



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
Sargassum sinicola (Sargassaceae, Phaeophyta) y
Laurencia johnstonii (Rhodomelaceae, Rhodophyta)
DE BAHÍA DE LA PAZ, B.C.S., MÉXICO.**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA:

MARCO ANTONIO CASTRO REYES

CONTENIDO

GLOSARIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVOS	10
5. ÁREA DE ESTUDIO	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
6.1. Recolecta y preparación de las algas	13
6.2. Obtención del extracto crudo	14
6.3. Fraccionamiento de <i>Sargassum sinicola</i>	14
6.4. Fraccionamiento de <i>Laurencia johnstonii</i>	15
6.5. Bioensayos	1s
7. RESULTADOS	17
7.1. Actividad antibacteriana de los extractos crudo de <i>Sargassum sinicola</i>	17
7.2. Actividad antibacteriana de las fracciones de <i>Sargassum sinicola</i>	18
7.3. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de <i>Laurencia johnstonii</i>	22
7.4. Actividad antibacteriana de las fracciones de <i>Laurencia johnstonii</i>	26
7.5. Actividad de los antibióticos comerciales	35
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES.....	52
10. RECOMENDACIONES	54
II. LITERATURA CITADA.....	55

GLOSARIO

Actividad biológica: Referente a la respuesta que se pueda generar en algún sistema biológico. (antihumoral, hemolítico, aglutinante, antifúngico, antiviral, etc.).

Antibiosis. Inhibición del crecimiento de microorganismos.

Actividad antibacteriana. Inhibición del crecimiento de bacterias.

Bioactividad. Acción biológica de algún compuestos sobre algún organismo de prueba.

Bioensayos. Método para evaluar el efecto de un extracto o compuesto sobre el crecimiento de microorganismos, bajo condiciones controladas.

Ecología química. Estudio de las propiedades ecológicas específicas, presentadas por las sustancias químicas que se encuentran en los organismos en respuesta selectiva al medio y a las relaciones ínter e intraespecíficas.

Ficocoloides: Carbohidratos complejos derivados de las algas pardas y rojas que tienen la propiedad de formar coloides.

Fitoquímico. Compuesto químico derivado de las plantas.

Macroalga. Organismo pluricelular constituido por células indiferenciadas, de estructura generalmente **talosa**, generalmente fija a fondos rocosos, que presenta una gran variedad morfológica y cuyos tamaños van desde unos cuantos centímetros hasta más de 60 m de longitud. Ubicadas dentro del reino **Plantae**, incluye especies de las Divisiones Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta.

Metabolito secundario. Sustancias que se derivan de los procesos metabólicos primarios, no como fin, sino como producto derivado o residual.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Localización del Brea de estudio y puntos de recolecta de las algas marinas en la Bahía de La Paz.	13
Fig. 2. Valor promedio (n=2) en los halos de inhibición (mm) de los extractos crudos de <i>Sargassum sinicola</i> vs <i>Bacillus subtilis</i> en los meses de recolecta.	18
Fig. 3a, b y c. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones obtenidas de los extractos crudos de <i>Sargassum sinicola</i> en los distintos meses de recolecta en contra de <i>Bacillus subtilis</i>.	20
Fig. 4. Halos de inhibición (mm) promedio (n=3) de los extractos crudos de <i>Laurencia johnstonii</i> en los distintos meses de recolecta contra <i>Bacillus subtilis</i>.	23
Fig. 5. Halos de inhibición (mm) promedio (n=2) de los extractos crudos de <i>Laurencia johnstonii</i> de los distintos meses de recolecta contra <i>Staphylococcus aureus</i>.	24
Fig. 6. Halos de inhibición (mm) promedio (n=3) de los extractos crudos de <i>Laurencia johnstonii</i> de los distintos meses de recolecta contra <i>Escherichia coli</i>.	25
Fig. 7a, b, c y d. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones de <i>Laurencia johnstonii</i> vs <i>Bacillus subtilis</i> en los distintos meses de recolecta.	27
Figuras. 8a, b, c y d. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones de <i>Laurencia johnstonii</i> vs <i>Staphylococcus aureus</i> en los distintos meses de recolecta.	27
Figuras 9a, b, c y d. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones de <i>Laurencia johnstonii</i> vs <i>Streptococcus faecalis</i> en los distintos meses de recolecta.	28
Fig. 10. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra <i>Bacillus subtilis</i>.	36
Fig. 11. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra <i>Staphylococcus aureus</i>.	36
Fig. 12. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra <i>Streptococcus faecalis</i>.	37
Fig. 13. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra <i>Escherichia coli</i>.	37
Fig. 14. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nombre, concentración y clave de los antibióticos comerciales empleados en los antibiogramas	16
Tabla 2. Valor promedio (n=2) de los halos de inhibición (mm) \pm una desviación estándar en la actividad antibacteriana de los extractos crudos de <i>Sargassum sinicola</i> contra <i>Bacillus subtilis</i>	17
Tabla 3. Valores del análisis de varianza bifactorial que mide el efecto de los extractos crudos de <i>Sargassum sinicola</i> de los meses de recolecta y la concentración contra <i>Bacillus subtilis</i>	18
Tabla 4a, 4b y 4c . Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) \pm una desviación estándar de las fracciones de <i>Sargassum sinicola</i> en contra de. Bs: <i>Bacillus subtilis</i> ; Sa: <i>Staphylococcus aureus</i> ; Sf: <i>Streptococcus faecalis</i> ; Ec: <i>Escherichia coli</i> ; Psa: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Cuando no se presenta la desviación estándar esta es igual a 0.	19
Tabla 5. Análisis de varianza bifactorial, que mide el efecto de las fracciones activas (cloroformo y acetona) y la concentración de <i>Sargassum sinicola</i> recolectada en agosto sobre <i>Bacillus subtilis</i>	20
Tabla 6. Análisis de varianza bifactorial de la fracción activa (cloroformo) del alga <i>Sargassum sinicola</i> considerando los meses de recolecta (febrero y agosto) y la concentración (100 y 200 μ g) contra <i>Bacillus subtilis</i>	21
Tabla 7. Análisis de varianza de la fracción activa (acetona) del alga <i>Sargassum sinicola</i> considerando los meses de recolecta (junio y agosto), y la concentración (100 y 200 μ g) contra <i>Bacillus subtilis</i>	21
Tabla 8. Análisis de varianza bifactorial de la fracción clorofórmica del alga <i>Sargassum sinicola</i> recolectada en agosto considerando la cepa bacteriana (<i>Bacillus subtilis</i> (Bs), <i>Streptococcus aureus</i> (Sa) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Psa)) y la concentración (100 y 200 μ g).	22
Tabla 9. Halos de inhibición (mm) en promedio (n=3 , salvo el caso de enero cuyo n=2) \pm una desviación estándar de los extractos crudos de <i>Laurencia johnstonii</i> en las distintos meses de recolecta.	22
Tabla 10. Resultado del análisis de varianza bifactorial que incluye el mes de recolecta y la concentración empleada de los extractos crudos del alga <i>Laurencia johnstonii</i> en contra de las cepas que fue activa.	25
Tabla 11 . Halos de inhibición (mm) promedio (n=3) \pm una desviación estándar de las fracciones activas de <i>Laurencia johnstonii</i> en los distintos meses de recolecta. Las cepas bacterianas inhibidas fueron: Bs: <i>Bacillus subtilis</i> , Sa: <i>Staphylococcus aureus</i> , Sf: <i>Streptococcus faecalis</i> . Las cepas Gram (-) fueron resistentes.	26
Tabla 12. Valores del análisis de varianza bifactorial de las fracciones activas (éter de petróleo, cloroformo y acetona) y la concentración de <i>Laurencia johnstonii</i> recolectada en febrero	29
Tabla 13.- Valores del análisis de varianza bifactorial de las fracciones activas (éter de petróleo , cloroformo y acetona) y la concentración de <i>Laurencia johnstonii</i> recolectada en junio. En el caso de <i>Streptococcus faecalis solo se</i> incluyen las fracciones éter de petróleo y cloroformo.	30

Tabla 14. Valores del análisis de varianza bifactorial que incluye las fracciones activas (éter de petróleo y cloroformo) y la concentración de <i>Laurencia johnstonii</i> recolectada en enero.	30
Tabla 15. Valores del análisis de varianza bifactorial que mide el efecto de las fracciones activas (éter de petróleo, cloroformo y acetona) de <i>Laurencia johnstonii</i> recolectada en marzo y la concentración utilizada. Para la cepa <i>Streptococcus faecalis</i> solo se incluyen las fracciones de éter de petróleo y cloroformo	31
Tabla 16.- Resultados del análisis de varianza trifactorial para las fracciones de éter de petróleo y cloroformo de <i>Laurencia johnstonii</i> que fueron activas todos los meses de recolecta contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>S. faecalis</i>	33
Tabla 17.- Análisis de varianza trifactorial de las fracciones cetónicas y clorofórmicas de <i>Laurencia johnstonii</i> que fueron activas contra <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> , donde se incluye el mes de recolecta (febrero, junio y marzo) y la concentración empleada.	34
Tabla 18. Valor promedio (n=3) \pm una desviación estándar de los halos de inhibición (mm) de los antibióticos comerciales sobre las cepas bacterianas empleadas en los bioensayos positivos. La concentración para cada antibiótico se encuentran en la tabla 1.....	35

RESUMEN

Se evaluó la variación de la actividad antibacteriana de las algas marinas *Sargassum sinicola* Setchell & Gardner, 1924 (Sargassaceae, Phaeophyta) y *Laurencia johnstonii* Setchell & Gardner, 1924 (Rhodomelaceae, Rhodophyta) en distintas épocas de recolecta, tanto en extractos crudos como en las fracciones que se obtuvieron de estos mismos. *S. sinicola* se recolectó en los meses de febrero, junio y agosto de 1994 y *L. johnstonii* en febrero y junio de 1994 y enero y marzo de 1995 en la Bahía de La Paz. Los extractos crudos se prepararon con etanol en una relación 1:5 y las fracciones se obtuvieron por soxhlet y cromatografía en columna para *S. sinicola* y *L. johnstonii* respectivamente utilizando éter de petróleo, cloroformo, acetona y metanol como eluyentes. La actividad antibacteriana se evaluó utilizando la técnica de difusión en placa colocando discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 100 y 200 µg de extracto o fracción a probar, empleando bacterias Gram (+) (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*) y Gram (-) (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Los halos de inhibición se midieron a las 24 h. Los extractos crudos de *S. sinicola* fueron activos solo sobre *B. subtilis* registrándose la máxima actividad antibacteriana en el mes de junio. Solo las fracciones obtenidas con clorofomo y acetona fueron activas contra *B. subtilis*, a excepción de la fracción clorofórmica del mes de agosto que tuvo actividad sobre *S. aureus* y *Ps. aeruginosa*. En esta alga se presume la presencia de tres productos naturales con actividad antibacteriana que varían con el tiempo. En el caso de *L. johnstonii*, los extractos crudos presentaron una inhibición sobre bacterias Gram (+) como Gram (-). Se registró una mayor actividad antibacteriana en enero, disminuyendo en febrero y marzo e incrementándose ligeramente en junio. Con las fracciones se registró solo actividad antibacteriana contra las cepas Gram (+), y la mayor actividad se obtuvo con las fracciones éter de petróleo y cloroformo, que con las fracciones acetona y metanol. Se observó un patrón en la actividad antibacteriana de las fracciones de *L. johnstonii*, ya que en enero y marzo la mayor actividad fue obtenida con la fracción etérea y en febrero y junio la mayor fue registrada con la fracción clorofórmica. En esta especie se sugiere la presencia de cuatro compuestos con actividad antibacteriana. Los resultados indican que existe una variación significativa de la actividad antibacteriana en cada mes de recolecta y para cada especie de alga.

ABSTRACT

Antibacterial activity of *Sargassum sinicola* (Sargassaceae, Phaeophyta) and *Laurencia johnstonii* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) at Bahía de La Paz, B. C. S., México.

The overall objective of this work was to determine the variation of the antibacterial activity of *Sargassum sinicola* Setchell & Gardner, 1924 (Sargassaceae, Phaeophyta) and *Laurencia johnstonii* Setchell & Gardner, 1924 (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in different collection periods, as well as in the crude extracts and their fractions. *S. sinicola* was collected in February, June, and August in 1994, and *L. johnstonii* in February and June of 1994, and January and March of 1995 in Bahía de La Paz. The seaweeds were identified, cleaned of epiphytes, foreign matter, salt excess, and were shade-dried. The crude extracts were prepared for maceration with ethanol (1:5, alcohol:dry weight of algae). The fractions were obtained by Soxhlet and column chromatography for *S. sinicola* and *L. johnstonii* respectively, using petroleum ether (30-60), chloroform, acetone, and methanol as eluent. We used the standard method of disc-diffusion test on strains of Gram (+) and Gram (-) bacterial strains (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*). The paper discs were impregnated with 100 and 200 µg of crude extract or fraction to be tested. The inhibitory halo was measured after 24 h. The crude extracts of *S. sinicola* were active only against *B. subtilis*, registering the maximum antibacterial activity in June. In the fractions, only the chloroform and acetone fractions were active against *B. subtilis*, except the chloroform fraction in August which also was active against *S. aureus* and *Ps. aeruginosa*. We suppose the presence of three natural products in this species. For *L. johnstonii*, the crude extracts showed inhibition over Gram (+) and Gram (-) bacteria. We registered a major antibacterial activity in January, decreasing in February and March and increasing slightly in June. With the fractions, we registered antibacterial activity only against Gram (+) bacteria, with the best activity obtained using petroleum ether and chloroform, rather than acetone and methanol. We observed a pathway on the antibacterial activity of the fractions of *L. johnstonii*, because in January and March the major activity was obtained with petroleum ether fractions and, in February and June was registered with the chloroform fractions. We assume the presence of four natural products. These results indicate that there exists a variation of the antibacterial activity for the collection periods and for each species.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales o metabolitos secundarios de origen marino están recibiendo una mayor atención debido a que se ha probado que son una fuente importante de nuevos e inusuales formas de moléculas orgánicas con actividad biológica importante. En principio estas investigaciones se centraban en el aspecto **fitoquímico** de los metabolitos secundarios, sin embargo, actualmente los estudios se están dirigiendo sobre su aplicación potencial en el tratamiento de **enfermedades** humanas, control de plagas y enfermedades en la agricultura y ganadería, así como en la acuicultura (Ireland et al., 1993).

La investigación biomédica marina es un concepto relativamente nuevo y esta ha sido definida como el estudio de sustancias activas derivadas de procesos fisiológicos de organismos marinos que actúen sobre tejidos humanos y sobre bacterias que afecten el funcionamiento del sistema humano (Baker 1984a). Este campo ha sido abordado por la farmacognosia marina, la cual estudia los productos naturales de origen marino con potencial biológico y **farmacológico**. Der Marderosian y Liberti (1988) presentan una lista de compuestos que son aplicados comúnmente en el área farmacológica así como compuestos que aún están en proceso de investigación. Estos reportes señalan sustancias activas como antibióticos y **antifúngicos** a partir de moneras; como agentes antihelmínticos, antivirales, anticoagulantes, antiespasmódicos e íctiotóxicos a partir de protistas; compuestos antibióticos, factores de agregación y factores de crecimiento obtenidos de esponjas y **un** sin número de compuestos aislados a partir de equinodermos, celenterados, moluscos, anélidos, artrópodos, anfibios, reptiles y numerosas clases de peces.

A nivel mundial, la búsqueda de compuestos bioactivos de organismos marinos ha recibido una mayor atención en las pasadas dos décadas. Una revisión reciente, que incluye a todos los organismos marinos bajo investigación, hecha por **Amico (1995)**, indica que los metabolitos secundarios reportados durante el periodo 1973 - 1994 totalizan 6,363 compuestos, de los cuales las algas, las esponjas y los celenterados aportan el **78.57 %** con 5,000 productos naturales aislados.

Particularmente en las algas marinas se aislaron 2,072 productos naturales, siendo estas los organismos marinos que contribuyen con una mayor cantidad de compuestos identificados.

Los organismos marinos están sujetos a condiciones ambientales completamente distintas a las presentes en ambientes terrestres, éstas determinan que las rutas biosintéticas también sean diferentes (Baker 1984), por esta razón los organismos marinos pueden generar metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas y distintas a las encontradas en ambientes terrestres, por lo que la cantidad de productos con actividad biológica es insospechada. Se ha reconocido que varios organismos marinos presentan varios compuestos prometedores, sin embargo, del total aproximadamente menos del 1% de las especies se han investigado (Pesando 1990).

En este sentido, la ecología química ha surgido como una necesidad de explicar cual es el origen y la función de los metabolitos secundarios de los organismos marinos debido a que estos juegan un papel muy importante en las interacciones ínter e intraespecíficas (Williams *et al.*, 1989). Anteriormente se consideraba a los metabolitos secundarios como productos terminales del metabolismo es decir, productos de desecho y sin utilidad aparente, sin embargo, hoy se conoce que estos tienen un papel importante, con funciones adaptativas específicas expresadas químicamente (Betancourt-Lozano 1992). Se ha propuesto que estas interacciones químicas han influido en la evolución de organismos marinos. Se ha reportado que algunas algas producen metabolitos secundarios para atraer a los gametos y favorecer la fecundación a través de receptores específicos, además de impedir el establecimiento de organismos epífitos o bacterias degradadoras (Lozano 1991). Así, los estudios de ecología química tratan de explicar las interacciones ínter *y/o* intraespecíficas de los organismos a través del conocimiento de los intermediarios químicos que intervienen en su detección y recepción (Kittredge *et al.*, 1974).

El espacio en ambientes marinos es un factor limitante, sobre todo para los organismos **bénticos** que necesitan sustratos duros para poder fijarse, y por ello, los organismos desarrollan diferentes estrategias que les permiten aumentar la competitividad por el mismo. En algunas especies se ha observado que la producción de compuestos antimicrobianos previenen la epibiosis por larvas de organismos diversos, lo cual disminuiría su área de fotosíntesis (Lozano 1991). En este caso se

produce una competencia para generar y tolerar los metabolitos secundarios que cada especie genere, así, el organismo más eficiente será el que se instale en tal hábitat. Lo anterior es importante debido a que se ha demostrado que los organismos herbívoros tienen el mayor impacto sobre la funcionalidad de las comunidades marinas. Meyer y Paul (1992) demostraron que la herbivoría era la responsable del consumo del 97 % de los manchones de algas en las Islas Vírgenes, por lo tanto éstas han desarrollado una estrategia para tolerar o detener su depredación por medio de metabolitos secundarios tóxicos.

2. ANTECEDENTES

Las algas marinas son un recurso de gran importancia. Su utilización como alimento humano, forraje y fertilizante agrícola es bastante antiguo (Pesando y Caram 1984; Robledo 1990). En la industria, las algas se utilizan como materia prima para obtener ficoloides como agar-agar, carragenanos y alginatos, fundamentalmente, además de **furcellarén**, laminarén, manitol, producción de vitaminas, herbicidas e insecticidas como otros productos importantes (Baker 1984a; Dawes 1984).

El primer reporte que se tiene sobre el uso de las macroalgas con propiedades curativas data de la antigua China, donde usaban el alga *Digenia simplex* como vermífugo (De Lara-Isassi et al., 1989), actualmente de esta alga se obtiene el ácido kaínico que se utiliza contra la hipertensión (Der Marderosian y Liberti 1988). En la medicina oriental las algas **café**s se han usado tradicionalmente como una droga hipotensiva, a partir de este conocimiento se ha aislado un potente hipotensivo de *Laminaria angustata*, denominado laminine (Baker 1984a). En las culturas orientales, las algas se han usado en la medicina tradicional para tratar padecimientos como hemorragias, quemaduras, dolores musculares, hidropesía y trastornos intestinales (Chengkui y Junfu 1984).

Shirayama en 1941 (en Pratt et al., 1951) reporta el primer bioensayo en que detecta la actividad antibacteriana del alga *Cystophyllum hakodatense* que inhibía el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* y *L. helveticus*. Esta área de investigación se ha ampliado para buscar en las algas propiedades anticoagulantes, antiagregantes, fibrinolíticas y hemaglutinantes (Deacon-Smith et al., 1985; Güven et al., 1991; Lima Ainouz et al., 1992); actividad antiviral (Blunden et al., 1981;

Premnathan *et al.*, 1992; Kamat *et al.*, 1992), actividad antihumoral (Yamamoto *et al.*, 1982) e inhibición **enzimática** de la retrotranscriptasa del virus de VIH (Beress *et al.*, 1993). Se ha propuesto el uso de las macroalgas como un medio para eliminar la radiación, debido a su alto contenido en fibra que es capaz de absorber radioactividad y por su propiedad laxante (Robledo 1990).

En años recientes han cobrado gran importancia los estudios relacionados con la obtención de antibióticos a partir de algas marinas, numerosas especies de algas exhiben propiedades de esta índole, encontrándose que dependiendo de la especie de la cual provienen, estos presentan una actividad **muy** específica (**Rao *et al.***, 1988) o bien son de amplio espectro, y no se ha observado que tengan efectos secundarios, además de presentar un nulo o escaso grado de toxicidad (Martínez-Nadal *et al.*, 1963; Pesando y Caram 1984).

Particularmente sobre la actividad antibacteriana y **antifúngica** se han desarrollado en años recientes una importante cantidad de investigaciones con resultados que reportan que los extractos crudos de algunas algas inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Caccamese *et al.*, 1980, 1981, 1985; Naqvi *et al.*, 1980; Reichelt y Borowitzka 1984; **Rao *et al.***, 1988; Campos-Takaki *et al.*, 1988; Vidyavathi y Sridhar 1991; Ballesteros *et al.*, 1992, Robles-Centeno *et al.*, 1996).

Se han llegado a proponer diferencias intraespecíficas en la concentración de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, los cuales pueden ocurrir de diferentes maneras: 1) por la variación entre las diferentes partes de la misma planta; 2) por el estado reproductivo; 3) por la variación entre dos plantas diferentes de la misma población; 4) por la variación entre **hábitats** y, 5) por una variación temporal (Moreau *et al.*, 1988; Ballantine *et al.*, 1987; **Rosell** y Srivastava 1987; Vidyavathi y Sridhar 1991; Robles-Centeno *et al.*, 1996).

De acuerdo a los estudios de Hornsey y Hide (1976), se pueden caracterizar cuatro tipos de variación temporal en la actividad antibacteriana de las macroalgas: 1) Tipo ***Polysiphonia***: presenta actividad uniforme y constante durante todo el año; 2) Tipo ***Laminarial***: presenta **un** pico de actividad antibiótica en la temporada de invierno; 3) Tipo ***Dictyota***: presenta **un** pico de actividad antibiótica en la temporada de verano, y 4) Tipo ***Codium***: presenta un pico de actividad antibiótica en la temporada

de primavera. Al parecer estas variaciones están en **función** de la influencia del ambiente marino: por la variación climática que afecta la temperatura del agua, salinidad, corrientes, mareas, oleaje, contaminación humana, etc.

En los estudios realizados por De Lara-Isassi y Ponce-Márquez (1991) en la costa de Veracruz, se establece **que** *Dictyota volubilis* presentó actividad antibiótica en contra de *Staphylococcus aureus* y *Shigella sonni*, además reporta que existe una variación estacional en la actividad antibiótica, siendo mayor en la época de lluvias que en la de estiaje. En la costa de Michoacán, De Lara-Isassi *et al.*, (1989) recolectaron 16 especies de algas de las cuales 10 presentaron actividad antibiótica en contra de al menos una de las dos cepas probadas, *S. aureus* y *S. sonni*, destacándose *Grateloupia filicina*, *Tayloriella dictyurus* y *Laurencia clarionensis*, que inhibieron el crecimiento de ambas cepas. De Lara-Isassi (1991) también estudió las propiedades **antibióticas** de 28 especies de algas marinas de tres localidades diferentes, dos de ellas en el Pacífico Mexicano, con el fin de tener representadas zonas templadas, tropicales y subtropicales, encontrando que los extractos alcohólicos de las algas de zonas templadas presentaron la mayor actividad antibiótica. Entre esas especies se encuentran *Dictyota flabellata*, *Sargassum acinacifolium*, *Macrocystis pyrifera* y *Spyridia filamentosa*. *Laurencia pacifica* inhibió solo el crecimiento de *Escherichia coli*.

Existen pocos estudios sobre la actividad antimicrobiana de macroalgas recolectadas en el Golfo de California (Andersen y Faulkner 1972; Harger *et al.*, 1974) y éstos son los más frecuentes en relación a la gama de actividades biológicas que pueden presentar, sin embargo, para la Bahía de La Paz, este tipo de investigación es escasa (Espinoza-Avalos 1993). **Monroy** (1982) realizó un estudio de la actividad **antifúngica** con macroalgas de Bahía de La Paz e islas cercanas reportando que *Dictyota* sp, *Caulerpa* sp. y *Laurencia johnstonii* fueron las que presentaron actividad contra *Cladosporium cucumerinum*

2.1 *Sargassum sinicola*

El género *Sargassum* pertenece a la Familia Sargassaceae que a la vez forma parte del Orden de las Fucales incluido en la División Phaeophyta. Dentro de la Bahía de La Paz, *Sargassum sinicola*

Setchell & Gardner 1924, contribuye con el 28.8 % de la biomasa en un ciclo anual, siendo una de las especies más abundantes. También se encuentran *S. herporizum* Setchell & Gardner 1924; *S. johnstonii* Setchell & Gardner 1924, y *S. lapazeanum* Setchell & Gardner 1924 (Cruz-Ayala 1996).

Uno de los aspectos principales por lo que las algas **cafés** del género *Sargassum* tiene importancia económica, es por su contenido de alginatos, además se pueden obtener otros productos **industrializables** como son : laminarén, manitol, iodo y **fucoídina** (Fajardo-León 1994; Robledo 1990). En la Bahía de La Paz, este género es bastante abundante y por su importancia ecológica ha sido objeto de estudios sobre su crecimiento, distribución y abundancia, la cual se estima en 18 901 toneladas anuales (Fajardo-León 1994; Hernández-Carmona *et al.*, 1990). En la búsqueda de compuestos bioactivos a nivel mundial, el género *Sargassum* ha sido investigado y se han logrado aislar algunos compuestos, como el sarganin a, sarganin b y dioctyl **phthalate**, presentando actividad antibacteriana prometedora (Martínez-Nadal *et al.*, 1963, 1964; Faulkner 1984; Padmini *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1987, 1988; Sastry y Rao 1995).

Las algas **cafés**, especialmente las del Orden Dictyotales y **Fucales**, al cual pertenece el género *Sargassum* sp., son una fuente principalmente de diterpenos complejos y metabolitos con un origen terpenoide-aromático, además de ácidos grasos y fenoles. En este grupo no se producen metabolitos halogenados (Pesando 1990). Esto es importante debido a que a estos grupos de compuestos **químicos** se les atribuyen las distintas actividades biológicas que puedan presentar este grupo de algas.

Martínez Nadal *et al.*, (1964) reportan que el complejo sarganin, que incluye a dos compuestos denominados sarganin A y sarganin B descritos como ácidos grasos altamente volátiles, fue aislado de *S. natans* colectado en las costas de Puerto Rico, el cual presenta propiedades antibacterianas y **antifúngicas** de amplio espectro. Los extractos crudos obtenidos con éter etílico de *S. johnstonii* recolectados en las costas de la India presentaron los mayores halos de inhibición, en relación a los otros solventes utilizados, en contra de las bacterias Gram (+) y Gram (-) probadas (Padmini *et al.*, 1986). Rao *et al.*, (1987) reportan que las **fracciones** A y B de *S. johnstonii* exhibieron una mayor actividad antibacteriana en contra de bacterias Gram (+) y Gram (-) que la actividad antibacteriana

generada por un número de antibióticos conocidos. En ese caso, la fracción A está constituida principalmente por esteroides mientras que la fracción B está constituida principalmente por ácidos grasos. Para esta misma especie, pero que se encuentra en el Golfo de California, se desconoce si presenta algún tipo de actividad biológica (Espinoza-Avalos 1993). Rao *et al.* (1988) reportan que de ocho especies de *Sargassum* recolectadas en las costas de la India, las especies *S. vulgare* C. Ag. y *S. polycystum* C. Ag. fueron las más activas en contra de todas las cepas bacterianas de prueba, en contraste las especies *S. ilicifolium* (Turn.) C., *S. myriocystum* C. Ag., *S. cinctum* J. Ag. y *S. cinereum* J. Ag. generaron escasa o nula actividad antibacteriana. Del alga *S. wightii* se ha reportado que los compuestos aislados de su fracción lipídica han mostrado una amplia actividad antimicrobiana (Sastri y Rao 1995). En *S. sinicola*, recolectada dentro de la Bahía de La Paz se ha reportado una actividad antibacteriana solo en contra de bacterias Gram (+) (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) de los extractos crudos obtenidos con acetona y etanol, mientras los obtenidos con éter etílico y metanol fueron inactivos (Castro-Reyes *et al.* 1995).

2.2. *Laurencia johnstonii*

El género *Laurencia* pertenece a la Familia Rhodomelaceae. Orden Ceramiales incluidas en la División Rhodophyta. Esta alga, *L. johnstonii* ha sido reportada como endémica del Golfo de California (Espinoza-Avalos 1993; Zertuche-González *et al.*, 1995). y ha sido confundida con *L. pacifica* principalmente cuando los organismos están blanqueados o ha perdido su coloración normal (Garza-Sánchez 1994). Los engrosamientos lenticulares, que son aumentos de grosor de la pared celular en forma de lente, refringentes, y en esta especie son comunes. Cubren de la mitad a tres cuartas partes de las células medulares y son muy gruesos. Estos engrosamientos lenticulares al igual que los "cuerpos tipo cereza", que son corpúsculos vacuolares, revisten gran importancia ya que se ha considerado que son sitios de almacenaje de metabolitos secundarios halogenados (Young *et al.*, 1980). Aunque el ciclo de vida no ha sido claramente establecido para *Laurencia johnstonii* Setchell & Gardner 1924, dentro de la Bahía de la Paz se reconoce que esta especie presenta sus mayores abundancias en las épocas frías del año aunque soporta las altas temperaturas que se presentan en el lugar, las cuales van de 29 a 31°C (Garza-Sánchez 1994; Muñetón-Gómez y Hernández-Carmona 1990), y contribuye con el 1.1% del total de la biomasa anual (Cruz-Ayala 1996).

La División Rhodophyta es una de las más investigadas desde el punto de vista químico, ya que al menos cinco Órdenes de esta División tienen la capacidad de sintetizar compuestos orgánicos halogenados, que abarcan desde cetonas de bajo peso molecular y compuestos aromáticos hasta terpenos complejos así como productos derivados de los ácidos grasos, reportándose para algunos de ellos actividad biológica (Erickson, 1975; Fenical 1975; Pesando 1990).

El género *Laurencia* (Rhodophyta) ha sido ampliamente investigado por su alta producción de metabolitos secundarios (Erickson 1975; Fenical y Norris 1975; Fenical 1975; Crews y Scott 1986; Caccamese *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1993; König y Wright 1994). además por su uso potencial como fuente de antibióticos (Zertuche-González *et al.*, 1995). De 15 especies que se han investigado a nivel mundial, existe cierto grado de solapamiento interespecífico, sin embargo, se ha reconocido que uno o más de los productos naturales halogenados sintetizados por *Laurencia* son únicos para cada especie, es decir, presentan al menos un compuesto específico por especie (Fenical y Norris 1975). El interés en estudiar esta especie es debido a su alta producción de terpenos bromados los cuales generalmente presentan propiedades antimicrobianas, al igual que los fenol-terpenos (Fenical 1975)

Para *Laurencia johnstonii* recolectada en la parte norte del Golfo de California se han reportado ocho metabolitos secundarios. Uno llamado johnstonol que es un epóxido halogenado (Sims *et al.*, 1972) y otro con estructura de sesquiterpeno halogenado diepóxido llamado prepacifenol epóxido (Faulkner *et al.*, 1974; Fenical 1975). En una revisión hecha por Erickson (1975) reporta seis compuestos más para *L. johnstonii*: laurinterol, debromolaurinterol, isolaurinterol, debromoisolaurinterol, aplysin y debromoaplysin. Estos compuestos se clasifican, por su origen dentro del grupo de los sesquiterpenos derivados de los bisabolanos y/o esnideranos, sin embargo se desconoce si alguno de ellos presenta actividad antibacteriana.

En especies de este género se ha reportado actividad antimicrobiana (Rao y Parekh 1981; Reichelt y Borowitzka 1984; Ballantine *et al.*, 1987; Ballesteros, *et al.*, 1992). Caccamese *et al.*, (1981) detectaron actividad antimicrobiana de *L. obtusa*, aislando el compuesto responsable de tal actividad,

denominándolo obtusadiol. Castro-Reyes *et al.* (1996) han reportado que *L. johnstonii* presentó actividad antibacteriana tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-). Esta se detectó principalmente en la fracción lipídica, y por un subsecuente fraccionamiento de ésta. encontraron que al menos tres fracciones de las catorce obtenidas presentaron actividad antibacteriana prometedora.

3. JUSTIFICACIÓN

En años recientes el abuso de antibióticos tradicionales ha traído como consecuencia la resistencia de las cepas bacterianas patógenas causantes de enfermedades en el hombre, por ello surge la necesidad de buscar fuentes alternativas de productos naturales con propiedades antibacterianas. Dentro de las enfermedades originadas por bacterias se encuentran las del tipo infecto-contagioso. entre las cuales, las que originan irritación en las mucosas o infecciones respiratorias agudas. causadas por *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, ocupan los primeros sitios en salud pública (Instituto de Servicios de Salud 1996).

Los organismos marinos han probado ser una fuente potencial de compuestos con actividad biológica y representan una fuente natural de recursos que no ha sido explorada ampliamente. Se estima que aproximadamente el 80 % de la vida terrestre ocurre en el mar. lo que representa alrededor de 500 000 especies agrupadas en 30 Phylum. sin embargo se estima que el 1% de los organismos marinos han sido objeto de una búsqueda de productos naturales con actividad biológica (Der Marderosian y Liberti 1988; Pesando 1990). Los estudios relacionados con la detección y características de sustancias con actividad biológica de origen marino han tomado gran importancia en años recientes debido a que la farmacognosia marina sustentada en las macroalgas y otras especies marinas presentan una de las mejores perspectivas de desarrollo.

Se conoce que varios productos químicos de origen marino se han patentado como fármacos potenciales (Faulkner 1988). sin saber si alguno de ellos ha sido obtenido a partir de materia prima colectada en costas mexicanas.

La investigación sobre macroalgas en México ha sido principalmente de tipo taxonómico, distribución y ecológico. Los estudios sobre la actividad antibiótica de las macroalgas han sido pocos, a pesar de que éstas por su diversidad y abundancia son un recurso importante para este tipo de investigación (De Lara-Isassi 1991).

Las macroalgas de la Bahía de la Paz representan un recurso potencial el cual no ha sido aprovechado. Estudios recientes reportan para esta bahía entre 131 y 205 especies de macroalgas (Espinoza-Avalos, 1993; Cruz-Ayala 1996), lo que representa un recurso natural útil para realizar estudios en la búsqueda de compuestos bioactivos. Entre las algas de mayor abundancia en este lugar se encuentran las del género *Ulva*, *Caulerpa sertularioides*, *Sargassum sinicola*, *Hydroclathrus clathratus*, *Spyridia filamentosa*, *Laurencia johnstonii* y *L. pacifica* (Cruz-Ayala 1996).

La importancia de este tipo de estudios es que a partir del aislamiento, purificación, identificación y elucidación de las estructuras de los compuestos activos se pueden plantear las estrategias necesarias para su aprovechamiento en diversas áreas de interés médico, farmacológico o de agricultura, ganadería y acuicultura. Por otra parte estos compuestos pueden servir como modelos para su síntesis química y su posterior aprovechamiento.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- ◆ **Evaluar la actividad antibacteriana de *Sargassum sinicola* Setchell & Gardner 1924 (Sargassaceae: Phaeophyta) y *Laurencia johnstonii* Setchell & Gardner 1924 (Rhodomelaceae: Rhodophyta) de la Bahía de La Paz, B.C.S.. México, en distintas épocas del año para determinar su aprovechamiento potencial como fuente de compuestos bioactivos.**

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ≪≪ **Determinar la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Sargassum sinicola* en bacterias Gram (+) y Gram (-).**
- ≪ **Determinar la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Laurencia johnstonii* en bacterias Gram (+) y Gram (-).**
- ≪ **Determinar la variación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos de *S. sinicola* y *L. johnstonii* en distintas épocas de recolecta.**
- ≪ **Determinar la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidos a partir de los extractos crudos de *S. sinicola* y *L. johnstonii* en bacterias Gram (+) y Gram (-) y su variación en los meses de recolecta**

5. ÁREA DE ESTUDIO

La Bahía de La Paz es el cuerpo de agua más grande del litoral este de la península de Baja California, ocupa una superficie de aproximadamente 1200 Km². Se localiza entre los 24° 47' y 24° 06' N y los 110° 18' y 110° 40' W (Fajardo-León 1994). Está limitada al norte por Punta Cabeza de Mechudo, la ensenada de La Paz al sur, la isla Espiritu Santo, el canal de San Lorenzo y Punta Pichilingue al este.

La Bahía de La Paz, se localiza dentro de una zona con clima semi-árido y los aportes de agua dulce son escasos. El régimen de lluvias es en verano con un máximo en septiembre. la precipitación pluvial anual promedio es de 210-215 mm (Villamar 1965). La humedad promedio anual varía del 66 al 72 %, lo que hace que esta zona sea seca o desértica (Espinoza-Avalos 1979). La temperatura presenta un pico máximo en verano (agosto) y una mínima en invierno (febrero). La salinidad media se mantiene en 34.5 ‰. Los vientos dominantes de noviembre a marzo provienen del noroeste y se les llama localmente "Collas". de abril a agosto circulan con dirección oeste-sureste y son conocidos como "Coromueles": también existe la influencia de ciclones tropicales durante los meses más lluviosos (Espinoza-Avalos 1979). Geológicamente presenta una alternancia de claros arenosos con afloramientos rocosos. La vegetación de la línea costera está constituida principalmente de mangles que se localizan en diversos manchones alrededor de las marismas en la ensenada, así como en partes protegidas a lo largo de la línea costera que forma la bahía (Villamar 1965).

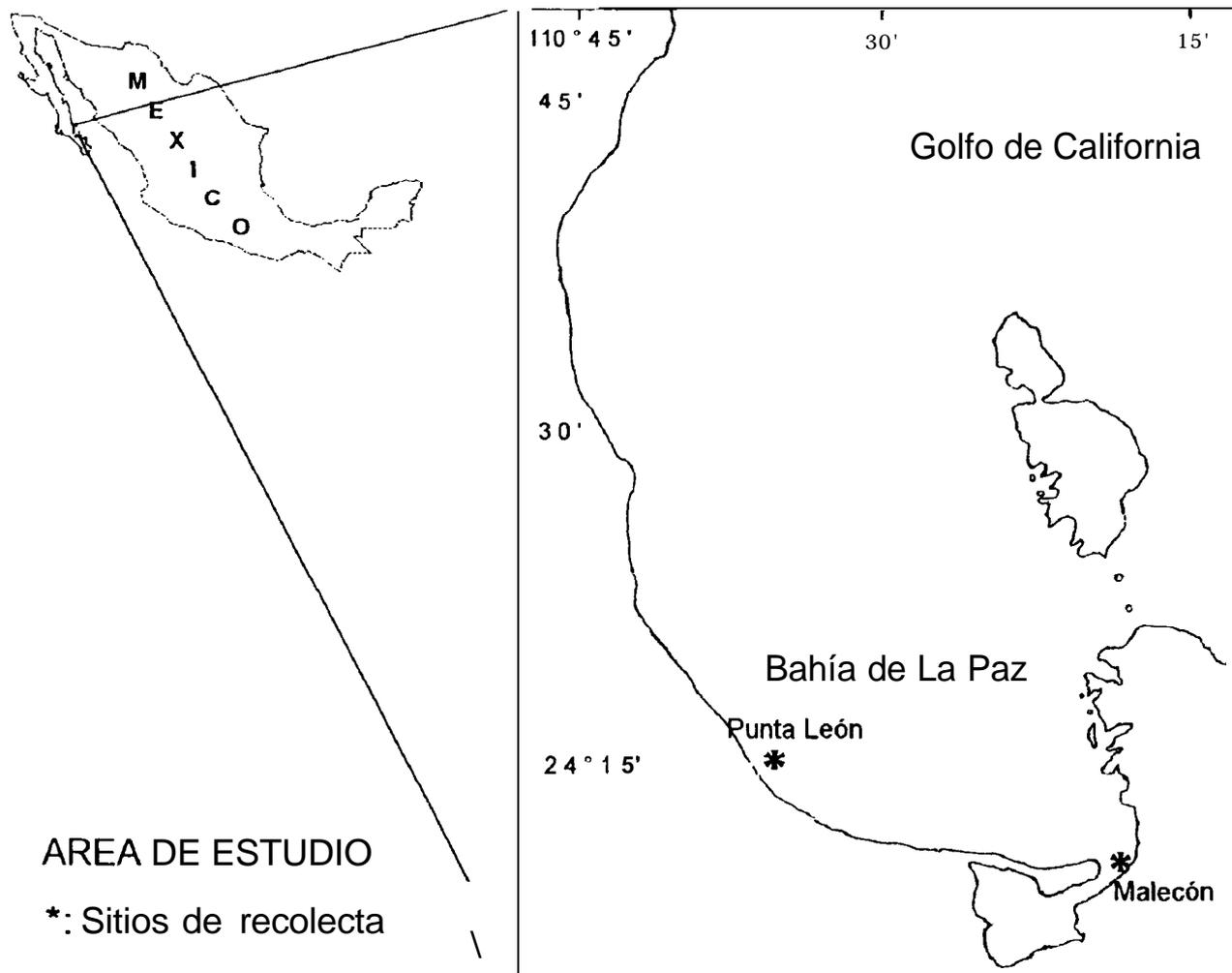


Fig. 1. Localización del área de estudio y puntos de recolecta de las algas marinas en la Bahía de La Paz.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Recolecta y preparación de las algas

Las algas se recolectaron en las áreas conocidas como El Malecón y Punta León en la Bahía de La Paz (Fig. 1), durante febrero, junio y agosto de 1994 para *S. sinicola* y febrero, junio de 1994 y enero, marzo de 1995 para *L. johnstonii*. Se recolectaron en la zona submareal mediante buceo libre. Se eligieron algas que preferentemente estuvieran libres de epífitas y que presentaran un aspecto “saludable”. Estas se obtuvieron mediante una poda parcial cortando solo desde la base del talo. En el

campo se lavaron con agua de mar superficial para eliminar la mayor cantidad de materia extraña a la planta, posteriormente se colocaron en bolsas de polietileno y sobre el hielo para su conservación y transporte al laboratorio, de esta forma, se evita su descomposición y la pérdida de metabolitos secundarios (Vidyavathi y Sridhar 1991).

El material recolectado se identificó hasta especie, separándose una porción de referencia que fue depositado en el Laboratorio de Macroalgas del CICIMAR y el resto se utilizó para los bioensayos. En el laboratorio, las algas se enjuagaron nuevamente con agua marina y se limpiaron de epifitas, conchas y materia extraña que fuera visible a simple vista; posteriormente se lavaron con agua dulce corriente para remover las epifitas remanentes y la sal en la superficie de las muestras. Para su preservación y almacenamiento, se secaron a la sombra y se guardaron en bolsas de plástico a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización (Rao y Parekh 1981; Castro-Reyes et al., 1995).

6.2. Obtención del extracto crudo

El extracto crudo de cada alga se preparó con etanol en una proporción de 1:5. (peso del alga seca : solvente). El alga se molió en licuadora y se dejó macerar con el solvente durante 24 h a temperatura ambiente. El extracto crudo se concentró en un rotoevaporador, a una temperatura constante de 40 ± 2 °C en un tiempo aproximado de 30 a 40 minutos. Se registró la cantidad de extracto crudo obtenido.

6.3. Fraccionamiento de *Sargassum sinicola*.

El fraccionamiento de los extractos crudos de *S. sinicola* se realizó mediante el método de Soxhlet, utilizando como eluyentes éter de petróleo 30-60 (ep), cloroformo (cl), acetona (ac) y metanol (me). El extracto crudo fue adsorbido en sílica-gel (30-60 malla) en una relación 1:5 (peso del extracto:sílica-gel), y posteriormente colocado en un cartucho de celulosa para su fraccionamiento. La cantidad de cada solvente utilizado fue de 100 ml y la temperatura fue variable dependiendo del punto de ebullición del solvente en uso. El tiempo de reflujo fue variable y dependía de que el solvente al momento del reflujo no presentara ninguna coloración, en ese momento se cambiaba de

eluyente. Las fracciones se concentraron en un rotoevaporador a una temperatura constante de 40 ± 1 °C en un tiempo aproximado de 30 a 40 minutos.

6.4. Fraccionamiento de *Laurencia johnstonii*

Cada uno de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* fue adsorbido en sílica-gel (**30-60** malla) en una relación 1:10 (peso del extracto:sílica-gel) y se colocaron en un filtro Goch por el cual se hacían pasar 100 ml del solvente en un sistema al vacío (5 psi). Los eluyentes utilizados fueron éter de petróleo 30-60 (ep). cloroformo (cl). acetona (ac) y metanol (me). Las fracciones así obtenidas se concentraron en un rotoevaporador a una temperatura constante de 40 ± 1 °C en un tiempo aproximado de 30 a 40 minutos.

6.5. Bioensayos

A los extractos crudos, así como a las fracciones que se derivaron de estos, se les determinó su actividad antibacteriana en contra de cultivos de bacterias Gram (+) tales como *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis* ATCC 292 12 y Gram (-) tales como *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, por el método de difusión en placa (Jensen *et al.*, 1996). Para determinar la actividad antibacteriana del extracto crudo y las fracciones respectivas, se impregnaron sensidiscos de papel filtro estéril (Whatman No. 3) de ¼ de pulgada de diámetro con una concentración de 100 y 200 µg del extracto o fracción a probar y se colocaron por triplicado en las cajas ya inoculadas. Para inocular las cajas, se preparó una suspensión de bacterias equivalente al 0.5 del nefelómetro de MacFarland y se sembraron homogéneamente con hisopos estériles en medio nutritivo Müller-Hinton (aproximadamente 15 ml/caja), medio nutritivo que se recomienda para este tipo de pruebas por el tipo de compuestos probables que pueden encontrarse en los extractos crudos o fracciones de estas algas (Ríos *et al.*, 1988). Las zonas claras que se formaron alrededor de los sensidiscos se consideraron como halos de inhibición y se midieron a las 24 h con un vernier (tipo 69 14 de Bel- Art products), con una precisión de 0.01 mm. Se hicieron pruebas positivas con sensidiscos de diversos antibióticos comerciales marca Bigaux con doce antibacterianos (Tabla 1), para Gram (+) y Gram (-), para comparar el tamaño de

los halos de inhibición con el de los extractos y fracciones algales. Se hicieron testigos negativos con los sensidiscos en blanco y con el solvente usado en la impregnación de los mismos.

Se realizaron análisis de varianza para determinar el efecto de los meses de recolecta, la concentración del extracto o fracción algal impregnada en los sensidiscos y. en su caso. las fracciones que resultaron activas mediante el uso del paquete estadístico Statistica V. 5.0 (StatSoft, Inc. 1995). Salvo en el caso del análisis de varianza de los extractos crudos de *L. johnstonii*, el cual se hizo siguiendo el procedimiento para análisis de varianza bifactorial con numero de muestra distinto (Sokal y Rolhlf 1981). Se debe mencionar que solo se utilizaron los valores positivos de las pruebas de actividad antibacteriana para los distintos análisis de varianza.

Antibióticos para bacterias Gram (+)			Antibióticos para bacterias Gram (-)		
nombre	µg	clave	nombre	µg	clave
Ampicilina	10	AM	Amikacina	30	AK
Cefalotina	30	CF	Ampicilina	10	AM
Cefotaxima	30	CTX	Carbenicilina	100	CB
Ceftazidima	30	CAZ	Cefalotina	30	CF
Cefuroxima	30	CXM	Cefalotaxima	30	CTX
Dicloxacilina	1	DC	Ceftriaxona	30	CR0
Eritromicina	15	E	Cloranfenicol	30	CL
Gentamicina	10	GE	Gentamicina	10	GE
Peflosacina	5	PEF	Netilmicina	30	NET
Penicilina	10 u	PE	Nitrofurantoina	300	NF
Tetraciclina	30	TE	Peflosacina	5	PEF
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25	SXT	Trimetoprim- Sulfametoxazol	25	SXT

Tabla I. Nombre, concentración y clave de los antibióticos comerciales empleados en los antibiogramas.

7. RESULTADOS

7.1. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Sargassum sinicola*

Se prepararon extractos crudos del alga obteniéndose el **0.37, 0.85 y 0.57 %** de peso seco, para los meses de febrero, junio y agosto respectivamente. En los bioensayos con los extractos crudos de esta alga, solo se registró actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* en todos los meses de recolecta (Tabla 2). No se detectó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Mes de recolecta	Concentración (µg)	
	100	200
Febrero/94	7.05 ± 0.07	9.5 ± 1.34
Junio/94	9.7 ± 0.70	11.8 ± 1.62
Agosto/94	7.3 ± 0.21	6.7 ± 0.42

Tabla 2. Valor promedio (n=2) de los halos de inhibición (mm) ± una desviación estándar en la actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Sargassum sinicola* contra *Bacillus subtilis*.

La mayor actividad antibacteriana se registró con las algas recolectadas en el mes de junio, con un halo de inhibición, en promedio (n=2) de **9.7 ± 0.70 y 11.8 ± 1.62 mm** para las concentraciones de 100 y **200 µg** respectivamente. En los meses de febrero y agosto se registró una actividad antibacteriana menor (Fig. 2).

El análisis de **varianza** bifactorial de estos datos, indica que existe una diferencia significativa entre los meses de recolecta ($p < 0.05$), no así entre las concentraciones empleadas y la interacción entre ellos ($p > 0.05$) (Tabla 3). Esta diferencia significativa en los meses de recolecta, esta influenciada por la mayor actividad del mes de junio y la menor actividad en los meses de febrero y agosto (Tukey, < 0.05). A pesar de que no existe una diferencia significativa por la concentración del extracto crudo se observa, en general, un mayor halo de inhibición a mayor concentración empleada. Existe una evidente diferencia en el efecto sobre las cepas bacterianas ya que la única inhibida fue *B. subtilis*, no así *S. aureus* y *Ps. aeruginosa*.

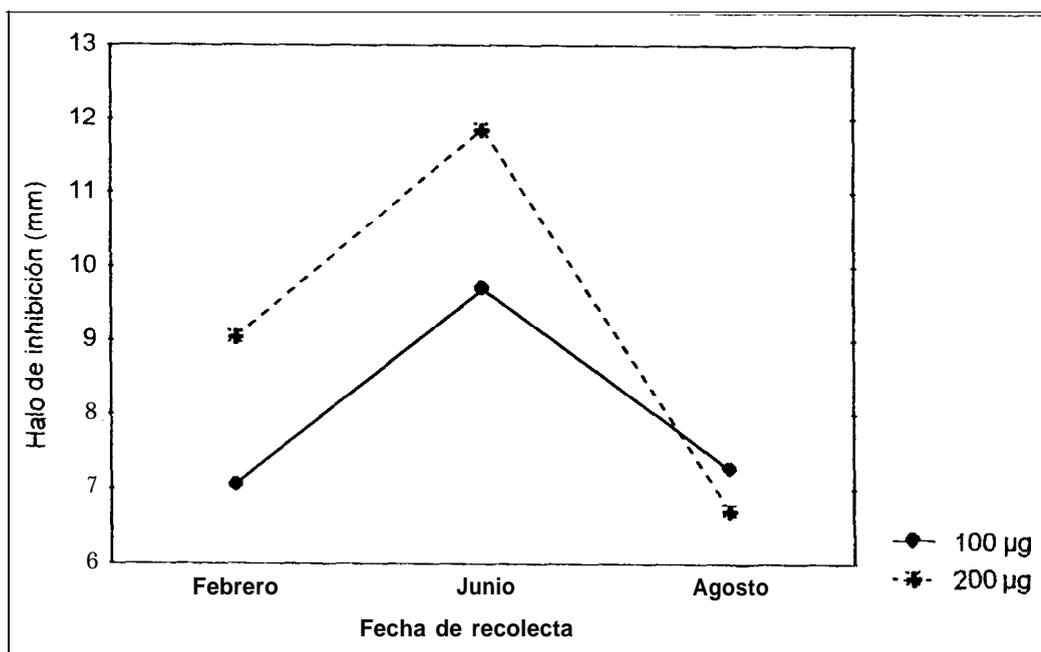


Fig. 2. Valor promedio (n=2) en los halos de inhibición (mm) de los extractos crudos de *Sargassum sinicola* vs *Bacillus subtilis* en los meses de recolecta.

Fuente de variación	G. L.	Suma de Cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia
Meses (feb, jun y ago)	2	30.695	17.77	0.0030
Concentración (100 y 200 µg)	1	4.32	5.00	0.0666
Meses vs Concentración	2	4.60	2.66	0.1483
Residual	6	5.18		

Tabla 3. Valores del análisis de varianza bifactorial que mide el efecto de los extractos crudos de *Sargassum sinicola* de los meses de recolecta y la concentración contra *Bacillus subtilis*.

7.2. Actividad antibacteriana de las fracciones de *Sargassum sinicola*.

Ninguna de las fracciones obtenidas con éter de petróleo y metanol de los tres meses de recolecta presentaron actividad antibacteriana. ésta solo se registró para las fracciones obtenidas con cloroformo y acetona de forma diferencial para los distintos meses de recolecta. En febrero y junio la única cepa inhibida fue *B. subtilis* con la fracción clorofórmica y cetónica respectivamente (Tablas 4a, 4b y Figs. 3a, 3b). No se detectó actividad contra ninguna otra cepa en estos meses. En agosto esas

dos fracciones presentaron actividad antibacteriana contra *B. subtilis* (Fig. 3c) y además la fracción clorofórmica inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Ps. aeruginosa*, sin inhibir el crecimiento de *Streptococcus faecalis* (Tabla 4c).

a)

Mes de recolecta: febrero	Cepa bacteriana	
Fracción	IL	
Concentración (µg)	100	200
Cloroformo	6.6 ± 0.57	6.2 ± 0.10
Acetona	0	0

b)

Mes de recolecta: junio	Cepa bacteriana	
Fracción	Bs	
Concentración (µg)	100	200
Cloroformo	0	0
Acetona	6.8 ± 0.23	7.4 ± 0.20

c)

Mes de recolecta: Agosto	Cepa bacteriana									
Fracción	Bs		Sa		Sf		Ec		Psa	
Concentración (µg)	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200
Cloroformo	6.9 ± 0.66	8.4 ± 0.46	6.1	13.3 ± 0.35	0	0	0	6.1	6.1	19.0 ± 0.30
Acetona	6.1	6.1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 4a, b y c. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) ± una desviación estándar de las fracciones de *Sargassum sinicola* en contra de. Bs: *Bacillus subtilis*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Sf: *Streptococcus faecalis*; Ec: *Escherichia coli*; Psa: *Pseudomonas aeruginosa*. Cuando no se presenta la desviación estándar esta es igual a 0.

Se realizó un análisis de varianza bifactorial con los datos de agosto para las fracciones activas contra *B. subtilis*, y la concentración utilizada, los resultados indican que en ambos factores se observan diferencias significativas, además, existe un efecto significativo por la interacción entre ambos factores ($p < 0.05$) (Tabla 5). En este punto cabe destacar que existe una diferencia entre los halos de inhibición generados por la fracción clorofórmica cuyos valores fueron mayores a los registrados por la fracción cetónica (Fig. 3c).

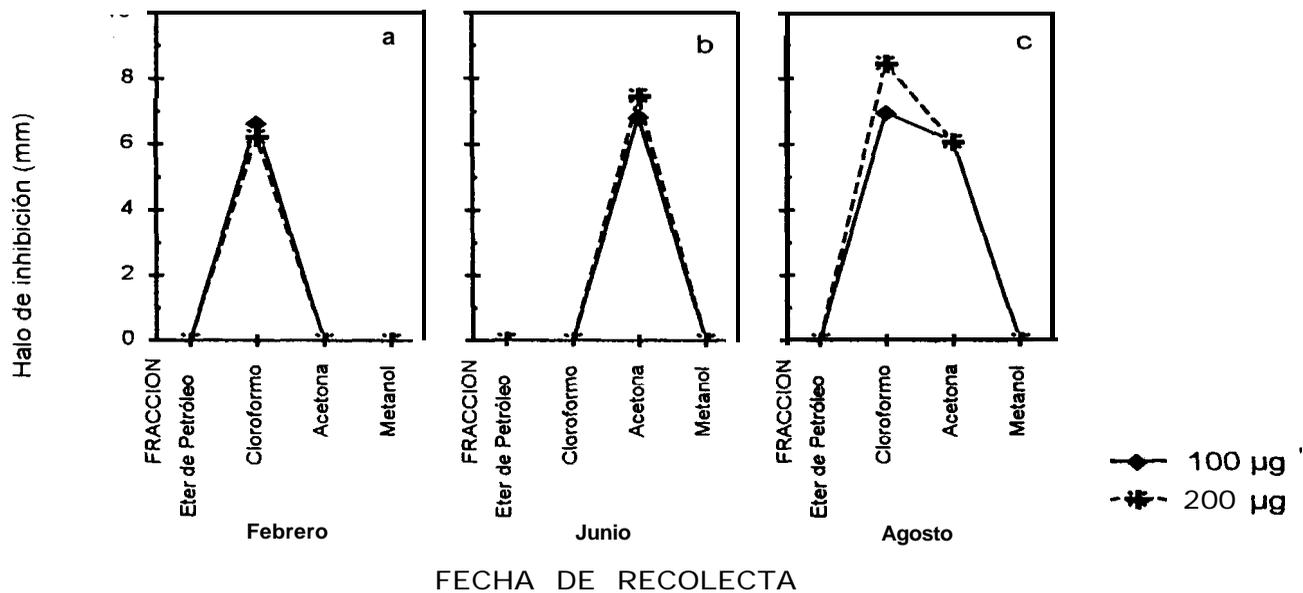


Fig. 3a, b y c. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones obtenidas de los extractos crudos de *Sargassum sinicola* en los distintos meses de recolecta en contra de *Bacillus subtilis*.

Fuente de variación	G. L.	Cuadrado medio	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia
Agosto				
Fración (cl- ac)	1	7.84	47.76	0.0001
Concentración (100 y 200 µg)	1	1.68	10.27	0.0124
Fración vs Concentración	1	1.68	10.27	0.0124
Residual	8	1.31		

Tabla 5. Análisis de varianza bifactorial, que mide el efecto de las fracciones activas (cloroformo y acetona) y la concentración de *Sargassum sinicola* recolectada en agosto sobre *Bacillus subtilis*.

Se realizó un análisis de varianza bifactorial de las fracciones activas contra *B. subtilis* comparando los datos de febrero y agosto (cloroformo), y junio y agosto (acetona) respectivamente. Los resultados indican que existen diferencias significativas ($p < 0.001$) en los meses de recolecta y por la interacción entre los meses de recolecta y la concentración en los sensidiscos en ambos casos

($p < 0.05$). La concentración tuvo un efecto significativo con la fracción cetónica en junio y agosto ($p < 0.05$), no así en la fracción clorofórmica de febrero y agosto ($p > 0.05$). (Tablas 6 y 7)

Fuente de variación	G. L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia
Fracción: cloroformo				
Meses de recolecta (feb y ago)	1	5.07	30.26	0.0006
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.85	5.09	0.0540
Fecha vs concentración	1	2.80	16.73	0.0035
Residual	8	1.34		

Tabla 6. Análisis de varianza bifactorial de la fracción activa (cloroformo) del alga *Sargassum sinicola* considerando los meses de recolecta (febrero y agosto) y la concentración (100 y 200 µg) contra *Bacillus subtilis*.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia
Fracción: acetona				
Meses de recolecta (jun y ago)	1	3.30	136.58	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.30	12.42	0.0078
Fecha vs concentración	1	0.30	12.42	0.0078
Residual	8	0.19		

Tabla 7. Análisis de varianza de la fracción activa (acetona) del alga *Sargassum sinicola* considerando los meses de recolecta (junio y agosto), y la concentración (100 y 200 µg) contra *Bacillus subtilis*

Se realizó un análisis de varianza bifactorial donde se comparó la actividad antibacteriana de la fracción clorofórmica del alga recolectada en agosto sobre las cepas en que fue activa y la concentración de la fracción en los sensibilizadores; los resultados indican que existen un efecto significativo ($p < 0.0001$) por la cepa bacteriana, por la concentración utilizada y por la interacción entre ambos factores (Tabla 8). La diferencia significativa en las cepas está influida por que se observó una mayor efecto de la fracción clorofórmica contra la cepa *Ps. aeruginosa*, ligeramente menor en *S. aureus* y menor en *B. subtilis*. En general, se registró un mayor halo de inhibición a mayor concentración y la interacción entre ambos factores en este caso fue significativa dado que la concentración no afectó de la misma manera a las cepas bacterianas, registrándose un efecto muy marcado por la concentración de 200 µg solo en el caso de *Ps. aeruginosa*, contrastando con los halos de inhibición generados en las otras dos cepas con la misma concentración que fueron muy semejantes. (Tabla 4c)

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado medio	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia
Fracción: cloroformo				
Cepa bacteriana (Bs, Sa y Psa)	2	35.87	246.5	0.00001
Concentración (100 y 200 µg)	1	236.17	1622.5	0.00001
Cepa vs concentración	2	49.31	338.8	0.00001
Residual	12	1.74		

Tabla 8. Análisis de varianza bifactorial de la fracción clorofórmica del alga *Sargassum sinicola* recolectada en agosto considerando la cepa bacteriana (*Bacillus subtilis*(Bs), *Streptococcus aureus* (Sa) y *Pseudomonas aeruginosa*(Psa)) y la concentración (100 y 200 µg).

7.3. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii*.

Laurencia johnstonii se recolectó en los meses de febrero y junio de 1994; enero y marzo de 1995, obteniéndose 1.75, 1.84, 2.40 y 2.75% de extracto crudo en relación al peso seco del alga utilizada, respectivamente. Se probó la actividad antibacteriana de los extractos crudos registrándose los siguientes valores (Tabla 9) :

Mes de recolecta	Concentración (µg)		Cepa bacteriana
	100	200	
Febrero/94	19.4 ± 0.72	19.7 ± 0.35	<i>Bacillus subtilis</i>
	17.0 ± 0.45	17.5 ± 0.45	<i>Staphylococcus aureus</i>
	16.1 ± 1.05	16.9 ± 0.29	<i>Escherichia coli</i>
Junio/94	17.8 ± 0.40	19.2 ± 0.40	<i>B. subtilis</i>
	15.3 ± 0.35	16.4 ± 0.15	<i>S. aureus</i>
	15.3 ± 0.63	15.5 ± 0.45	<i>E. coli</i>
Enero/95	22.2 ± 0.63	21.3 ± 1.13	<i>B. subtilis</i>
	20.9 ± 2.12	22.0 ± 1.48	<i>S. aureus</i>
	16.7 ± 0.63	19.4 ± 0.24	<i>E. coli</i>
Marzo/95	13.5 ± 0.56	14.0 ± 0	<i>B. subtilis</i>
	15.0 ± 0.55	14.8 ± 0.40	<i>S. aureus</i>
	0	0	<i>S. faecalis</i>
	0	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla 9. Halos de inhibición (mm) en promedio (n=3, salvo el caso de enero cuyo n=2) ± una desviación estándar de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* en los distintos meses de recolecta.

De los extractos crudos probados el obtenido en enero generó los mayores halos de inhibición contra las cepas utilizadas. seguido del extracto de febrero, junio y marzo en orden descendente. Para las concentraciones empleadas se registra entre los promedios una diferencia mínima, siendo mayor en general el halo de inhibición generado por la mayor concentración. Los resultados indican que las cepas más sensibles fueron *B. subtilis* (Fig. 4) y *S. aureus* (Fig. 5), en las que se registraron los mayores halos de inhibición. En el único mes (marzo/95) en que fue utilizada la cepa *S. faecalis* no se registro actividad antibacteriana. Cabe resaltar que se registró actividad antibacteriana contra *E. Coli* (Fig. 6) con los extractos crudos en que fue utilizada (Tabla 9).

Con estos resultados se realizaron análisis de varianza bifactoriales para cada cepa que fue inhibida, los cuales incluían el mes de recolecta del alga y la concentración utilizada. Para *B. subtilis* los resultados del análisis de varianza bifactorial (Tabla 10), indican que existen diferencias significativas entre los meses de recolecta y en la interacción de los meses de recolecta y la concentración ($p < 0.05$). La concentración por si sola no reportó diferencias significativas ($p > 0.05$). La diferencia entre los meses de recolecta se determinó por los valores de los halos de inhibición de los extractos obtenidos en enero y marzo (Tukey, $p < 0.05$), que presentaron el mayor y menor halo de inhibición respectivamente (Fig. 4)

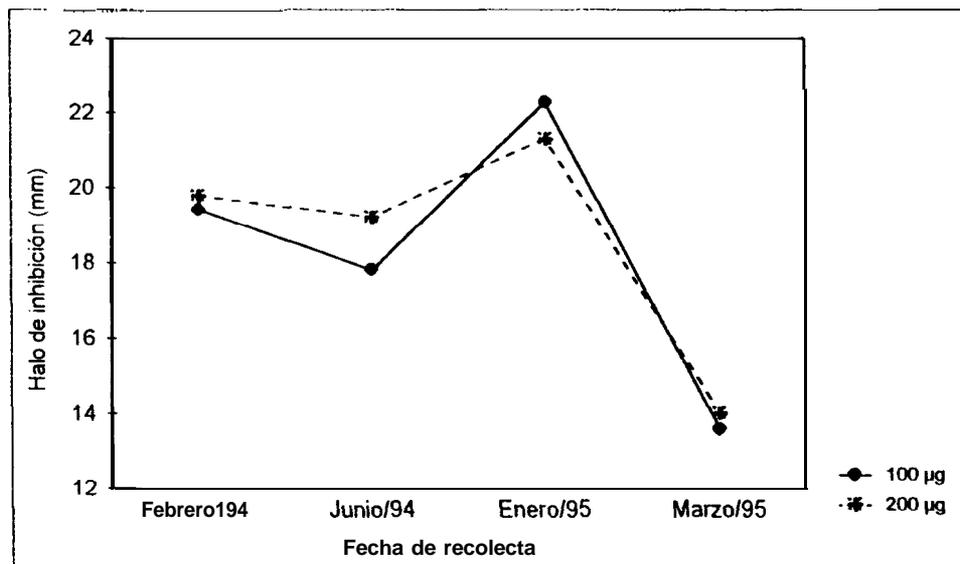


Fig. 4. Halos de inhibición (mm) promedio (n=3) de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* en los distintos meses de recolecta contra *Bacillus subtilis*.

En el caso de *S. aureus* se presentaron diferencias significativas entre los meses de recolecta y la concentración, no así en la interacción de ambos factores (Tabla 10). Esta diferencia es el resultado de los halos de inhibición generados por el alga recolectada en enero que fueron los mayores que para los otros meses, y en general, la mayor concentración generó un halo de inhibición de mayor tamaño, salvo en el caso de marzo, en el que la menor concentración generó un halo de inhibición mayor (Fig. 5).

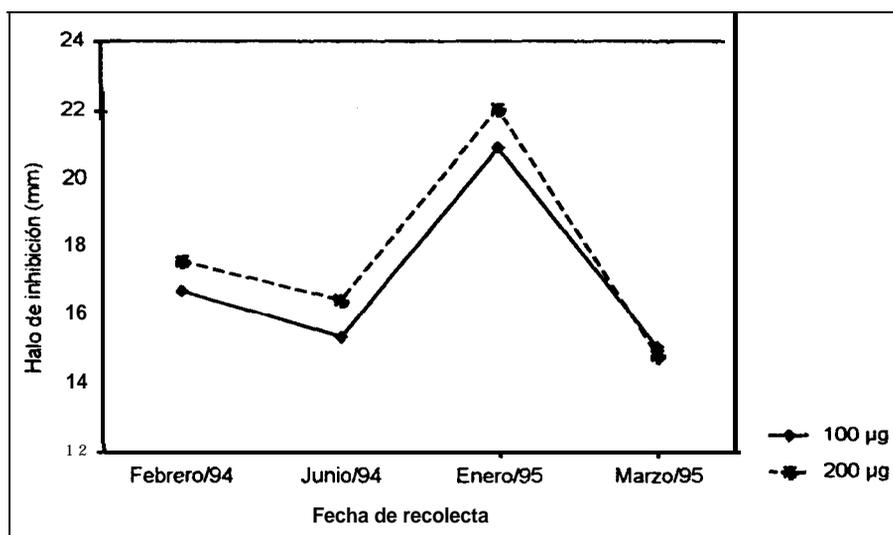


Fig. 5. Halos de inhibición (mm) promedio (n=2) de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* de los distintos meses de recolecta contra *Staphylococcus aureus*

Para *E. coli* solo se analizaron las tres fechas en que fue utilizada, febrero, junio y enero, mostrando diferencias significativas por los meses de recolecta, por la concentración y por la interacción entre ambos factores ($p < 0.05$) (Tabla 10). En este caso se notó una variación de la actividad antibacteriana, siendo mayor en enero y menor en junio (Fig. 6). El efecto significativo por la concentración fue debido a que en el mes de enero la diferencia entre éstas es mayor a la diferencia que se presenta en junio. Esta respuesta sugiere que existe un efecto por la interacción de los meses de recolecta y la concentración empleada en la inhibición de esta cepa, debido a que parece que conforme el alga se desarrolla, el o los compuestos responsables de la inhibición de esta cepa disminuyen en su concentración.

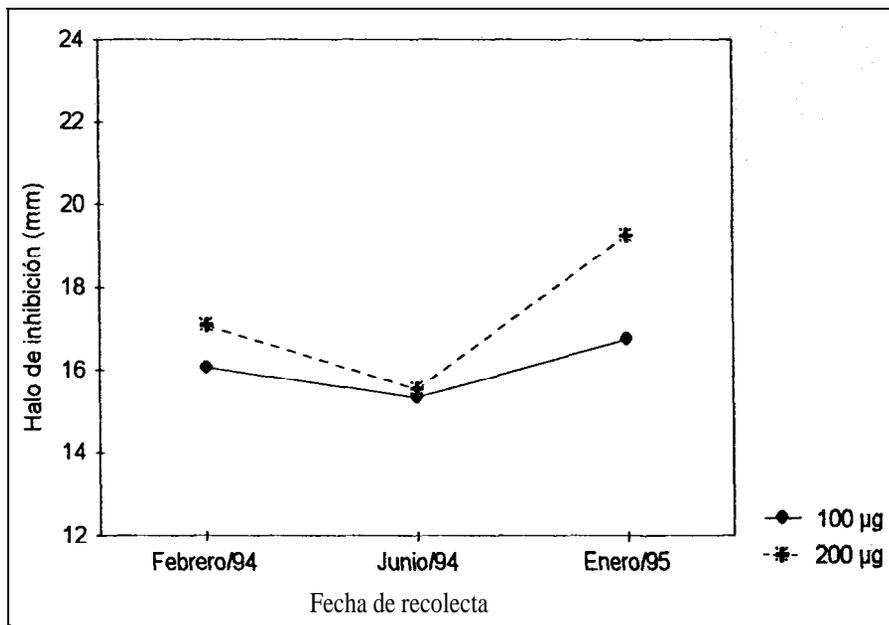


Fig. 6. Halos de inhibición (mm) promedio (n=3) de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* de los distintos meses de recolecta contra *Escherichia coli*.

Fuente de variación	G. L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia
<i>B. subtilis</i>				
Mes (feb, jun, ene y mar)	3	180.05	196.00	0.0000
Concentracibn	1	1.00	3.21	>0.05
Mes vs Concentración	3	3.24	3.53	co.05
Residual	14	4.28		
<i>S. aureus</i>				
Mes (feb. jun, ene y mar)	3	113.08	57.20	0.0000
Concentración	1	1.86	2.82	>0.05
Mes vs Concentración	3	1.67	0.84	>0.05
Residual	14	9.22		
<i>E. coli</i>				
Mes (feb. jun y ene)	2	1208.68	1400.02	0.0000
Concentracibn	1	3.68	8.52	co.05
Mes vs Concentración	2	5.16	5.98	co.05
Residual	10	4.31		

Tabla 10. Resultado del análisis de varianza bifactorial que incluye el mes de recolecta y la concentración empleada de los extractos crudos del alga *Laurencia johnstonii* en contra de las cepas que fue activa.

7.4. Actividad antibacteriana de las fracciones de *Laurencia johnstonii*.

Por fraccionamiento de los extractos crudos de los distintos meses de recolecta del alga *L. johnstonii*, se obtuvieron en total 16 fracciones, de las cuales las obtenidas con metanol no presentaron actividad antibacteriana; con el resto de las fracciones se registraron los siguientes resultados (Tabla 11):

Mes de recolecta: Febrero/94	Cepa bacteriana					
Fracción	Bs		Sa		Sf	
Concentración (µg)⇒	100	200	100	200	100	200
Éter de petróleo	8.6 ± 0.15	9.0 ± 0.11	10.5 ± 0.51	10.8 ± 0.47	0	0
Cloroformo	10.2 ± 0.20	10.5 ± 0.05	11.7 ± 0.56	11.9 ± 0.30	7.6 ± 0.30	7.7 ± 0.23
Acetona	6.5 ± 0.17	6.9 ± 0.11	6.6 ± 0.20	7.0 ± 0.40	0	0
Mes de recolecta: Junio/94	Cepa bacteriana					
Fracción	Bs		Sa		Sf	
Concentración (µg)⇒	100	200	100	200	100	200
Éter de petróleo	13.2 ± 0.92	12.9 ± 0.70	12.8 ± 0.45	13.6 ± 0.28	11.1 ± 0.41	10.7 ± 0.35
Cloroformo	14.2 ± 0.05	13.8 ± 0.36	21.9 ± 0.85	20.8 ± 1.55	13.5 ± 0.15	12.7 ± 0.58
Acetona	6.9 ± 0.05	7.0 ± 0.11	6.1 ± 0.01	6.2 ± 0.01	0	0
Mes de recolecta: Enero/95	Cepa bacteriana					
Fracción	Bs		Sa		Sf	
Concentración (µg)⇒	100	200	100	200	100	200
Éter de petróleo	18.7 ± 0.45	18.1 ± 0.26	16.0 ± 0.50	15.9 ± 0.17	0	0
Cloroformo	11.5 ± 0.37	11.5 ± 0.10	9.6 ± 0.11	10 ± 0.17	8.5 ± 0.30	8.7 ± 0.23
Acetona	0	0	0	0	0	0
Mes de recolecta: Marzo/95	Cepa bacteriana					
Fracción	Bs		Sa		Sf	
Concentración (µg)⇒	100	200	100	200	100	200
Éter de petróleo	16.0 ± 0.92	16.3 ± 0.70	17.6 ± 0.45	16.7 ± 0.28	13.7 ± 0.41	13.9 ± 0.35
Cloroformo	13.9 ± 0.05	13.3 ± 0.36	14.6 ± 0.85	15.2 ± 1.55	11.3 ± 0.15	11.6 ± 0.58
Acetona	6.4 ± 0.05	6.8 ± 0.11	12.3 ± 0.01	12.7 ± 0.01	0	0

Tabla 11. Halos de inhibición (mm) promedio (n=3) ± una desviación estándar de las fracciones activas de *Laurencia johnstonii* en los distintos meses de recolecta. Las cepas bacterianas inhibidas fueron: Bs: *Bacillus subtilis*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Sf: *Streptococcus faecalis*. Las cepas Gram (-) fueron resistentes.

Estos resultados, indican que las fracciones etéreas, clorofórmicas y cetónicas fueron las que presentaron halos de inhibición contra las bacterias Gram (+) *B. subtilis* (Fig. 7), *S. aureus* (Fig. 8) y *S. faecalis* (Fig. 9). No se registró actividad antibacteriana contra las bacterias Gram (-) *E. coli* y *Ps. aeruginosa*. Se realizó un análisis de varianza para cada extracto de acuerdo a las fracciones que fueron activas y para cada cepa bacteriana. Salvo en el caso que se indica, el análisis de varianza incluye a la fracción etérea, clorofórmica y cetónica para *B. subtilis* y *S. aureus*. Para *S. faecalis* se indica las fracciones que se incluyeron en el análisis de varianza.

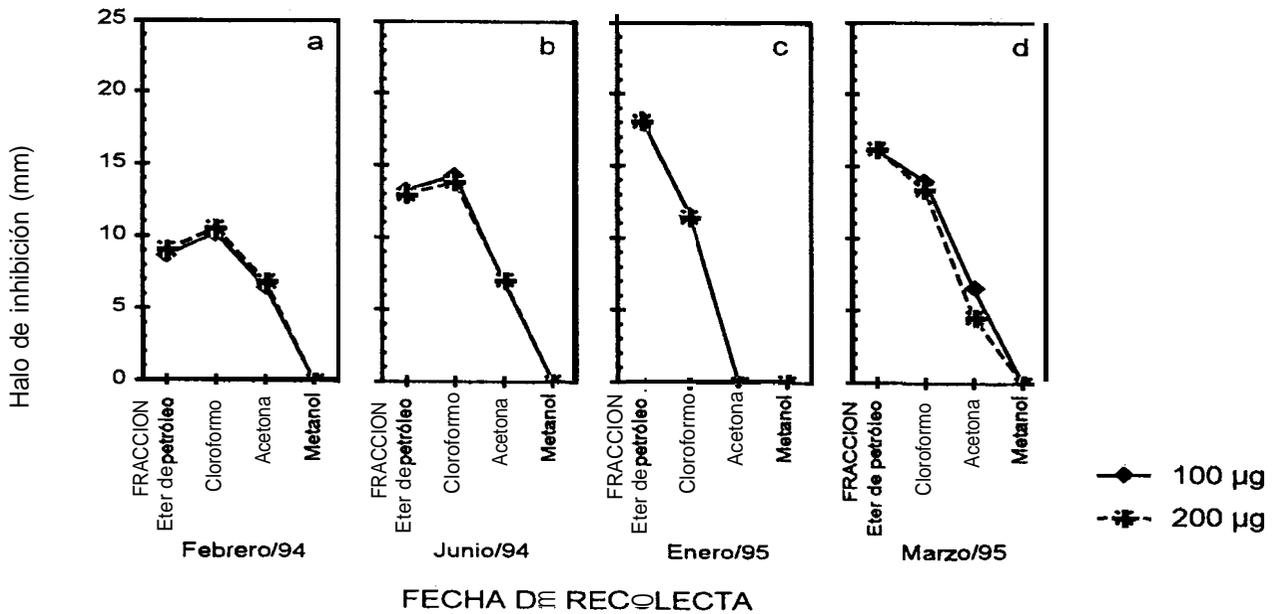
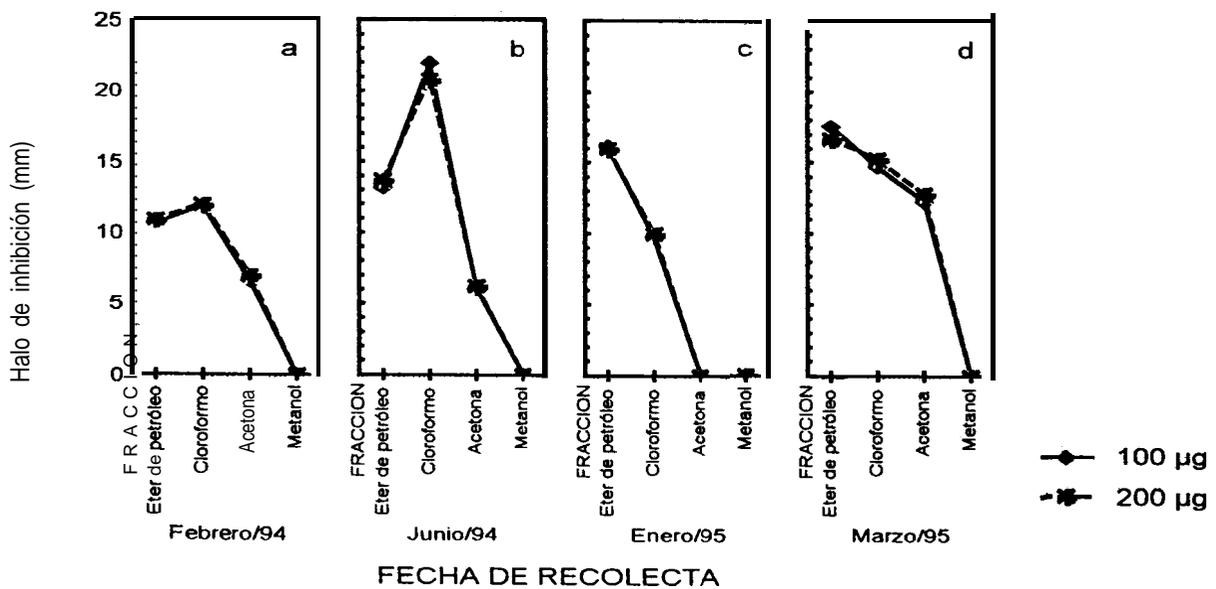
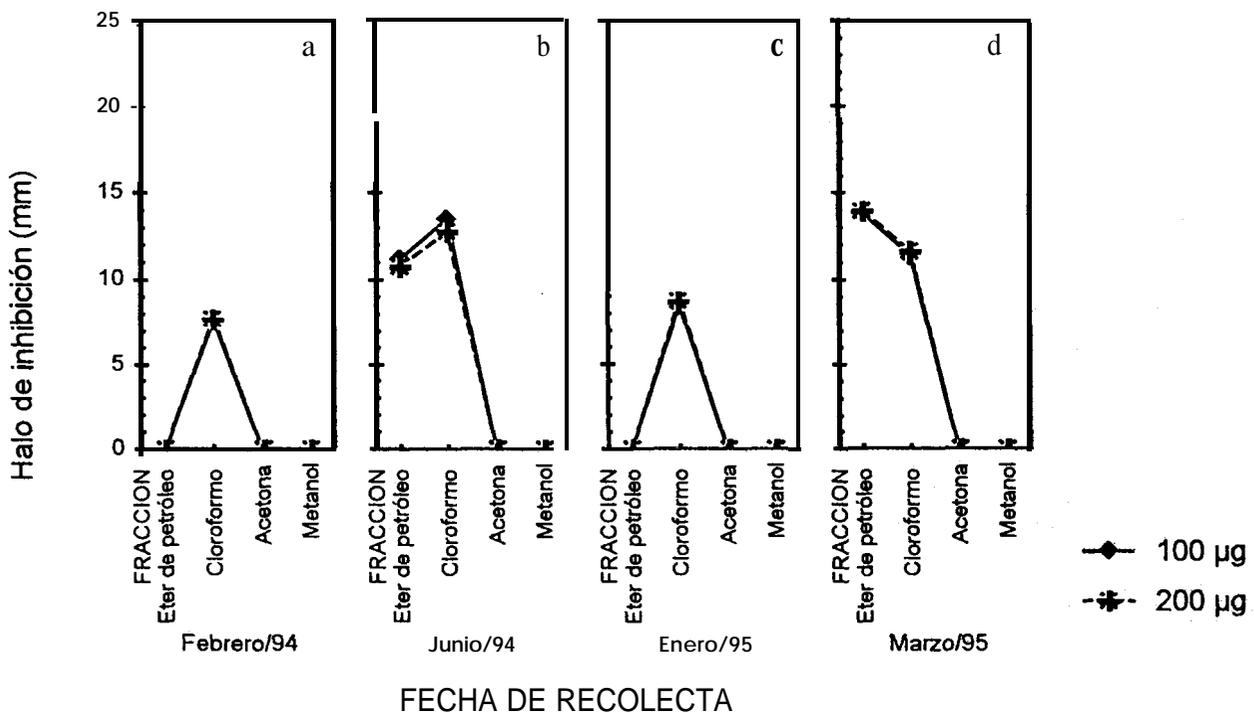


Fig. 7a, b, c y d. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones de *Laurencia johnstonii* vs *Bacillus subtilis* en los distintos meses de recolecta.



Figuras. 8a, b, c y d. Valor promedio (n=3) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones de *Laurencia johnstonii* vs *Staphylococcus aureus* en los distintos meses de recolecta.



Figuras 9a, b, c y d. Valor promedio ($n=3$) de los halos de inhibición (mm) de las fracciones de *Laurencia johnstonii* vs *Streptococcus faecalis* en los distintos meses de recolecta.

El análisis de **varianza** bifactorial para las fracciones del extracto del alga recolectada en febrero, en el caso de *B. subtilis* (Tabla 12), indica que existe un efecto significativo por la fracción y por la concentración ($p < 0.05$), no siendo significativa la interacción de esos dos factores ($p > 0.05$). Para *S. aureus* (Tabla 12), indica que existen diferencias significativas solo entre las fracciones ($P < 0.05$), para la concentración y la interacción entre ambos factores no se encuentra un efecto significativo ($p > 0.05$). Las diferencias entre las fracciones en ambas cepas bacterianas, están dadas por los halos de inhibición generados por la fracción cetónica, los cuales fueron menores en relación a las otras dos fracciones (Figs. 7^a y 8^a). Con la cepa de *S. faecalis* (Fig. 9a) es evidente la diferencia, ya que solo la fracción clorofórmica fue activa y la concentración no tuvo un efecto significativo ($p > 0.05$).

Fuente de variación	G. L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia.
Mes: febrero				
<i>B. subtilis</i>				
Fracción (ep. cl y ac)	2	40.77	873.80	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.63	27.52	0.0002
Fracción vs Concentración	2	0.004	0.09	0.9090
Residual	12	0.28		
<i>S. aureus</i>				
Fracción (ep. cl y ac)	2	84.07	228.58	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.34	1.88	0.1945
Fracción vs Concentración	2	0.04	0.11	0.8951
Residual	12	2.20		

Tabla 12. Valores del análisis de **varianza** bifactorial de las fracciones activas (éter de petróleo, cloroformo y acetona) y la concentración de *Laurencia johnstonii* recolectada en febrero

En el caso de las fracciones obtenidas del extracto crudo del alga recolectada en junio, el análisis de **varianza** bifactorial para *B. subtilis* y *S. aureus* (Tabla 13) indica que solo la fracción tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en la actividad antibacteriana, y la concentración y la interacción entre ambos factores no tuvieron un efecto significativo. Con *S. faecalis* (Tabla 13) solo la fracción etérea y clorofórmica tuvieron actividad antibacteriana y entre ellas existen diferencias significativas ($p < 0.05$) debido a que la fracción clorofórmica tuvo mayores halos de inhibición que la fracción etérea. La concentración presentó también diferencias significativas ($p < 0.05$) ya que a mayor concentración los halos de inhibición fueron menores en relación a la menor concentración, no así la interacción entre ambos factores ($p > 0.05$). La diferencia significativa entre las fracciones, en todos los casos, se debe a que los halos de inhibición generados por la fracción clorofórmica fueron mayores que los generados con la fracción etérea (Figs. 7b, Sb y 9b).

Del extracto **algal** de enero, solo la fracción etérea y clorofórmica presentaron actividad antibacteriana contra *B. subtilis* (Fig. 7c) y *S. aureus* (Fig. 8c). El análisis de **varianza** para cada cepa bacteriana indicó diferencias significativas ($p < 0.05$) por la fracción, pero por la concentración y la interacción entre ambos factores no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) (Tabla 14). Esta diferencia significativa en las fracciones esta determinada por los halos de inhibición generados por la fracción etérea, que fue en ambos casos mayor en relación a la fracción cetónica. Para la cepa *S.*

faecalis (Fig. 9c), fue evidente la diferencia ya que solo la fracción clorofórmica tuvo actividad antibacteriana y por la concentración no hubo diferencias significativas ($p>0.05$).

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Signifkancia.
Mes: junio				
<i>B. sub tilis</i>				
Fracción (ep. cl y ac)	2	174.75	345.96	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.198	0.79	0.3930
Fracción vs Concentración	2	0.287	0.56	0.5832
Residual	12	3.03		
<i>S aureus</i>				
Fracción (ep. cl y ac)	2	698.20	610.07	0.0000
Concentración (100y200 µg)	1	0.14	0.25	0.6250
Fracción vs Concentración	2	2.17	1.89	0.1929
Residual	12	6.86		
<i>S faecalis</i>				
Fracción (ep y cl)	1	14.52	87.55	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	1.08	6.51	0.0341
Fracción vs Concentración	1	0.083	0.50	0.4985
Residual	8	1.32		

Tabla 13.- Valores del análisis de **varianza** bifactorial de las fracciones activas (éter de petróleo, cloroformo y acetona) y la concentración de *Laurencia johnstonii* recolectada en junio. En el caso de *Streptococcus faecalis* solo se incluyen las fracciones éter de petróleo y cloroformo.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Signifcancia
Mes: enero				
<i>B. subtilis</i>				
Fracción (ep y cl)	1	130.68	1225.10	0.0000
Concentración	1	0.01	0.125	0.7328
Fracción vs Concentración	1	0.00	0.00	1.0000
Residual	8	0.853		
<i>S. aureus</i>				
Fracción (ep y cl)	1	113.53	1389.39	0.0000
Concentración	1	0.02	0.25	0.6300
Fracción vs Concentración	1	0.19	2.30	0.1681
Residual	8	0.653		

Tabla 14. Valores del análisis de **varianza** bifactorial que incluye las fracciones activas (éter de petróleo y cloroformo) y la concentración de *Laurencia johnstonii* recolectada en enero.

Para las fracciones del alga recolectada en marzo, el análisis de **varianza** para *B. subtilis* y *S. aureus* (Tabla 15) indica que existe un efecto significativo por la fracción ($p < 0.05$), y que no existe un efecto significativo por la concentración. La diferencia entre las fracciones se deben a que la fracción **cetónica** presentó en ambos casos menores halos de inhibición que las otras dos fracciones (Figs. 7d y 8d). La interacción entre ambos factores en el caso de la primer cepa no es significativa ($p > 0.05$), mientras que para la segunda cepa si es significativa ($p < 0.05$), en este último caso, el resultado es significativo debido a que la menor concentración (100 μg) generó halos de inhibición de mayor tamaño en relación a la mayor concentración (200 μg). En el caso de *S. faecalis* (Fig. 9d), solo las fracciones etérea y clorofórmica presentaron actividad antibacteriana y el análisis de **varianza** bifactorial indicó que existen diferencias significativas entre ambas fracciones ($p < 0.05$) debido a que la fracción etérea tuvo los mayores halos de inhibición, y que la concentración y la interacción entre ambos factores no tienen un efecto significativo ($p > 0.05$) (Tabla 15).

Fuente de variación	G. L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza (F)	Nivel de Significancia .
Mes: marzo				
<i>B. subtilis</i>				
Fracción (ep. cl y ac)	2	363.40	67.09	0.0000
Concentración (100 y 200 μg)	1	3.26	1.20	0.2942
Fracción vs Concentración.	2	3.40	0.62	0.5509
Residual	12	32.50		
<i>S. aureus</i>				
Fracción (ep. cl y ac)	2	64.43	178.98	0.0000
Concentración (100 y 200 μg)	1	0.009	0.05	0.8279
Fracción vs Concentración.	2	1.87	5.20	0.0237
Residual	12	2.16		
<i>S. faecalis</i>				
Fracción (ep y cl)	1	17.04	61.40	0.0001
Concentración (100 y 200 μg)	1	0.141	0.50	0.4965
Fracción vs Concentración.	1	0.0008	0.003	0.9576
Residual	8	2.22		

Tabla 15. Valores del análisis de **varianza** bifactorial que mide el efecto de las fracciones activas (éter de petróleo, cloroformo y acetona) de *Laurencia johnstonii* recolectada en marzo y la concentración **utilizada**. Para la cepa *Streptococcus faecalis* solo se incluyen las fracciones de éter de petróleo y cloroformo.

Los resultados del análisis de **varianza** trifactorial que incluyen las fracciones de éter de petróleo y cloroformo de *L. johnstonii* en todos los meses de recolecta que presentaron actividad contra *B. subtilis* y *S. aureus* y la concentración empleada, indican que para *B. subtilis* (Figs. 7a-d) existe un efecto significativo por el mes de recolecta, la fracción activa y la interacción entre el mes de recolecta y fracción activa ($p < 0.0001$). La concentración y las demás interacciones no presentan un efecto significativo sobre la actividad antibacteriana (Tabla 16). Las diferencias significativas en los meses de recolecta se deben a que las fracciones del mes de febrero (Fig. 7a) presentaron los halos de inhibición más pequeños. La diferencia en la interacción que resultó significativa, entre el mes de recolecta y fracción es debido a que en los meses de enero y marzo se registró la mayor actividad antibacteriana con la fracción etérea mientras que en febrero y junio se registraron los mayores halos de inhibición con la fracción clorofórmica.

Para *S. aureus* (Figs. 8a-d) se registraron diferencias significativas por la mes de recolecta, por la interacción entre la mes de recolecta y la fracción activa así como la triple interacción (Tabla 16). Lo que se observó en este caso es la interacción entre el mes de recolecta y la fracción, esta se debe a que hubo una respuesta inversa de la fracción clorofórmica, porque mientras en el mes de enero (Fig. 8c) generó un halo de inhibición pequeño para junio fue el más grande (Fig. 8b).

Con *S. faecalis* (Figs. 9b y 9d) indica que existen diferencias significativas por los meses de recolecta, y las interacciones entre los meses de recolecta y la fracción activa y entre los meses y la concentración utilizada (Tabla 16). Las diferencia significativa entre los meses de recolecta se deben a que en marzo se generan halos de inhibición mayores que en junio; y el efecto significativo en la interacción es debido a que en marzo se genera un halo de inhibición mayor con la fracción etérea que con la fracción clorofórmica, mientras que en junio se observa lo contrario. Con esta cepa se observó que los resultados de un análisis bifactorial. que incluía los meses de recolecta en que fue activa la fracción clorofórmica y la concentración utilizada nos indica que existen diferencia significativa únicamente por los meses de recolecta ($p < 0.0001$), esto se debe a que los halos de inhibición generados por el alga recolectada en junio fueron mucho mayores que los generados por el alga recolectada en febrero.

Fuente de variación	G.	L.	Suma de cuadrados	Razón de varianza	Nivel de
<i>B. subtilis</i>					
Mes de recolecta (ene, feb, mar y jun)	3		220.15	459.34	0.0000
Fracción (ep y cl)	1		32.60	203.52	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1		0.097	0.61	0.4417
Mes de rec. vs Fracción	3		1253.44	261.01	0.0000
Mes de rec. vs Concentración	3		0.99	2.06	0.1252
Fracción vs Concentración	1		0.18	1.14	0.2938
Triple interacción	3		0.267	0.56	0.6478
Residual	32		5.12		
<i>S. aureus</i>					
Mes de recolecta (ene. feb. mar y jun)	3		285.15	266.34	0.0000
Fracción (ep y cl)	1		0.42	1.18	0.2850
Concentración (100 y 200 µg)	1		0.03	0.07	0.792 1
Mes de rec. vs Fracción	3		323.17	301.86	0.0000
Mes de rec. vs Concentración	3		0.51	0.49	0.6942
Fracción vs Concentración	1		0.005	0.01	0.9046
Triple interacción	3		3.66	3.42	0.0289
Residual	32		11.42		
<i>S. faecalis</i>					
Mes de recolecta (mar y jun)	1		2.34	10.57	0.0050
Fracción (ep y cl)	1		0.05	0.22	0.6398
Concentración (100 y 200 µg)	1		0.22	0.99	0.3335
Mes de rec. vs Fracción	1		31.51	142.15	0.0001
Mes de rec. vs Concentración	1		1.00	4.51	0.0495
Fracción vs Concentración	1		0.03	0.152	0.7015
Triple interacción	1		0.05	0.22	0.6398
Residual	16		3.54		

Tabla 16.- Resultados del análisis de **varianza** trifactorial para las fracciones de éter de petróleo y cloroformo de *Laurencia johnstonii* que fueron activas todos los meses de **recolecta** contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*.

Los resultados del análisis de **varianza** trifactorial que incluía los meses de recolecta (febrero, junio y marzo) en que se presentó actividad antibacteriana contra *B.subtilis* y *S.aureus* (Tabla 17) con las **fracciones** de éter de petróleo, cloroformo y acetona, para el caso de la primera cepa, determinaron que los meses de recolecta, la fracción y las interacción entre la mes de recolecta y la fracción ($p < 0.0001$), y el mes de recolecta y la concentración tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) en la actividad antibacteriana. La concentración y la demás interacciones no presentaron un efecto significativo ($p > 0.05$). Con *S. aureus* se presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en los meses de recolecta, la fracción activa, las interacción de los meses de recolecta y la fracción y la triple

interacción de los factores. La concentración y las otras interacciones no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$). Lo notable en este análisis es que, para ambas cepas, revela el incremento en la actividad antibacteriana de la **fracción** etérea en el mes de marzo, mientras que en febrero y junio es la fracción clorofórmica la de la mayor actividad antibacteriana. La fracción **cetónica** siempre tiene valores inferiores a la de las otras fracciones (Figs. 7a, b d y 8a b y d).

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado medio	Razón de varianza	Nivel de Significancia
<i>B. subtilis</i>				
Mes de recolecta (feb. jun y mar)	2	60.0	490.2	0.0000
Fracción (ep. cl y ac)	2	207.37	1694.2	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.02	0.2	0.6882
Mes de rec. vs Fracción	4	21.70	177.3	0.0000
Mes de rec. vs Concentración	2	0.47	3.8	0.0308
Fracción vs Concentración	2	0.37	3.0	0.0601
Triple interacción	4	0.09	0.7	0.5709
Residual	36	4.40		
<i>S. aureus</i>				
Mes de recolecta (feb. jun y mar)	2	127.32	408.04	0.0000
Fracción (ep. cl y ac)	2	270.85	867.96	0.0000
Concentración (100 y 200 µg)	1	0.03	0.10	0.7533
Mes de rec. vs Fracción	4	76.25	244.37	0.0000
Mes de rec. vs Concentración	2	0.23	0.75	0.4804
Fracción vs Concentración	2	0.27	0.86	0.4329
Triple interacción	4	0.89	2.85	0.0379
Residual	36	11.23		

Tabla 17.- Análisis de **varianza** trifactorial de las fracciones cetónicas y clorofórmicas de *Laurencia johnstonii* que fueron activas contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, donde se incluye el mes de recolecta (febrero, junio y marzo) y la concentración empleada.

7.5. Actividad de los antibióticos comerciales

Los resultados de los halos de inhibición con los antibióticos comerciales para cada cepa fueron los siguientes:

Antibacteriano Gram (+)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecalis</i>
Ampicilina (AM)	35.5 ± 0.5	34.0 ± 1.0	33.0 ± 1.0
Cefalotina (CF)	40.0 ± 1.0	39.0 ± 0.76	18.7 ± 0.76
Cefotaxima (CTX)	29.5 ± 0.28	25.5 ± 0.5	0
Ceftazidima (CAZ)	0	0	0
Cefuroxima (CXM)	22.8 ± 1.04	29.2 ± 0.76	19.2 ± 0.28
Dicloxacilina (DC)	14.0 ± 0.5	19.4 ± 0.64	0
Eritromicina (E)	34.3 ± 0.77	29.5 ± 0.5	12.6 ± 0.76
Gentamicina (GE)	35.0 ± 1.0	26.0 ± 0.76	9.2 ± 0.28
Pefloxacina (PEF)	33.6 ± 0.57	35.7 ± 0.76	16.2 ± 0.28
Penicilina (PE)	27.0 ± 0.76	36.0 ± 1.0	19.3 ± 1.52
Tetraciclina (TE)	24.7 ± 0.28	34.7 ± 0.76	12.7 ± 0.5
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	36.5 ± 0.57	38.3 ± 0.57	0

Antibacteriano Gram (-)	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
Amikacina (AK)	18.7 ± 0.28	22.0 ± 0.60
Ampicilina (AM)	0	0
Carbencilina (CB)	8.4 ± 0.52	0
Cefalotina (CF)	14.1 ± 0.32	0
Cefalotaxima (CTX)	30.8 ± 0.76	0
Ceftinaxona (CRO)	18.16 ± 0.76	12.9 ± 1.61
Cloranfenicol (CL)	18.2 ± 0.76	9.7 ± 1.5
Gentamicina (GE)	18.0 ± 1.0	17.9 ± 1.10
Netilmicina (NET)	19.6 ± 0.15	20.9 ± 0.75
Nitrofurantoina (NF)	23.8 ± 0.68	0
Pefloxacina (PEF)	31.2 ± 1.04	18.2 ± 0.43
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	35.7 ± 0.76	8.0 ± 0.01

Tabla 18. Valor promedio ($n=3$) ± una desviación estándar de los halos de inhibición (mm) de los antibióticos comerciales sobre las cepas bacterianas empleadas en los bioensayos positivos. La concentración para cada antibiótico se encuentran en la tabla 1.

El antibiótico con el mayor halo de inhibición fue la cefalotina para el caso de *B. subtilis* (Fig. 10) y *S. aureus* (Fig. 11) mientras que para *S. faecalis* (Fig. 12) fue la ampicilina; el mayor halo de inhibición para *E. coli* (Fig. 13) fue generado con trimetoprim-sulfametoxazol y para la cepa *Ps. aeruginosa* (Fig. 14) fue generado por la amikacina. Cabe destacar los resultados de los antibacterianos que no presentaron actividad, como ceftazidima antibiótico específico para bacterias Gram (+), que no inhibió el crecimiento de ninguna cepa, o el caso de la ampicilina que se emplea en ambos tipos de bacterias y que inhibió el crecimiento de cepas Gram (+) pero no a las cepas Gram (-).

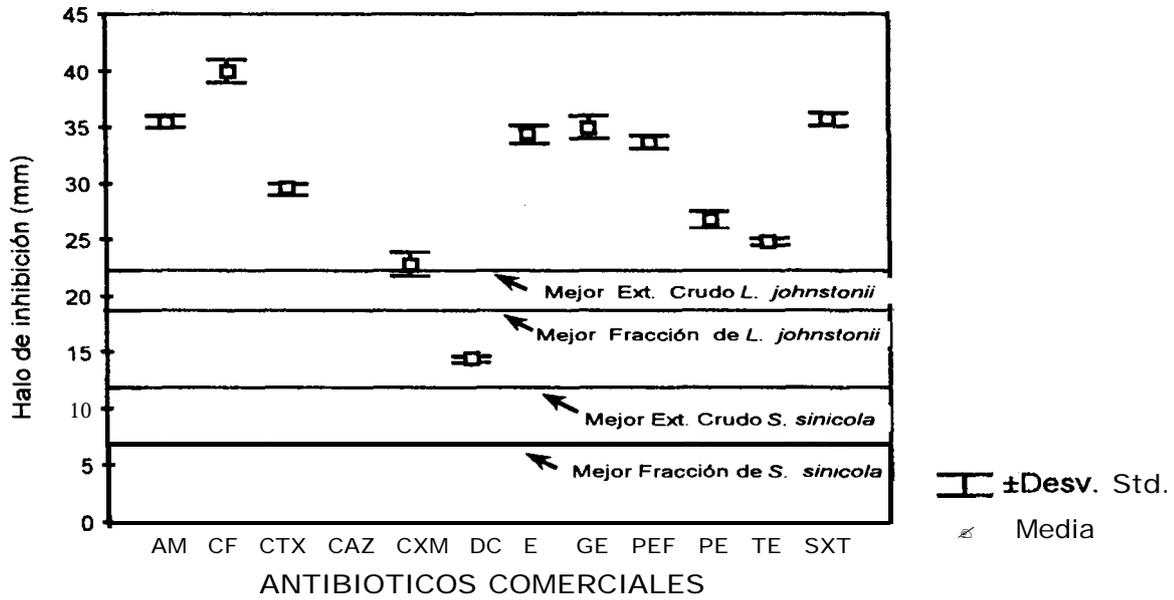


Fig. 10. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra *Bacillus subtilis*.

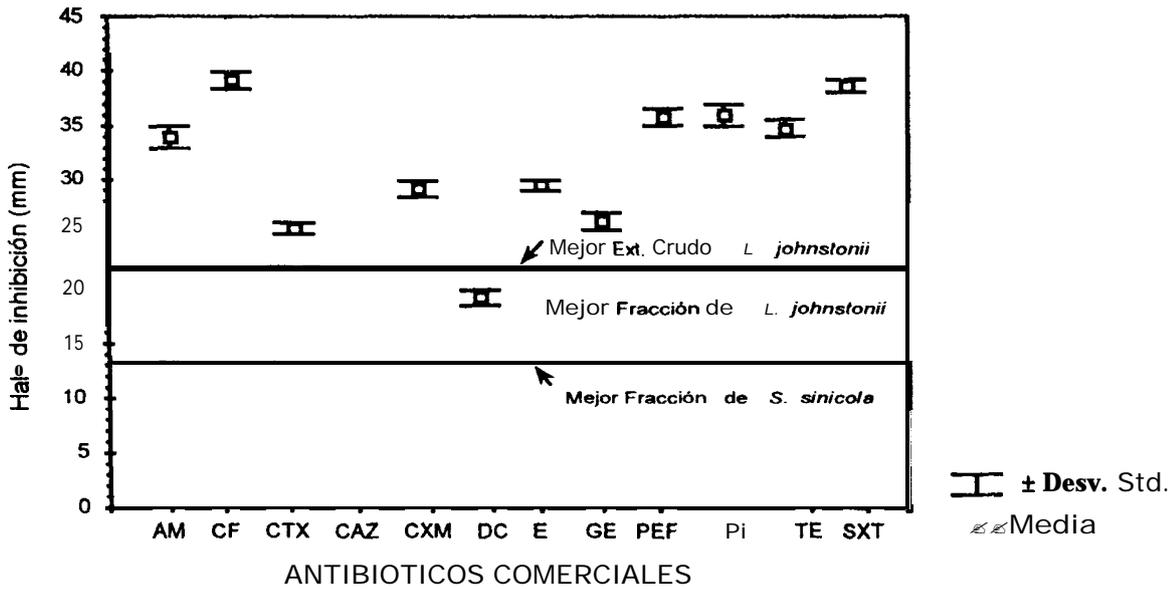


Fig. 11. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra *Staphylococcus aureus*.

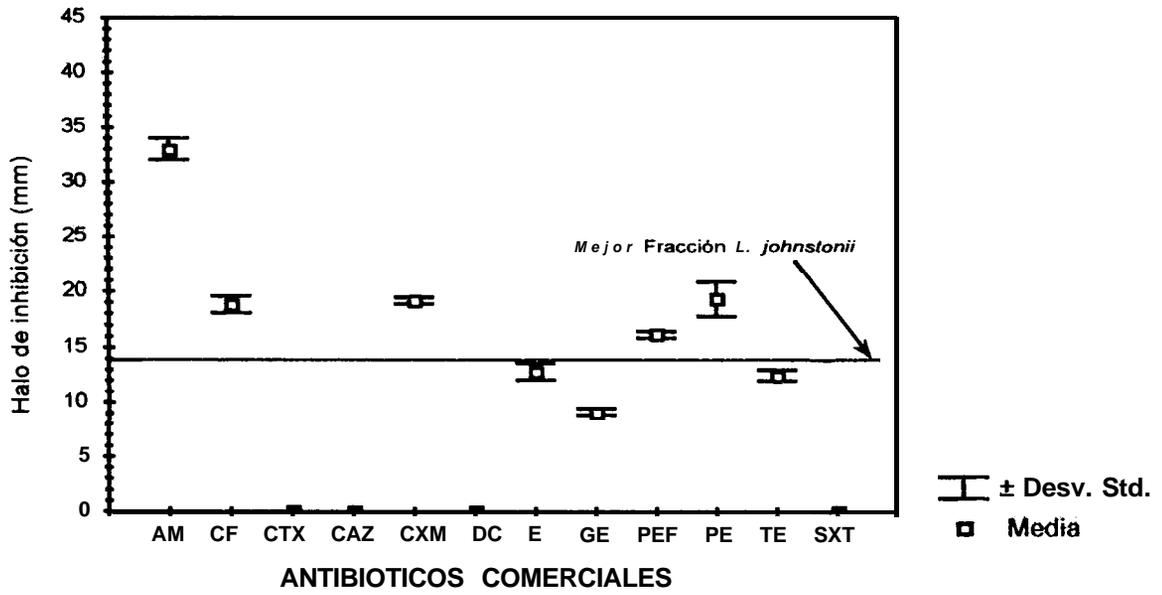


Fig. 12. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra *Streptococcus faecalis*.

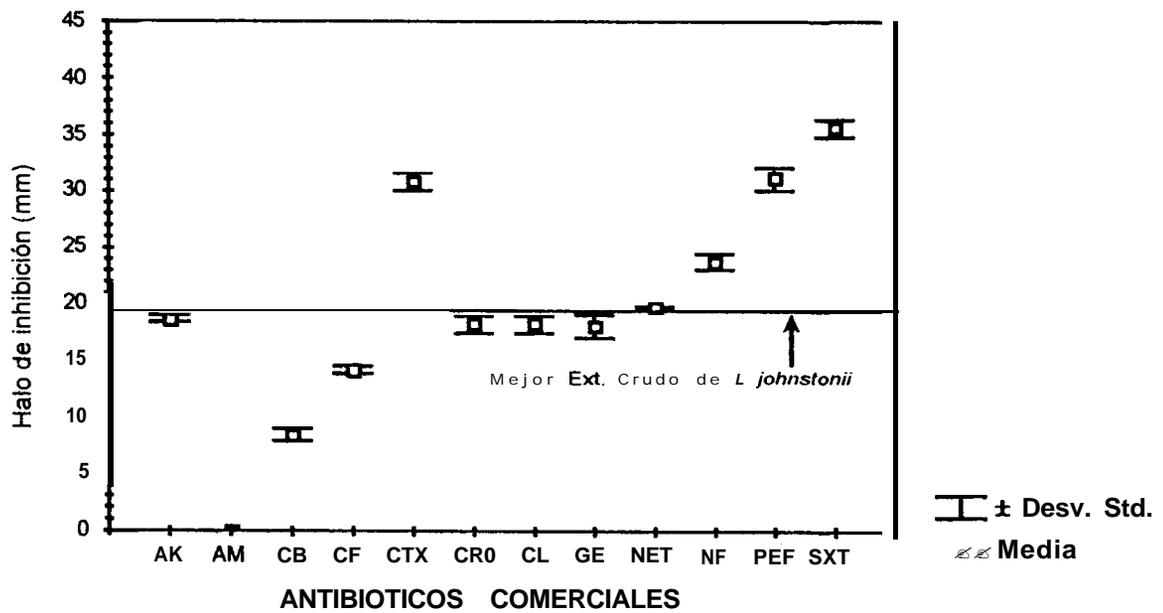


Fig. 13. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra *Escherichia coli*.

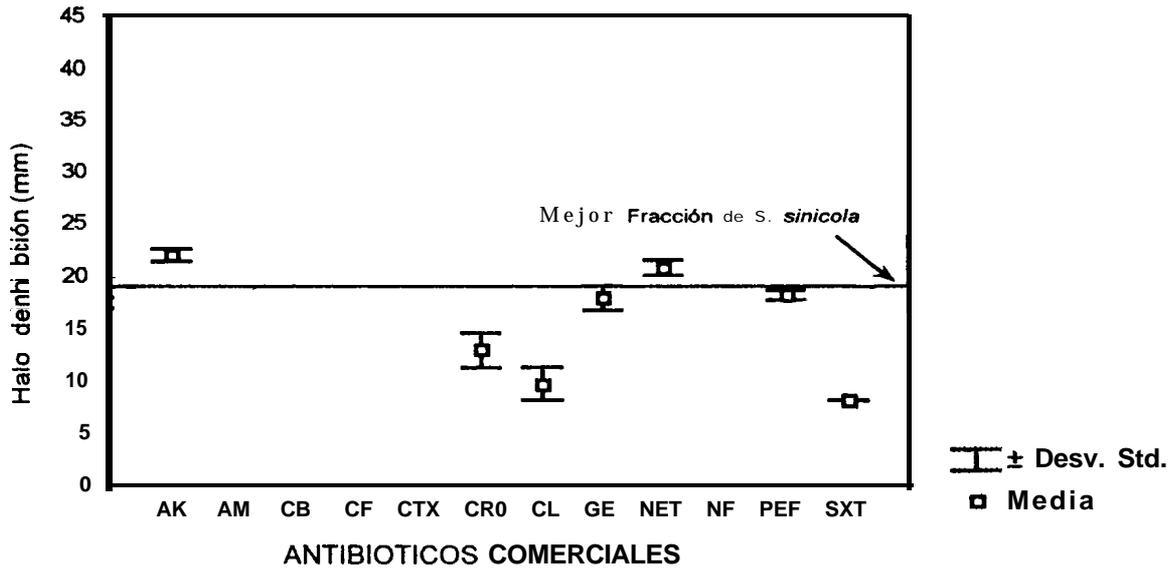


Fig. 14. Sensibilidad de los antibióticos comerciales contra *Pseudomonas aeruginosa*.

8. DISCUSIÓN

Los resultados de la actividad antibacteriana de las algas marinas, tanto de los extractos crudos como de las fracciones, muestran posibilidades prometedoras para la obtención de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana y posiblemente, debido al resultado positivo de estas pruebas alguna otra actividad biológica. Estos resultados son esperados ya que se ha reconocido mundialmente a los organismos marinos como una fuente potencial importante para la obtención de compuestos bioactivos (Ireland *et al.*, 1993), debido a que el ambiente marino en el que se desarrollan hacen que las rutas metabólicas normales produzcan metabolitos secundarios distintos a los que se conocen en ambientes terrestres (Lozano 1991).

8.1. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Sargassum sinicola*

La actividad antibacteriana presentada por *Sargassum sinicola* fue en general prometedora con los extractos crudos, sin embargo, esta alga solo inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis*, no así las demás cepas bacterianas utilizadas. Esto nos indica que el extracto crudo tiene un poder antibiótico menor, y por tanto, su actividad antibacteriana se reduce a las bacterias más sensibles como en este

caso. Como se sabe las bacterias **Gram (+)** y particularmente *B. subtilis* suelen ser de las cepas bacterianas más sensibles a este tipo de bioensayos, a diferencia de las bacterias **Gram (-)**, las cuales poseen mayor resistencia a los compuestos antibióticos. Esta diferencia de sensibilidad se atribuye a que las bacterias **Gram (+)** no poseen la segunda membrana exterior que presentan las bacterias **Gram (-)** de lipopolisacáridos y lipoproteínas, la cual actúa como una barrera adicional que controla el paso de moléculas hacia dentro y fuera de la célula, y que explica el que las bacterias **Gram (-)** puedan vivir en un amplio rango de condiciones ambientales y por tanto tengan mayor resistencia a los antibióticos (Betancuort-Lozano 1992; Jensen et al., 1996). En otros estudios se ha demostrado que las cepas de bacterias **Gram (+)** son más susceptibles que las bacterias **Gram (-)** (Rao y Parekh 1981; Pesando y Caram 1984)

En trabajos anteriores con el género *Sargassum*, se ha detectado una actividad antibiótica contra un grupo amplio de cepas bacterianas, que incluyen tanto **Gram (+)** como **Gram (-)** (Martínez-Nadal et al., 1963, 1964; Rao et al., 1988), sin embargo, las mismas especies no han desarrollado la misma actividad antibacteriana cuando estas han sido colectadas en un sitio geográfico diferente. Campos-Takaki et al., (1988) reportan que *S. vulgare* recolectada en la costa de Brasil, generó halos de inhibición en contra de un limitado número de bacterias **Gram (+)** (dos de seis especies) y **Gram (-)** (una de tres especies), así como con hongos. Rao et al., (1988) reportan que esa misma especie, pero recolectada en la costa hindú, presentó halos de inhibición en contra de un mayor número de bacterias, tanto **Gram (+)** (tres de tres especies) como **Gram (-)** (cuatro de seis especies). Sin embargo, Ballantine et al., (1987) reportan que *S. vulgare* recolectada en la costa de Puerto Rico, no presentó actividad antibacteriana en contra de las cepas que ellos utilizaron. En este sentido se propone que existen diferencias en cuanto a los metabolitos secundarios con actividad antibiótica en el alga dependiendo del sitio de recolecta, lo que daría indicios de que la presencia de estos compuestos son el reflejo de las relaciones ecológicas y las condiciones ambientales en la fisiología del organismo. Esto lleva a sugerir que los distintos metabolitos secundarios tienen actividad antibacteriana específica, que podría ser de amplio espectro o con una escasa o nula actividad.

En las especies de *Sargassum* recolectadas en costas mexicanas se ha registrado una actividad antibacteriana variable. Datos de De Lara-Isassi et al., (1989) reportan que *Sargassum* sp.

recolectada en la costa de Michoacán no presentó actividad antibacteriana, mientras que en otro reporte se indica que *S. acinacifolium* y *S. camouii* recolectada en Puerto Peñasco **fueron** activas en contra de las dos cepas bacterianas usadas (De Lara-Isassi 1991). En la costa de Veracruz para la especie *S. acinartun* se ha reportado que presenta una variación temporal en la actividad antibacteriana, ya que en época de estiaje inhibió el crecimiento de *S. aureus*, mientras que en la época de lluvias no se registró esta actividad (De Lara-Isassi y Ponce-Márquez 1991). Castro-Reyes et al., (1995) reportan que *S. sinicola* seca a la sombra y con el extracto obtenido con acetona presentó actividad contra *B. subtilis* y *S. aureus*, mientras que el extracto crudo obtenido con etanol no presentó actividad antibacteriana.

Para explicar la diferencia de los trabajos anteriores en relación a las obtenidas en este trabajo, se sugiere que la razón por la cual se observa una actividad antibacteriana diferencial en las algas de una misma especie depende de varios factores, **tales** como el lugar y temporada de recolecta, así como el manejo del alga en su transporte al laboratorio, el almacenaje de la misma hasta el momento de su utilización y la obtención del extracto crudo (Rao et al., 1988). Ballesteros et al., (1992) también proponen que el efecto temporal y geográfico pueden explicar las diferencias en la actividad antibiótica de las algas. Con estos antecedentes, y destacando las diferencias en nuestros resultados, se sugiere que la actividad antibiótica varía de alga a alga, aún de la misma especie, de temporada a temporada y de hábitat a hábitat. y que ésta no puede ser generalizada.

La actividad antibacteriana de los extractos crudos de esta alga en relación a la inhibición de *B. subtilis* registró una variación en el período de recolecta, con pico máximo en junio y mínimo en agosto, situación que coincide con el desarrollo poblacional del alga. Se ha determinado en varios trabajos que *Sargassum sinicola* inicia su desarrollo poblacional a finales de otoño (noviembre), presenta su desarrollo máximo en primavera y empieza su etapa de **senescencia** y por lo tanto a desaparecer en el verano (julio - agosto) (Muñetón-Gómez 1989; Núñez-López 1993; Cruz-Ayala 1996).

Se ha reconocido que en el género *Sargassum* se presenta un aumento en los metabolitos secundarios cuando este se encuentran en procesos reproductivos de tal forma que se ha observado una

disminución en su utilización como alimento por organismos herbívoros (McCourt 1984). Por otra parte se ha observado que en *S. horridum* Setchell & Gardner, existe un mayor ataque por organismos oportunistas o epífitos cuando el alga se encuentra en la fase de senescencia que cuando ésta se encuentra en su fase de rápido crecimiento o reproducción (Muñetón-Gómez 1989). Núñez-López y Casas-Valdéz (1996) en su descripción de la fenología de *Sargassum* describen que en la fase senescente b presenta una gran cantidad de epibiontes, particularmente conchilla (*Membraniphora tuberculata*), esto es debido a que quizá en la etapa de senescencia algunos metabolitos secundarios ya no están siendo producidos en la misma cantidad o incluso ya no están siendo generados por el alga ya que ésta se encuentra en su fase terminal, esto podría explicar la actividad antibacteriana menor en el mes de agosto, época en que esta especie se encuentra en sus fases de senescencia.

Se ha llegado a demostrar que las partes basales de las algas son las primeras en colonizarse por epífitas. no así las partes más altas de! alga (McCourt 1984). Una hipótesis que explica este hecho se basa en que en las partes basales la producción de estos compuestos con actividad antibiótica ha disminuido o desaparecido, y por otro lado cuando *S. sinicola* alcanza su longitud máxima y desarrolla su máxima cobertura existe una atenuación de la luz hacia las partes basales, las cuales están creciendo poco o nada, situación que parece ser favorable para las plantas epífitas. Se ha propuesto que la producción de metabolitos secundarios esta asociada directamente a la intensidad luminosa y se ha llegado a demostrar que existe una actividad antibacteriana diferencia! en los distintos segmentos de! alga, siendo mayor esta actividad en las partes mas jóvenes de! alga que en las partes mas viejas (Rosell y Srivastava 1987; Vidyavathi y St-idhar 1991).

Estos hechos podrían explicar la actividad antibacteriana registrada para *S. sinicola* en nuestro estudio, lo que nos lleva a sugerir que cuando el alga se encuentra en su etapa reproductiva genera metabolitos secundarios con actividad antibacteriana que posiblemente sirvan como control de bacterias epífitas o a otro tipo de factores, como la herbivoría o competencia con otros organismos (De Lara-Isassi *et al.*, 1989), pero a medida que avanza en su desarrollo, la producción disminuye, como se registra en la actividad antibacteriana de agosto. Se ha propuesto que esta actividad biológica parece ser temporal y que decrece directamente con el vigor de la planta en función de la latitud (Naqvi *et al.*, 1980).

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se apoyaría la idea de que la presencia de los metabolitos secundarios varían con el tiempo, aun cuando se necesitaría realizar un estudio mas profundo que involucre la identificación y cuantificación de todos los metabolitos presentes y la actividad biológica que desarrolle cada uno de ellos y que cubra un período de tiempo mayor.

Aunque no se registró un efecto significativo por la concentración de extracto crudo empleado en los discos impregnados. no se tienen datos suficientes para poder afirmar que la concentración no tenga un efecto significativo sobre la inhibición bacteriana. Caccamese *et al.*, (1980, 1985) han demostrado que a mayor concentración del extracto crudo en los sensidiscos empleados se obtienen mayores halos de inhibición. Lo que sucedió en nuestro caso es que comparativamente empleamos un intervalo bajo de concentración dentro del cual estaría fluctuando la respuesta en los halos de inhibición de las cepas bacterianas utilizadas por lo cual no se obtuvieron diferencias significativas por la concentración empleada.

En general. los antibióticos comerciales utilizados en este trabajo generaron halos de inhibición muy superiores a los obtenidos por los extractos crudos de *S. sinicola*, salvo en el caso de **ceftazidima** que no inhibió a *B. subtilis*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores en donde los antibióticos comerciales generan halos de inhibición mayor que los extractos crudos de las algas en prueba (Rosell y Srivastava 1987; De Lara-Isassi 1990). Esta diferencia posiblemente estriba en que en el extracto crudo la cantidad de principio activo, si es que se presenta, se encuentra en menor concentración relativa por la presencia de mas compuestos, es por eso que se detecta menor actividad antibacteriana.

8.2. Actividad antibacteriana de las fracciones de *Sargassum sinicola*

En el extracto crudo las proporciones de los compuestos presentes es muy pequeña en relación al total del mismo, de tal forma que cuando se realiza un fraccionamiento estos tienden a concentrarse y por tanto, incrementar su cantidad proporcional cuando se impregnan los sensidiscos de prueba. La actividad antibacteriana de las fracciones mostró que los compuestos con actividad biológica

presentes en esta alga tienen características distintas, y se encuentran de forma diferencial en el alga **a** a través del tiempo, siendo principalmente solubles en cloroformo y acetona.

De acuerdo **a** la solubilidad de los compuestos y **a** la respuesta en la actividad antibacteriana, es muy probable que en el caso de esta alga los compuestos responsables sean del tipo de los ácidos grasos, ya que estos representan en estas algas entre el **1** al **2** % del peso seco (Rosell y Srivastava 1987). Esta idea se puede confirmar con los resultados obtenidos en el fraccionamiento, debido a que **las** fracciones más activas en el período de estudio fueron las obtenidas con los solventes orgánicos medianamente polares, es decir, con cloroformo y acetona. Estos mismos investigadores, Rossel y Srivastava (1987), encontraron que los ácidos grasos insaturados de marca comercial tienen una fuerte actividad antimicrobiana lo que les sugiere en el caso de las algas que analizaron, las cuales poseían un alto contenido de ácidos grasos insaturados, que estos compuestos juegan un papel importante en las propiedades antimicrobianas de los extractos de las algas pardas. Además, otros autores han detectado que en la fracción que contiene **los** ácidos grasos (denominada fracción b) se ha detectado una mayor actividad antibacteriana que en la fracción que contiene esteroides (denominada fracción a) (Rao et al., 1987, 1988; Sastry y Rao 1995).

En relación **a** otros tipos de compuestos que se pueden encontrar en estas algas, se ha descrito que para las algas pardas, particularmente aquellas que pertenecen **a** las familias Dyctiotaceae, Cystoceiraceae y Sargassaceae se conoce que producen diterpenos complejos no halogenados, metabolitos de origen terpeno-aromático y ácidos grasos (Pesando 1990). Martínez-Nadal et al., (1963) aislaron del alga *Sargassum natans* el compuesto sarganin que presentó actividad antibacteriana amplia contra bacterias **Gram** (+) y **Gram** (-) así como propiedades antifúngicas y antihumorales, siendo este un ácido graso con un anillo **fenólico**.

Es posible que los compuestos con actividad antibacteriana detectados en este trabajo pertenezcan al grupo de los polifenoles, **a** los cuales se les han detectado previamente efectos antibióticos, antiherbivoría y antiparasitarios con una variación espacial importante (Martínez 1996; Pavia y Åberg 1996). Se descarta la idea **de que estos metabolitos secundarios posean una estructura química diferente a la ya reportada por otros autores, debido a que los solventes utilizados para la obtención**

de las fracciones nos da una idea del tipo de compuestos de los que se puede tratar. Ciertamente esta investigación exploratoria debe continuar con el esfuerzo hasta lograr purificar e identificar el o los metabolitos secundarios activos que poseen propiedades potenciales.

En los dos primeros meses de recolecta se pueden apreciar al menos dos fracciones con actividad antibacteriana que corresponderían mínimo a dos compuestos distintos, uno del mes de febrero que **fue** soluble en **la** fracción clorofórmica y el otro del mes de junio **que fue** soluble en la fracción cetónica. Cabe señalar que para estos meses no hubo diferencia con la actividad mostrada por el extracto crudo en cuanto a la inhibición de las cepas bacterianas, sin embargo, si se notó una disminución de la actividad en el tamaño de los halos de inhibición. Esto se explica debido a que en el extracto crudo probablemente existan otros compuestos que actúen de manera sinérgica con el compuesto principal en la inhibición bacteriana y cuando éste **fue** fraccionado, la actividad antibacteriana disminuyó considerablemente.

Por otro lado, debido al proceso de fraccionamiento también es posible que los compuestos activos fueran inactivados por el período de exposición a la temperatura. Se ha probado que cuando las algas se someten a algún tratamiento de secado a altas temperaturas, mayores a 60 °C durante la preparación o concentración de los extractos crudos, estos pierden su actividad antibacteriana. **Rao y Parekh (1981)** encontraron que cuando en el proceso de extracción la temperatura de secado del alga era superior a los 60 °C no se registraba actividad antibacteriana alguna, sin embargo, en algunas algas que se sometieron a un proceso de extracción con temperaturas de entre 50 - 55 °C, no se registró una disminución de la actividad antibacteriana. Lo que resulta de este hecho es que la temperatura de tratamiento previo del alga (secado al sol o a las sombras) o de la obtención del extracto crudo será un factor determinante dependiendo **del** alga que se trate, en este caso, debido al proceso de fraccionamiento por el método de Soxhlet donde se alcanzaron temperaturas máximas de hasta 70 ±1°C probablemente influyó en **la** disminución de la actividad antibacteriana de los compuestos responsables en las fracciones probadas.

En el caso particular de las fracciones del alga recolectada en el mes de agosto se notó una actividad antibacteriana distinta a la del extracto crudo. Aunque no hay una razón clara para explicar este tipo

de actividad antibacteriana diferencial entre el extracto crudo y las fracciones, se puede sugerir que en el extracto crudo se pueden presentar algunos compuestos que enmascaran la actividad antibacteriana por la presencia de algún factor inhibidor y por efecto del fraccionamiento este desaparece, de tal modo que en las fracciones es posible detectar una mejor definición en la actividad antibacteriana (Robles-Centeno et al., 1996). Así, el compuesto responsable de la actividad antibacteriana en agosto se puede diferenciar de los compuestos de los meses anteriores. ya que no solo inhibe el crecimiento de *B. subtilis*, si no que, además, inhibe el crecimiento de *S. faecalis* y *Ps. aeruginosa*.

El efecto significativo de la interacción entre la concentración y la fracción en la actividad antibacteriana sobre la cepa *B. subtilis* se trata probablemente de un problema de arrastre de los compuestos fuera del sensidisco. más que detectar un efecto directo por la concentración. Es por esa razón, que la menor concentración generó un halo de inhibición de mayor tamaño que la mayor concentración utilizada. la cual generó un halo de menor tamaño, ya que en general el comportamiento de la concentración fue que a mayor concentración se generaba un mayor halo de inhibición.

Aunque se ha mencionado a las algas **feofitas** como las más activas biológicamente, debe señalarse que esa actividad biológica está en función de la especie que se trate, así aunque el alga *Sargassum sinicola* es un alga café en este trabajo presentó una actividad biológica de espectro limitado, hecho que concuerda con lo señalado **por** Rosell y Srivastava (1987) quienes mencionan haber detectado una pequeña cantidad de ácidos orgánicos libres y polifenoles en los extractos **algales** que probaron y que suponen que esas sustancias juegan un papel menor en la actividad antibacteriana de las algas pardas.

En general. la actividad antibacteriana de los antibióticos comerciales fue mejor que el de las fracciones, sin embargo, cabe destacar la actividad de la fracción clorofórmica del alga recolectada en el mes de agosto en contra de *Ps. aeruginosa*, cuyos valores fueron mayores a los halos de inhibición generados por la **gentamicina**, **ceftriazona**, pefloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol y cloranfenicol, y menores que la **amikacina** y netilmicina. Nuestros resultados concuerdan con un estudio comparativo de la actividad antibacteriana de las fracciones A y B de *S. johnstonii* contra antibióticos comerciales

en donde se demostró que éstas fueron mejores que el cloranfenicol, penicilina y tetraciclina, pero no tan efectivas como la garamicina, polimixna. kanamicina y estreptomina (Rao *et al.*, 1987). Con estos resultados es posible proponer que si el principio activo en esta fracción es aislado e identificado, este podría ser usado como una droga alternativa en contra de esa cepa bacteriana.

8.3. Actividad antibacteriana de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii*

La actividad antibacteriana registrada en este trabajo para esta especie representa la confirmación de que este género es una fuente potencial importante de compuestos bioactivos, ya que se observó una respuesta prometedora en la actividad antibacteriana por parte de los extractos crudos de esta alga durante todo el período de estudio.

Las algas rojas, particularmente del género *Laurencia*, han sido motivo de una intensa búsqueda de metabolitos secundarios, sin embargo, el interés en la mayoría de estos casos solo se ha limitado a la purificación e identificación de los compuestos químicos ya que estos han presentado estructuras químicas poco usuales y novedosas (Erickson 1975; Fenical 1975). y con muy pocos de los compuestos aislados se han hecho pruebas de actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antihumoral o cualquier otra prueba biológica (Fenical, W., Com. pers.).

Los extractos crudos de *L. johnstonii* inhibieron el crecimiento de *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*. Estos resultados son similares a los reportados para otras especies del género *Laurencia*, como *L. obtusa* recolectada en la costa Italiana que fue activa contra *B. subtilis* y *E. coli* (Caccamese *et al.*, 1980); Pesando y Caram (1981) reportan que esa misma especie fue activa en contra de *B. subtilis*, *S. faecalis* y *E. coli*; similar también a los reportados para *L. pacifica* que fue catalogada como moderadamente activa en contra de *E. coli* (De Lara-Isassi 1991); en la especie *L. papillosa* se ha reportado actividad antibacteriana en contra de *B. megatherium* y *S. aureus*.

En este género de algas se encuentra una cantidad importante de metabolitos secundarios halogenados, particularmente conteniendo bromo y cloro en su estructura química (Erickson 1975), razón por la cual se les atribuyen las propiedades antibacterianas a estos compuestos, y en algunos

casos, la cantidad de metabolitos secundarios halogenados llega a constituir hasta el 15 % de peso del alga (Pesando 1990). Sin embargo, a pesar de que esta especie logra acumular una gran cantidad de metabolitos secundarios halogenados, no siempre poseen actividad antibacteriana. Para las especies *L. obtusa* y *L. papillosa* se ha reportado actividad antibacteriana, sin embargo, también han sido reportadas con nula actividad antibacteriana (Ballantine *et al.*, 1987; De Lara-Isassi y Ponce-Márquez 1991). Esta diferencia podría ser explicada en función de que se reconoce que la producción de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana varía de especie a especie, por el lugar de recolecta, por la temporada de recolecta y por el estado en el desarrollo del alga (Ballantine *et al.*, 1987; Vidyavathi y Sridhar 1991; Ballesteros *et al.*, 1992)

Los extractos crudos de esta alga presentaron una actividad antibacteriana en contra de las cepas utilizadas en los bioensayos. Lo interesante a resaltar en este caso es que se registró actividad antibacteriana en contra de *E. Coli* bacteria Gram (-) ya que se ha reconocido que en este tipo de bioensayos generalmente las bacterias más sensibles son las Gram (+) (Rao y Parekh 1981; Reicheh y Borowitzka 1984; Ballantine *et al.*, 1987), lo que sugiere que existen uno o varios compuestos presentes en los extractos crudos con actividad antibacteriana prometedora en contra de bacterias Gram (-).

Se observó una variación en la actividad antibacteriana en los **diferentes** meses de recolecta, registrándose una actividad máxima en enero, disminuyendo en febrero y marzo, y incrementándose ligeramente en junio, situación que coincide con el desarrollo poblacional del alga. La presencia de esta alga en la bahía abarca el invierno, primavera y siendo en el verano la temporada en la que prácticamente desaparece (Cruz-Ayala 1996). Sin embargo, debido a que no se ha identificado en esta alga un período reproductivo específico en el tiempo, no es posible sugerir que la actividad antibacteriana este asociado a una fase del desarrollo del alga en particular.

En algunas especies de *Laurencia* se ha detectado una actividad antibacteriana diferencial en sus estados reproductivos, generada por la presencia de distintos metabolitos secundarios en cada uno de sus estadios (Caccamese 1980), sin embargo, en esta alga se ha encontrado que no existen diferencias en los metabolitos secundarios presentes en los distintos estadios, juvenil, reproductivo, esporofito,

gametofito o carposporotito. si no más bien se ha encontrado que la diferencia esta en relación con la temporada de recolecta (Fenical, W., Com. pers.). Este hecho coincide con lo reportado por **Garza-Sánchez**, (1994) quien informa que para *L. pacifica* la madurez reproductiva se puede encontrar desde los 4 a los 15 cm de talla, sin importar la temporada climática y para la cual Fenical (1975) no encontró diferencias en la composición de la fracción lipídica. Los resultados concuerdan con lo planteado anteriormente, ya que se ha encontrado una variación en la actividad **antibiótica** de los extractos crudos del alga en el período de recolecta, con un pico de máxima actividad en enero y disminuyendo para los otros meses, lo que habría que corroborar sería la posible presencia diferencial de los metabolitos secundarios en los distintos estadios del alga, los cuales presentan actividad antibacteriana potencial.

La disminución de la actividad antibacteriana a lo largo del tiempo puede ser explicada por varias **razones**, 1) que la cantidad del compuesto activo que esta siendo sintetizado disminuya y por lo tanto se encuentre en bajas concentraciones en el extracto crudo: 2) que el compuesto responsable de la actividad antibacteriana sea diferente en cada mes de recolecta y que presente una actividad distinta o que finalmente 3) se registre una disminución o aumento de la actividad antibacteriana por la baja concentración de dos o más compuestos responsables que actúan de forma sinérgica o antagónica.

El mayor resultado de actividad antibacteriana de los extractos crudos de *L. johnstonii* fue el del alga recolectada en enero, en contra de *B. subtilis*. Este extracto fue comparable a los halos de inhibición de algunos **antibióticos** comerciales. como **cefuroxima** y tetraciclina, y mayor que la dicloxacilina. En el caso de *S. aureus*, el extracto crudo fue mejor que la dicloxacilina únicamente. Con *S. faecalis*, se observó que los halos de inhibición generados por el extracto crudo fue comparable a la amikacina, **ceftriazona**, cloranfenicol, gentamicina y netilmicina, y mayor que los antibióticos carbenicilina y cefalotina. De acuerdo a estos resultados, se puede definir esta alga como prometedora en la búsqueda de compuestos bioactivos.

8.4. Actividad antibacteriana de las fracciones de *Laurencia johnstonii*

En la División Rhodophyta se presentan al menos cinco ordenes que poseen la habilidad única de sintetizar compuestos orgánicos halogenados, que abarcan desde cetonas de bajo peso molecular y compuestos aromáticos hasta terpenos sofisticados y productos originados de los ácidos grasos (Fenical 1975), los cuales son derivados del ambiente netamente marino en que se desarrollan. Incluso se ha pretendido utilizar estos compuestos como indicadores quimiotaxonómicos para la separación de especies, las cuales presentan un solapamiento interespecífico (Amico 1995) y particularmente en el género *Laurencia* ya que se ha reportado una especificidad en los metabolitos secundarios encontrados en cada especie (Fenical y Norris 1975).

La actividad antibacteriana que se registró en las fracciones de los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* mostraron una diferencia en cuanto al tipo de cepa bacteriana que inhibieron, ya que mientras los extractos crudos inhibieron a ambos tipos de cepas bacterianas empleadas, las fracciones únicamente inhibieron a las cepas Gram (+). Por un lado, este resultado nos hace sugerir que existe cierto sineryismo en los compuestos presente en el extracto crudo, de tal modo que su acción en conjunto logra inhibir el crecimiento de la cepa Gram (-), y por otro lado, esto permite sugerir que los compuestos presentes en las fracciones solo son activas en contra de las cepas Gram (+).

Otra posibilidad para explicar el hecho de que con las fracciones solo se inhibieran las cepas Gram (+), es que dentro las fracciones se presente algún factor inhibidor y enmascare la totalidad de la actividad antibacteriana (Rao y Parekh 1981; Robles-Centeno *et al.*, 1996), ya que se ha demostrado actividad antibacteriana con fracciones de *L. johnstonii* en contra de bacterias Gram (-) en otros trabajos. Castro-Reyes *et al.*, (1996) observaron que el extracto crudo de *L. johnstonii* fue activo en contra de los microorganismos de prueba, que incluían bacterias Gram (+) y Gram (-), y que cuando éste fue fraccionado, en sólo una de las catorce fracciones obtenidas se registro actividad en contra de todas las cepas y en otras fracciones se observó actividad en contra de una o dos cepas bacterianas Gram (+), pero sin inhibir a la cepa Gram (-), asimismo hubo fracciones en las cuales no se registró actividad alguna.

Las fracciones obtenidas con éter de petróleo y cloroformo mostraron consistencia en cuanto a la inhibición de dos de las cepas bacterianas utilizadas, específicamente sobre *B. subtilis* y *S. aureus*. Este resultado además muestra una alternación en los picos de inhibición con ambas **fracciones** en contra de las mismas cepas bacterianas las cuales muestran que tienen un efecto significativo. Esto es, mientras que la máxima actividad en contra de *B. subtilis* y *S. aureus* con la fracción de éter de petróleo se genera en enero y marzo, se registra un pico en la actividad antibacteriana de la fracción clorofórmica en los meses de febrero y junio contra las mismas cepas. Esto sugiere que existe una producción del compuesto antibiótico en forma diferencial en el tiempo. Robles-Centeno *et al.*, (1996) demostraron que existía una variación importante en la actividad antibacteriana de extractos crudos de tres algas rojas en contra de los microorganismos de prueba y que esta actividad variaba mensualmente. inclusive con períodos de no inhibición. Cuando estos extractos crudos **fueron** fraccionados este mismo patrón de actividad **fue** registrado, es decir los resultados variaron tanto como en los extractos crudos y no se registró una consistencia en cuanto a la actividad antibacteriana. Particularmente con el alga *Spyridia hypnoides* no se registró actividad en contra de *Ps. aeruginosa*, sin embargo, con algunas de las fracciones si se registró inhibición de esta cepa bacteriana. Estos datos revelan que explicar la presencia de los metabolitos secundarios en las algas marinas es más complejo de lo que inicialmente se considera.

Existe la posibilidad de que la actividad **antibiótica** registrada no corresponda al mismo compuesto químico en cada una de las fracciones activas debido a la gran variabilidad en los constituyentes químicos de esta especie en términos de presencia y concentración (Wright *et al.*, 1993). Es decir, existe la posibilidad de que en cada fracción el compuesto responsable sea distinto debido a la **variabilidad** en los ficoconstituyentes que dependen de los factores ecológicos al tiempo de la recolecta y al estado de desarrollo del alga (Naqvi *et al.*, 1980). Esta idea puede ser reforzada debido a que en esta especie se ha logrado identificar la dominancia de un compuesto principal y varios metabolitos secundarios más asociados (Caccamese *et al.*, 1991, Wright *et al.*, 1993) aunado a que en este género puede ocurrir una variación en la composición de los metabolitos secundarios dentro de la misma especie dependiendo del lugar y el tiempo de recolecta, los cuales pueden o no presentar actividad antibacteriana (Castro-Reyes *et al.*, 1996)

Un hecho probado es el que esta alga es una fuente importante y con un alto contenido de metabolitos secundarios halogenados lo que la hace atractiva para obtener productos naturales novedosos y potencialmente activos en términos biológicos (Konig y Wright 1994). Nuestros resultados sugieren que efectivamente se pueden encontrar algún o algunos compuestos con actividad biológica distinto a los ya reportados en la literatura, debido a la variabilidad intraespecífica y espacial que se da en esta especie influenciada por el hábitat, lo que abre la posibilidad de que un nuevo compuesto químico pueda ser aislado. Fenical y Norris (1975) obtuvieron de tres **ecotipos** de la misma especie, *Laurencia pacifica*, un metabolito secundario -específico para cada uno e inclusive distinto a el metabolito principal aislado de la especie tipo recolectada en la localidad original, frente a las costas de California. Con esto se presume que existe una relación de especificidad en la presencia de los metabolitos secundarios dominantes y que este depende en gran medida de las condiciones ambientales en que se desarrolle el organismo y por lo tanto es posible encontrar un metabolito distinto a los ya reportados para esta especie. Aunque difícilmente podría tratarse de un compuesto de estructura química distinta a las ya reportadas, es decir que probablemente el compuesto o compuestos responsables de la actividad antibacteriana sea de naturaleza terpeno-halogenado.

Si se considera que la actividad antibacteriana de las fracciones de *L. johnstonii fue* solo activa en contra de bacterias Gram (+), y que esta actividad fue comparable, o incluso superior, a la acción de algunos antibióticos comerciales, esto nos permite sugerir que si se logra aislar e identificar el compuesto activo, este puede ser usado como una droga alternativa en contra de estas cepas bacterianas.

9. CONCLUSIONES

- ◆ Los extractos crudos de *Sargassum sinicola* presentaron actividad solamente contra *Bacillus subtilis* (Gram +).
- ◆ La actividad antibacteriana de los extractos crudo de *Sargassum sinicola* presentaron una variación en los meses de recolecta, registrándose una máxima actividad en junio, y mínima en febrero y agosto.
- ◆ Para *Sargassum sinicola* se observó una mayor actividad en el mes de junio coincidiendo con su período de madurez reproductiva poblacional.
- ◆ En *Sargassum sinicola* existen al menos tres tipos de compuestos con actividad antibacteriana detectados en las fracciones.
- ◆ Si el principio activo de la fracción clorofórmica del alga recolectada en agosto es aislado e identificado, éste puede sugerirse como un antibacteriano de uso alternativo.
- ◆ Los extractos crudos de *Laurencia johnstonii* presentaron actividad antibacteriana contra bacterias Gram (+) y Gram(-), registrándose la mayor actividad antibacteriana **en el mes de enero**, disminuyendo en febrero y marzo e incrementándose ligeramente en junio.
- ◆ Con *Laurencia johnstonii*, las fracciones obtenidas con solventes poco polares, éter de petróleo y cloroformo. presentaron los mayores halos de inhibición, mientras que las obtenidas con solventes más polares, acetona y metanol, presentaron poca o nula actividad antibacteriana.
- ◆ Con las fracciones más activas de *Laurencia johnstonii*, éter de petróleo y **cloroformo**, se registró una alternancia en la mayor actividad antibacteriana en los meses de recolecta, siendo mayor la fracción de éter de petróleo en los meses de enero y marzo, pero menor en febrero y junio que la fracción de cloroformo.

- ◆ En *Laurencia johnstonii* existen cuando menos cuatro compuestos con actividad antibacteriana prometedora de acuerdo a las fracciones activas, y por la solubilidad que estos presentaron podría tratarse de terpenos halogenados, como lo reporta la literatura para esta especie.
- ◆ Si se logran aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana de las fracciones mas activas de *Laurencia johnstonii*, se podrían proponer como antibacterianos de uso alternativo.
- ◆ Para ambas especies no se registró una diferencia consistente entre las concentraciones de extracto o fracción empleadas.

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar con la exploración de estas especies como una fuente importante de productos naturales con actividad biológica.

Particularmente, se recomienda continuar con el aislamiento, purificación e identificación de los compuestos en la fracciones que resultaron activas en los bioensayos para contestar la serie de preguntas que aun quedan pendientes de responder, sobre si son o no el mismo tipo de compuesto responsable de la actividad antibacteriana, y de la variación de estos compuestos en las épocas de recolecta que se presentaran.

Se recomienda realizar un estudio detallado de la actividad antibacteriana de **las** algas de este estudio, obteniendo extractos de las distintas partes que forman el alga, de tal forma que se pueda distinguir si la actividad antibacteriana es la misma en toda el alga o se presenta de forma diferencial en **las** distintas partes de la misma; asimismo, obtener extractos crudos para cada fase de su estado reproductivo y realizar las pruebas de actividad antibacteriana.

Se recomienda también utilizar un mayor número de algas, que incluyan un mayor número de especies de la Bahía de La Paz, en contra de un mayor números de bacterias, en este último caso, que incluyan tanto bacterias de ambiente terrestre como de ambientes netamente marino, particularmente de aquellas que se logren aislar de las superficie de las algas.

Se recomienda que se utilicen, tanto los extractos crudos como los compuestos ya aislados, derivados de estas algas o algunas otras, en otro tipo de pruebas biológicas, como lo pueden ser su efecto antihumoral, hemolítico, aglutinante, ictiotóxico, insecticida, etc.

11. LITERATURA CITADA

- Amico, V. 1995. Marine Brown algae of family cystoceiraceae: chemistry and chemotaxonomy. **Phytochemistry**. 39(6): 1257-1279.
- Andersen. R. J. y D. J. Faulkner. 1972. Antibiotics from marine organisms of the Gulf of California. Cednar R. Worthen Ed. food and drugs from the sea **conference**. Kinstong, R. C. Food and drugs from the sea proceedings. 111-115.
- Baker, J.T. 1984. Modern Drug Research: The potential and the problems of Marine Natural Products. **En:** Natural Products y Drug Development. Alfred Benzon Symposium 20. Ed. P Krosggaard-Larsen, S Brogger Christensen, H. Kotod. Munkgaard. Copenhagen p. 139- 163.
- Baker. J.T. 1984a. Seaweeds in pharmaceutical studies and applications. **Hydrobiologia**. 116/117: 29-40.
- Ballesteros, E., D. Martín y M.J. **Uriz**. 1992. Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes. **Bot. Mar.** 35:481-485.
- Ballantine. D. L.. W. H Gerwick, S. M. **Velez**, E. Alexander y P. Guevara, 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. **Hydrobiologia**. 151/152: 463-469.
- Beress, A., O. Wassermann, T. **Bruhn**, L. Beress, E.N. Kraiselburd. L.V. González, G.E. de Mota y P.I. **Chavez**. 1993. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides y polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosos*. **Jour. of Nat. Prod.** 56(4): 478-488
- Betancourt-Lozano, M. 1992. Variación de la actividad antimicrobiana de la esponja *Aplysina fistularis* (Porifera: Aplysinidae) y su relación con la fauna asociada. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 88 p.

- Blunden, G., C.J. Barwell, K.J. Fidgen y K. Jewers. 1981. A survey of **some** British marine **algae** for anti-influenza virus activity. **Bot. Mar.** **24:** 267-273.
- Caccamese, R. Azzolina, G. Furnari. M. Cormaci y S. Grasso. 1980. Antimicrobial and antiviral activities of **extracts** from Mediterranean **algae**. **Bot. Mar.** **23:** 285-288.
- Caccamese, S., R. Azzolina, G. Furnari. M. Cormaci y S. Grasso. 1981. Antimicrobial and antiviral activities of **some** marine **algae** from Eastern Sicily. **Bot. Mar.** **24:** 365-367.
- Caccamese, S., R.M. Toscano, G. Furnari y M. Cormaci. 1985. Antimicrobial activities of red and brown **algae** from southern Italy coast. **Bot. Mar.** **28:** 505-507.
- Caccamese, S., V. Amico, P. Neri y M. Foti. 1991. The **structure** of Laurobtusol, a new rearranged sesquiterpenoid from the Mediterranean red alga *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Lett.** **47(48):** 10101-10108.
- Campos-Takaki, G.M. de., M.B.S. Diu, M.L. Koenig y C. Pereira. 1988. Screening of marine **algae** from brazilian northeastern coast for antimicrobial activity. **Bot. Mar.** **31:** 375-377.
- Castro-Reyes, M.A., M.M. Casas-Valdéz, B. González-Acosta, R. Guerrero-Caballero y S. Rodríguez-Astudillo. 1995. Antibiotic activity of three marine **algae** of Bahía de la Paz. Resúmenes del XV International Seaweed Symposium. Valdivia, Chile.
- Castro-Reyes, M. A., B. González-Acosta, R. Guerrero-Caballero y S. Rodríguez-Astudillo. 1996. Actividad antibacteriana del alga *Laurencia johnstonii* (rhodophyta: rhodomelaceae) de Bahía de La Paz, B.C.S., México. Resúmenes del II Congreso Mexicano de **Ficología**. Ensenada, B. C., México.

- Chengkui, Z. (C. K. Tseng) y Z. Junfu (C. F. Chang). 1984. **Chinese** seaweeds in herbal medicine. **Hydrobiologia**. 116/117: 152-154.
- Crews, P. y J. S. Scott. 1986. Comparison of the sesquiterpenes from the seaweed *Laurencia pacifica* y its epiphyte *Erythrocystis saccata*. **Phytochemistry**. 25(8): 1847-1 852.
- Cruz-Ayala, M. B. 1996. Variación espacio-temporal de la ficoflora y su abundancia relativa en la Bahía de La Paz. B.C.S., México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 91 p.
- Dawes, C.J. 1984. **Botanica Marina**. Primera Ed. Ed Limusa. México, D. F. 673 p.p.
- Deacon-Smith, R.A., J.P. Lee-Potter y D.J. Rogers. 1985. **Anticoagulant** activity in extracts of British marine algae. **Bot. Mar.** 28: 333-338.
- De Lara-Isassi, G., A. Sobrino-Figueroa.,C. Lozano Ramírez.,M.E. Ponce Márquez y K. Dreckman Estay. 1989. Evaluación de la actividad **antibiótica** de las macroalgas de las costas de Michoacán. México. **Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente.** 28(1 y 2): 99-104.
- De Lara-Isassi, G. 1991. Propiedades **antibióticas** de algunas especies de algas marinas **bénticas**. UAM-1. **Hidrobiológica**. 1(2): 21-28.
- De Lara-Isassi, G. y M.E. Ponce-Márquez. 1991. Detección de la actividad antibacteriana de algunas algas de playa Paraíso, Veracruz. México. **BIOTAM**. 3(1): 20-26.
- Der Marderosian, A. y L. Liberti., 1988. Marine pharmacology: Drugs from the sea. **En: Natural Products** Medicine. George F. Stickeley Co. Filadelfia. 185-23 1.
- Erickson, Karen. P. 1975. Constituents of *Laurencia*.p.p. 132-256. **En: Marine Natural Products: Chemical y biological perspectives**. Eds. P.J. Scheuer. Vol. V. Chapter 4. 442 pp.

- Espinosa-Avalos, J. 1979. Resultados preliminares sobre la distribución superficial de parámetros físico-químicos en la Ensenada de La Paz, Baja California Sur, durante la primavera de 1976. Trabajo presentado en la conferencia de **CalCOFI**. Rep., Vol. XX.
- Espinosa-Avalos, J. 1993. Macroalgas marinas del Golfo de California. pp. 328-357. **En:** Biodiversidad Marina y Costera de México. Eds. S. I. Salazar-Vallejo y N. E. González Com. **Nal.** Biodiversidad y **CIQRO**, México, 865 pp.
- Fajardo-Léon**, M. del Carmen. 1994. Evaluación de biomasa y determinación de especies de los mantos del género *Sargassum* spp AGARDH, 1821 (**Fucales, Phaeophyta**) en la Bahía de La Paz, B.C.S., México, en Primavera de 1988. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 78 p.
- Faulkner, D. John, **Stallard**. M. O. y **Ireland**, C. 1974 . Prepacifenol epoxide, a halogenated sesquiterpeno diepoxide. **Tetrahedron Lett.** 40:3571-3574.
- Faulkner, D. J. 1984. Marine Natural Products: Metabolites of marine **algae** and hervivorous marine molluscs. A review. **En:** Natural Products Report. Copias.
- Faulkner, D.J. 1988. Marine Natural Products. A Review. **En:** Natural Products Report. 5:613-663.
- Fenical, W. 1975. Halogenation in Rhodophytas A Review. **Jour. Phycol.** 11:245-259.
- Fenical , W. y J. N. Norris. 1975 . Chemotaxonomy in marine **algae**: Chemical separation of **some** *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. **Jour.** Phycol. 11: 104-108.
- Garza-Sánchez, F. 1994. Revisión morfológica de *Laurencia pacifica* **Kylin**, (ceramiales, rhodophyta) en la península de Baja California. Tesis de Licenciatura UABCS. 69 p.

- Güven, K.C., Y. Özsoy y O.N. Ulutin. 1991. **Anticoagulant**, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. **Bot. Mar.** 34: 429-432.
- Hernández-Carmona, G., M. M. Casas Valdéz, C. Fajardo León, I. Sánchez Rodríguez y E. Rodríguez Montesinos. 1990. Evaluación de *Sargassum* spp. en la Bahía de La Paz, B. C. S. **Inv. Mar. CICIMAR**, 5(1): 11-18.
- Harger, L. P., R. H. White, P. F. Hollenberg, D. L. Doubek, R. C. Brusca y R. Guerrero. 1974. A survey of **organic** halogens in marine organisms. Reporte del crucero R. V. Alpha-Helix Baja Expedition Res. Prog. 1972-1974, Univ. Calif. San Diego. Rep. Pp. 73.
- Hornsey, Y. S y D. Hide, 1976. The production of antimicrobial compounds by British marine **algae** IV. Seasonal variation in production of antibiotics. **Br. Phycol. J.** 11:63-67.
- Instituto de Servicios de Salud. 1996. Morbilidad 1996. Secretaria de Salud del Estado de Baja California Sur. p. 19.
- Ireland, M.C.; Brent R. C.; M. P. Foster; L. A. McDonald; D. C. Radisky y J. C. Swersey. 1993. Biomedical Potencial of Marine Natural Products. **En: Marine Biotechnology**, Vol. 1: Pharmaceutical y Bioactive Natural Products. Ed. David H. Attaway y Oskar R. Zaborsky. Plenum Press. New York.
- Jensen, P. R., C. D. Harvell, K. Wirtz y W. Fenical. 1996. Antimicrobial activity of **extracts** of caribbean gorgonian corals. **Marine Biology**.125:411-419.
- Kamat, S.Y., S. Wahidulla, L. D'Souza, C.G. Naik, V. Ambiye, D.S. Bhakuni, A.K. Goel, H.S. Garg y R.C. Srimal. 1992. Bioactivity of marine organisms. VI. Antiviral evaluation of marine algal **extracts** from the Indian Coast. **Bot. Mar.** 35: 162- 164.

- Kittredge, J. S., F. T Takahashi, J. Lindsey y Reuben Lasker. 1974. Chemical signals **in** the sea: marine allelochemicals and evolution. **Fish. Bull.** 72(1): 1- 11.
- Konig, G. M. y A. D. Wright, 1994. New C 15 acetogenins and sesquiterpenes **from** the red alga *Laurencia* sp. Cf *L. Gracilis*. **Jour. Nat. Prod.** 57(4):477-485.
- Lima-Ainouz, I., A. Holanda Sampaio, N.M. Barros Benevides, A.L. Ponte Freitas. F.H.F. Casta, M.R. Carvalho y F. Pinheiro-Joventivo. 1992. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine **algal** extracts. **Bot. Mar.** 35: 475-479.
- Lozano, R. C., 1991. Qué tan secundarios son los metabolitos secundarios ?. **Hidrobiológica.** 1(2):45-57.
- Martínez-Nadal, N. G., L. V. Rodríguez y C. Casillas. 1963. Sarganin y Chonalgin, new antibiotic **substances** from marine **algae** from Puerto Rico. **Antimicrobial agents y chemotherapy.** p.p. 68-72.
- Martínez-Nadal, N. G., L. V. Rodríguez y C. Casillas. 1964. Isolation and characterization of sarganin **complex**, a new broad-spectrum antibiotic isolated from marine **algae**. **Antimicrobial agents y chemotherapy.** 13 1- 134.
- Martínez, E. 1996. Micropopulation differentiation **in** phenol **content** and suceptibility to herbivory **in** Chilean kelp *Lessonia nigrescens* (Phaeophyta: Laminariales). **Hydrobiologia.** 326/327:205-211.
- McCourt, R. M. 1984. Seasonal patterns of abundance, distributions, and phenology **in** relation to growth strategies of three *Sargassum* species. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 24(2): 14 1- 156.

- Meyer, K. D. y V. J. Paul. 1992. Interplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta:caulerpales) y its effects on herbivorous fishes. **Mar. Ecol. Series. 82: 249-257.**
- Monroy, J. 1982. Crucero científico por el Golfo de California Para evaluar los recursos de algas para la obtención de nuevas sustancias antibióticas y para estudiar la producción de toxinas y antibióticos en holoturias y esponjas. Informe de actividades en la UABCS. 21-25.
- Moreau, J., D. Pesando, P. Bernard, B. Caram y J. C. Pionnat, 1988. Seasonal variations in the production of antifungal substances by some dictyotales (brown algae) from the French mediterranean coast. **Hydrobiologia. 162: 157-162.**
- Muñetón Gómez, M. S. 1989. Morfología y época de reproducción de *Sargassum horridum* (Setchell y Gardner) en la Bahía de La Paz, B. C. S., México. **Inv. Mar. CICIMAR. 4(2):257- 266.**
- Muñetón Gómez, M. S. y G. Hernández-Carmona. 1993. Crecimiento estacional de *Sargassum horridum* (Setchell y Gardner) Phaeophyta. en la Bahía de La Paz, B. C. S., México. **Inv. Mar. CICIMAR. 8(1): 23-31.**
- Naqvi, S.W.A., Solimabi, S.Y. Kamat, L. Fernández, C.V.G. Reddy, D.S. Bhakuni y B.N. Dhawan. 1980. Screening of some marine plants from the Indian coast for biological activity. **Bot. Mar. 24:51-55.**
- Nuñez-López, R. 1993 . Biomasa estacional específica de *Sargassum* (Sargassaceae, phaeophyta) en tres zonas de Bahía Concepción, Baja California Sur. Reporte de Servicio Social. UAM-Xochimilco. 56 p.
- Nuñez-López, R y M. M. Casas-Valdéz. 1996. Fenología de las especies de *Sargassum* (Fucales: Sargassaceae) en tres zonas de Bahía Concepción, B. C. S., México. **Rev. Biol. Trop., 44(2): 455-464.**

- Padmini S. R., P. S. Rao y S. M. Karmarkar. 1986. Antibacterial substances from brown algae. II. Efficiency of solvents in the evaluation of antibacterial substances from *Sargassum johnstonii* Setchell y Gardner. **Bot. Mar.** 29:503-507.
- Pavia, H. y Aberg, P. 1996. Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). **Hydrobiologir.** 326/327: 199-203.
- Pesando, D. 1990. Antibacterial y antifungal activities of marine algae. **Introduction to Applied Phycology**, 3-26.
- Pesando, D. y B. Caram. 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial y antifungal activity. **Bot. Mar.** 27: 381-386.
- Pratt, R., H. Mautner, G.M. Gardner, Yi-Hsien Sha y J. Dufrenoy. 1951. Report on antibiotic activity of seaweeds extracts. **J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.** 40:575-579.
- Premnathan, M., K. Chandra, S.K. Bajpai y K. Kathiresan. 1992. A survey of some Indian marine plants for antiviral activity. **Bot. Mar.** 35: 321-324.
- Rao, S. P. y K.S. Parekh. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. **Bot. Mar.** 24: 577-582
- Rao P. P. S., P. S. Rao y S.M. Karmarkar. 1987. Comparative study of antibacterial activity of fractions of *Sargassum johnstonii*. **Phykos.** 26: 119- 122.
- Rao P. P. S., P. S. Rao y S.M. Karmarkar. 1988. Antibacterial activity from Indian species of *Sargassum*. **Bot. Mar.** 31: 295-298.

- Reichelt, J.L. y M.A. Borowitzka. 1984. Antimicrobial activity from marine **algae**: results of a **large-scale** screening programme. **Hydrobiologia**. 116/117:158- 168.
- Ríos, J. L., M. C. Recio y A. Villar. 1988. Screening methods for natural **products** with antimicrobial activity: a review of the literature. **Jour. of Ethnopharmacology**. 23: 127-149.
- Robledo, R. D. 1990. Las macroalgas marinas, un recurso desconocido. **ICyT**.12(169):3-8.
- Robles-Centeno, P. O., D. L. **Ballantine** y W. H. Gerwick. 1996. Dynamics of antibacterial activity in three **species** of caribbean marine **algae** as **function** of hábitat and **life** history. **Hydrobiologia**. 326/327: 457-462.
- Rosell, K. G. y L. M. Srivastava. 1987. Fatty acids as antimicrobial **substances** in brown **algae**. **Hydrobiologia**. 151/152: 471-475.
- Sastry, V. M. V. S. y G. R. K. Rao. 1995. Dioctyl phthalate, **an** antibacterial compound from the marine brown alga - *Sargassum wightii*. **J. of Applied Phycology**. 7: 185-1 86.
- Sims, J. J.; Fenical, W.; Wing, R.M.; Radlick, P. 1972. Marine Natural **Products** III.- Johnstonol, **an** **unusual** halogenated epoxido from the red alga *L. johnstonii*. **Tetrahedron Lett**. 3: 195-198.
- Sokal R. R. y F. J. Rohlf. 198 1. Biometry. **Sec. Ed.** W. H. Freeman and Comp. P. 360 - 364.
- StatSoft, Inc. (1995). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. **Tulsa, OK: StatSoft, Inc.**, 2325 East 13th Street, Tulsa, OK 74104, (918) 583-4149, fax: (918) 583-4376.
- Villamar ,C. A. 1965. Fauna malacológica de la Bahía de La Paz, B. C. Con notas ecológicas. **An. del Inst. Nal. de Inv. Biologico-pesqueras**. 1: 114-1 52.

- Vidyavathi, N. y K. R. Stidhar. 1991. Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the mangalore coast of India. **Bot. Mar.** 34: 279-284.
- Williams, D. H., M. J. Stone, P. R. Hauck y S. K. Rahman. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. **Jour. Nat. Prod.** 52(6):1189- 1208.
- Wright, A. D., G. M. Konig, R. De Nys y O. Sticher. 1993. Seven new metabolites from the marine red alga *Laurencia majuscula*. **Jour. Nat. Prod.** 56(3):394-401.
- Yamamoto, I., M. Takahashi, E. Tamura y H. Murayama. 1982. Antitumor activity of crude extracts from edible marine algae against L-1210 leukemia. **Bot. Mar.** 25: 455-457.
- Young, D. N., B.M. Howard y W. Fenical. 1980. Subcellular localization of brominated secondary metabolites in the red algae *Laurencia snyderae*. **J. Phycol.**, 16: 182- 185.
- Zertuche-González, J. A., I. Pacheco-Ruíz y J. González-González. 1995. Macroalgas. **En:** Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol. I. Plantas e invertebrados. pp. 10-97.