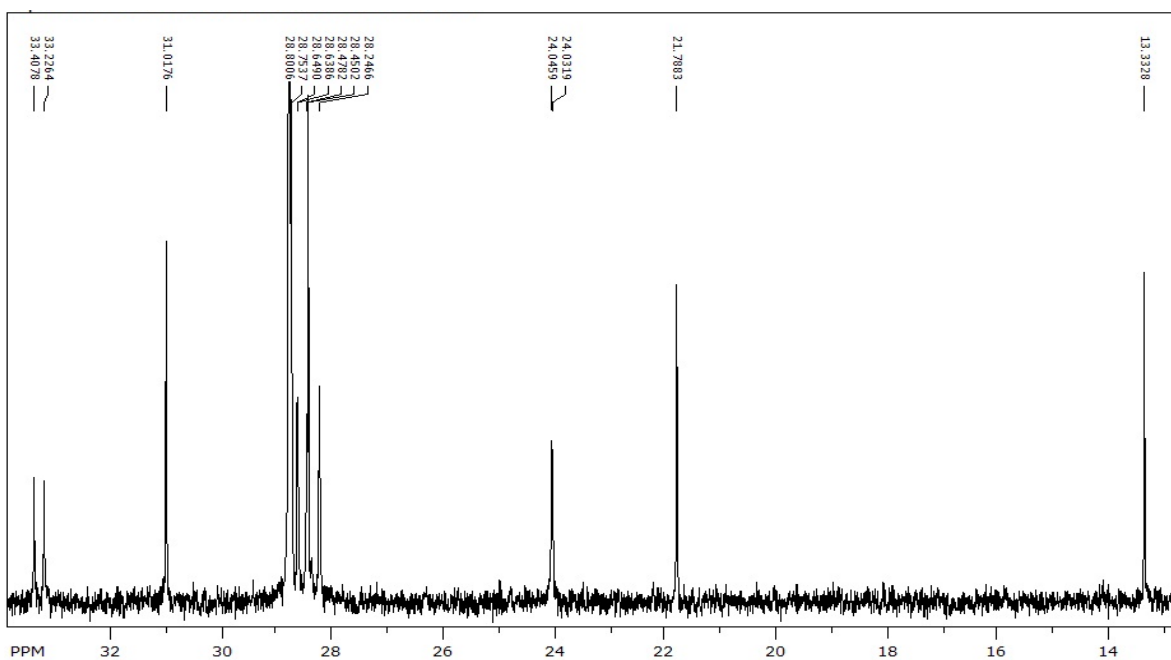
A.4. Espectro de IR del **compuesto 2(a)** identificado como **clerosterol**.



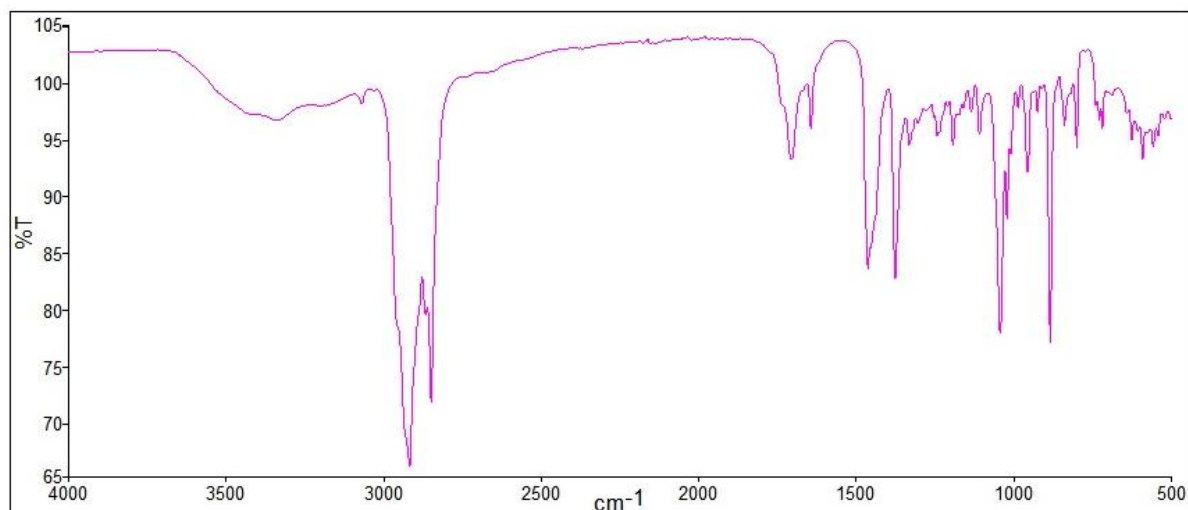
A.6. Espectro de RMN de ^{13}C del **compuesto 5(a) (CC20F5)**, identificado como posible codiósido.



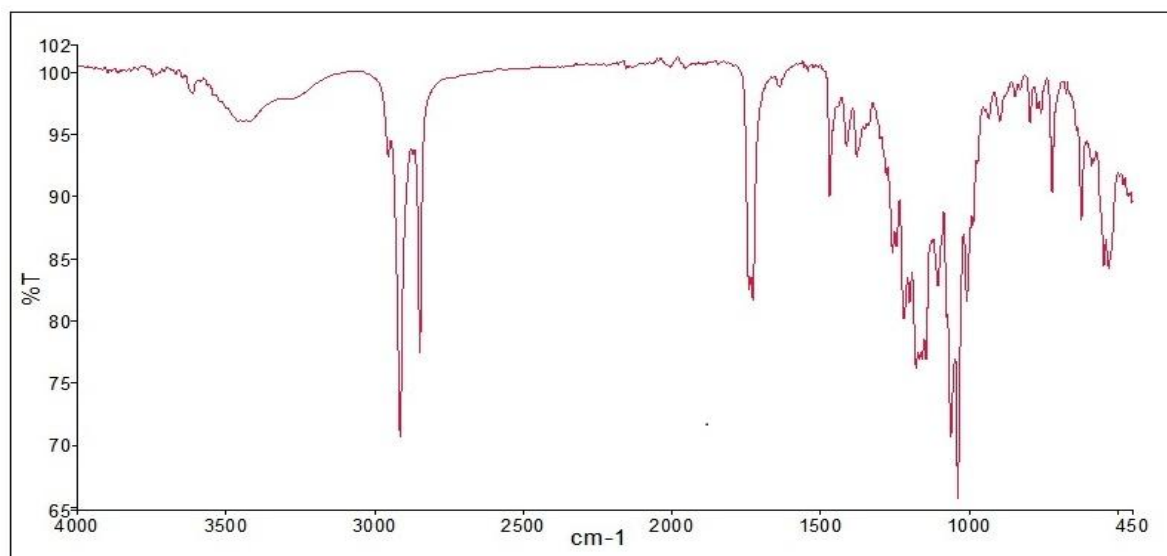
A.6.1. Espectro de RMN de ^{13}C del rango con mayor cantidad de señales del **compuesto 5(a) (CC20F5)**.



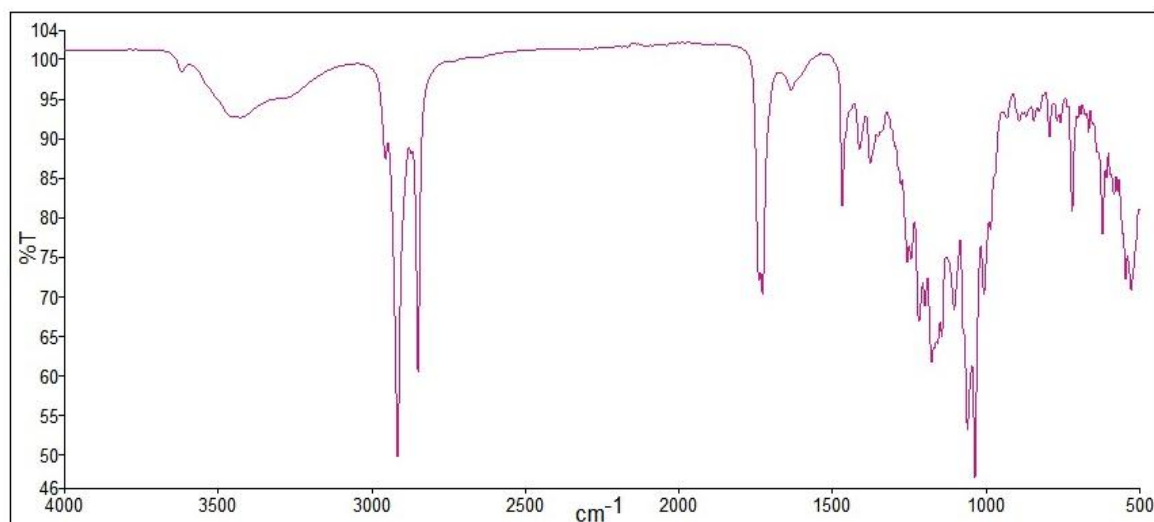
A.7. Espectro de IR-ATR del **compuesto 2(c) (clerosterol)**, F3C6PESL1F3 de *Codium cuneatum*.



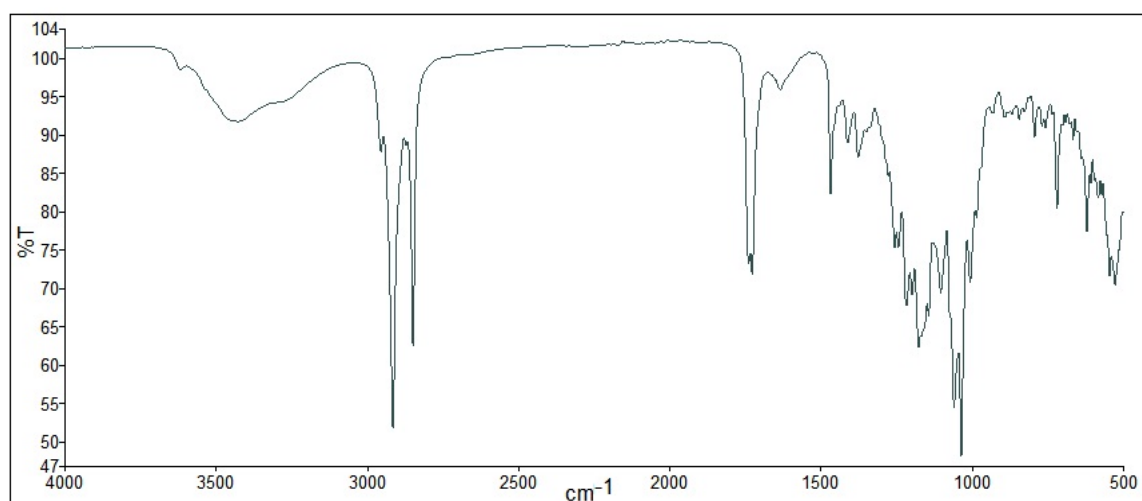
A.8. Espectro de IR-ATR, del **compuesto 5(a) (CC20F5)**.



A.9. Espectro de IR-ATR del **compuesto 5(c)** (posible codiósido), **F1C7PESL1F6** de *Codium cuneatum*.



A.10. Espectro de IR-ATR del **compuesto 5(f)** (posible codiósido), **F1C3PESL7** de *Codium fragile*.



A.11. Espectro de IR-ATR del **compuesto 2(s) (clerosterol)**, F2C5ESL1 de *Codium simulans*.

