

Instituto Politécnico Nacional
Secretaría de Investigación y Posgrado
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas

Informe Técnico Parcial (ene-dic/2011) del Proyecto
“(SIP 20111014) Estudio del Potencial de Aplicación Biomédica y
Ambiental de Algas del Género *Sargassum* y *Enteromorpha* Colectadas en
el Golfo de California”

Investigadores participantes:

Jesús Iván Murillo Álvarez^{1,*}, Mauricio Muñoz Ochoa¹, Alejandro Marín Álvarez¹,
Benjamín Ánguas Vélez², Mauricio Contreras Olguín².

¹Laboratorio de Química de Algas Marinas, ²Laboratorio de Biología Experimental.
Departamento de Desarrollo de Tecnologías. Centro Interdisciplinario de Ciencias
Marinas. Av. Instituto Politécnico Nacional s/n. Colonia Playa Palo de Santa Rita. 23096
La Paz, Baja California Sur, México. * Director de proyecto, correo-e: jmurilloa@ipn.mx,
Teléfono: (612) 1230350 x/82437

Alumnos participantes:

Patsy Eunice Pardo Fuentes³, Elena Stephanie Castro Silva³, Mario Antonio Vergara
Rodarte⁴, Alejandro Marín Álvarez⁴

³Programa de Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos, ⁴Programa de
Doctorado en Ciencias Marinas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Av.
Instituto Politécnico Nacional s/n. Colonia Playa Palo de Santa Rita. 23096 La Paz, Baja
California Sur, México.

Lucero Gómez Alcalá⁵, Aracely Rodríguez Cuautle⁵, Virginia Carrillo Pineda⁵

⁵Programa de Licenciatura en Biología Marina, Universidad Autónoma de Baja
California Sur. Km 5.5 Carretera al Sur. Colonia El Calandrio, 23080 La Paz, Baja
California Sur, México.

Informe elaboraron por: J. Iván M. A., Mauricio M. O. & Patsy E. P. F.

Resumen

El presente informe cubre el periodo de enero a diciembre de 2011. En la primera parte de este proyecto recurrente (con registro SIP 20111014) se estudió el potencial de aplicación biomédica del alga parda *Sargassum horridum*, la cual es de importancia mayor en varios ecosistemas del Golfo de California. En el presente estudio se logró determinar que el extracto crudo etanólico de *Sargassum horridum* (espécimen 04-003) fue capaz de revertir la resistencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42) a la ampicilina y de *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) a la eritromicina. El mismo extracto mostró actividad inhibitoria de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) a una concentración tan baja como $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Adicionalmente, mostró una citotoxicidad moderada ($\text{CI}_{50}=19.05 \mu\text{g mL}^{-1}$) frente a células VERO. El estudio de otros especímenes de *S. horridum*, recolectados en la misma zona, frente a *M. tuberculosis* resultaron ser ligeramente menos activos ($\text{CIM}=25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por otro lado, en el caso de organismos formadores de bio-película, el extracto crudo de *S. horridum* mostró actividad inhibitoria frente a *Enterobacter aerogenes* y *Vibrio estuarinus* ($\text{CIM}=1$ y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) y efecto estimulante de la microalga *Fragilaria crotonensis* y *Scenedesmus armatus* (0.1 y $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Los extractos acuosos obtenidos a 25° y 80° C a partir de *S. horridum* fueron capaces de modificar el tiempo normal de tromboplastinas parcial activada por más de 10 veces a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. El estudio químico de los extractos activos condujo al aislamiento de ácido mirístico y fucosterol como principios antimycobacterianos. Adicionalmente, se aisló un glucosildiacilglicérido con potencial antiviral. Toda la evidencia experimental obtenida en el presente estudio, sugiere fuertemente que *S. horridum* es una interesante fuente de compuestos biológicamente activos que podrían tener aplicación en el área biomédica (y algunas otras). Queda pendiente por evaluar el potencial de aplicación ambiental de *S. horridum* particularmente, su utilidad como biofiltro en co-cultivo con camarón café. En la segunda etapa (2012) se abordará el estudio de *Enteromorpha clathrata* siguiendo el mismo enfoque que aquí se describe.

Palabras clave: antimicrobiano, tuberculosis, resistencia, anticoagulante, citotoxicidad, antiviral

1. Introducción

1.1. Sobre el género *Sargassum*

Las algas del género *Sargassum* C. Agardh (División Ochrophyta, Orden Fucales) se encuentran presentes en casi todos los océanos del mundo, excepto en el ártico. Este género tiene una rápida tasa de crecimiento, es fértil desde el primer año de vida y sus vías reproductivas pueden ser sexual o asexual, aunado a la capacidad de flotación provista por sus aerocistos, ésta alga puede diseminarse fácilmente y extenderse y reproducirse rápidamente, haciendo de ella un miembro destacado de la ficoflora en todas las costas del mundo. En México podemos encontrar especies de éste género en las costas del Golfo de México, Mar Caribe y en el litoral del Océano Pacífico; en las costas de Nayarit, Jalisco y Zihuatanejo y a lo largo de ambas costas de la Península de Baja California (Castillo-Suárez, 2008). La base de datos *AlgaeBase* registra 874 nombres de especies para este género, de los cuales 340 están reconocidos taxonómicamente (Guiry y Guiry, 2011), y al menos 62 han sido estudiadas por su impresionante productividad y diversidad de compuestos naturales.

1.2. Sobre los metabolitos secundarios reportados en algas del género *Sargassum*

La variedad de estructuras químicas aisladas de éste género es muy vasta, pero entre ellas podemos mencionar plastoquinonas, hidroquinonas, cromenoles, cromenones, esteroides y glicéridos (Ayyad *et al.*, 2011), shikimatos como fenilalanina, tirosina, triptófano y sus derivados (Amsler, 2008) y diterpenos complejos, metabolitos de origen terpeno-aromáticos, además de ácidos grasos y fenoles (Pesando, 1990). Estos metabolitos exhiben diversas actividades biológicas, que favorecen al alga como estrategias de sobrevivencia pero que también han probado tener aplicaciones biotecnológicas. Algunas algas producen metabolitos secundarios atractantes de gametos para favorecer su fecundación, poseen actividad antimicrobiana que evita el depósito de organismos epifitos o bacterias degradadoras, e incluso son determinantes en la competencia por el espacio al producir sustancias que afectan la predilección de los herbívoros por éstas especies. Un claro ejemplo es el de los florotaninos o polifenoles, exclusivos de las algas cafés, éstos compuestos incrementan su concentración cuando el alga es dañada por ramoneo, y se ha reportado que participan en la cicatrización de las heridas del tejido, la disuasión de los

herbívoros, la infección microbiana, la quelación de los iones metálicos, la protección contra los rayos UV y poseen actividad anti fúngica (Amsler, 2008). Entre sus aplicaciones farmacológicas podemos citar actividad antibiótica, anti-VIH, anticoagulantes, antiinflamatorias, antitumorales y antioxidantes (Ayyad., *et al.*, 2011).

En el Golfo de California, las especies del género *Sargassum* dominan sobre otras especies de algas en cobertura y biomasa formando grandes mantos. En la Bahía de La Paz se estimó la biomasa cosechable de éste género en 18,901 toneladas de peso húmedo durante la época de primavera, y la presencia de 33 mantos, con un área total de 194 hectáreas (Hernández-Carmona *et al.*, 1990). Estos mantos están constituidos principalmente por *S. lapazeanum*, *S. sinícola* y *S. horridum*.

1.3. Importancia de *Sargassum horridum*.

El 94% de los mantos en la Bahía de La Paz pertenecen a *S. horridum*, contra el 4% de *S. lapazeanum* y dado que en el 2005, Paul-Chávez determinó que *S. horridum* y *S. sinícola* son la misma especie, se puede concluir que *S. horridum* es la especie más común del género *Sargassum* en la Bahía de La Paz. *Sargassum horridum* fue descrita por primera vez por Setchell y Gardner en 1924 (Figura 1) durante uno de los primeros estudios de algas en Norteamérica, incluyendo el Golfo de California. Esta alga pertenece al género *Sargassum*, de la familia *Sargassaceae*, clase *phaeophyceae*, comúnmente clasificada dentro del grupo de las algas cafés. También es conocida como *S. marchantae*, y se distribuye a lo largo de todo el noroeste del Pacífico Mexicano y Golfo de California (Zertuche *et al.*, 2006). Ésta especie suele encontrarse en la zona intermareal medio a la zona submareal superior, donde pueden formar bosques en arrecifes rocosos que llegan a sobresalir de la superficie del mar (Castillo-Suárez, 2008). Durante mucho tiempo se consideró que los mantos de *S. horridum* eran estacionales, pero un estudio en la Bahía de La Paz, demostró la presencia de dos temporadas bien definidas, de marzo a junio con máximos de biomasa, y de mínima biomasa de julio a enero. Su reclutamiento es constante a lo largo de todo el año, con un ligero incremento en la temporada de baja biomasa, al igual que la mortalidad. En la temporada de máxima biomasa aumenta en el peso individual y la tasa de crecimiento (Paul-Chávez, 2005).



TYPE OF *Sargassum horridum* Setchell & Gardner

Proc. Calif. Acad. Sc., ser. 4, 12: 734, pl. 20; figs. 53, 66, 1923.



oogonites from the
anthracis

along the Gulf of California
Sargassum horridum S. & G.
Lopez
La Paz Marchant, 22

Figura 1. Fronda de *Sargassum horridum*. Tomado de Paul- Chávez (2005).

2. Objetivos y metas cumplidas

El objetivo global del proyecto planteados para cubrir en un periodo de dos años (2011-2012) es determinar el potencial de aplicación biomédica y ambiental de algas del género *Sargassum* y *Enteromorpha* colectadas en el Golfo de California. Particularmente: 1) identificar los principios activos (antibacteriano, antitumoral, antiviral) presente en extractos orgánicos de algas del género *Sargassum* y *Enteromorpha*, y 2) evaluar dos especies de macroalgas del género *Sargassum* y *Enteromorpha* como biofiltros en sistemas de recirculación de agua de mar.

Dentro del primer año (2011) se logró determinar el potencial de *Sargassum horridum* como fuente de compuestos biológicamente activos. Adicionalmente, se logró el diseño, construcción y puesta en marcha del sistema de recirculación de agua de mar para evaluar el rol de *S. horridum* como biofiltro durante el cultivo de camarón café. En estos momentos se están realizando las evaluaciones correspondientes a esta última meta. Se espera que durante la segunda etapa (2012), se cubran todos los objetivos planteados.

3. Material y Métodos

3.1. Recolecta del material algal

Las muestras de *Sargassum horridum* sometidas a estudio fueron recolectadas en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. En los puntos conocidos localmente como “Las Tarabillas” en San Juan de la Costa (espécimen: 04-003, 06-009 y 09-007) y “Playa La Concha” (espécimen: 06-005). La recolecta se realizó en el periodo comprendido entre junio de 2004 y junio de 2009, utilizando equipo de buceo libre a una profundidad promedio de 1.0 m. El material algal recolectado fue lavado con agua corriente para eliminar detritus y materia extraña u organismos asociados. Las algas típicamente fueron secadas al sol, molidas con molino manual y envasadas en recipientes PET de 1 galón. Todos los recipientes fueron mantenidos a -20° C hasta el momento de ser utilizadas para la obtención de extractos orgánicos.

3.2 Obtención de extractos orgánicos a partir de *Sargassum horridum*

Para obtener los extractos de cada una de las muestras algales recolectadas, se mezclaron en proporciones de una parte de alga seca y molida con dos y media partes de disolvente

orgánico destilado (peso/volumen). La mezcla se dejó reposar durante 24 h, y al cabo de ese tiempo, fue separada por filtración simple sobre papel filtro. El tejido recuperado fue sometido 2 veces más al mismo proceso de extracción. Las tres soluciones obtenidas a partir de cada alga fueron unidas y concentradas a sequedad en un rotavapor a presión reducida a 40° C, cada extracto fue etiquetado y almacenado a -20° C hasta el momento de ser utilizado.

En el caso de los extractos acuosos se procedió de la siguiente manera: Diez gramos de cada alga seca y molida fueron extraídos individualmente con 200 mL de agua destilada con agitación continua por 4 h a 25°C. El tejido algal se removió por filtración simple, para ser utilizado a un segundo paso de extracción con agua destilada a 80°C y agitación continua por 2 h. Ambos extractos acuosos se centrifugaron individualmente hasta obtener soluciones clarificadas. Cada extracto se precipitó por adición de 3 volúmenes de etanol. El precipitado se recuperó por centrifugación y se secó en una estufa eléctrica a 50°C.

3.3. Pruebas de actividad biológica

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

- 3.3.1. Actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con discos y reversión de la resistencia a los antibióticos
- 3.3.2. Actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el ensayo de microdilución en placa y el indicador azul de alamar
- 3.3.3. Efecto citotóxico contra células VERO por la técnica de microdilución en placa y exclusión del azul de tripano
- 3.3.4. Actividad anti-bioincrustante por la técnica de micro-dilución en placa
- 3.3.5. Actividad anticoagulante de extractos crudos polisacáridos

Para el ensayo de actividad antimicrobiana y de reversión de la resistencia a los antibióticos por el método de difusión en agar con disco, en la selección de cada microorganismo se tomó en cuenta los siguientes criterios: a) tener representado a los dos grandes grupos de

bacterias: gram-negativo y gram-positivo; b) que fueran bacterias caracterizadas pertenecientes a una colección comercial es decir confiabilidad en las cepas; c) que estuvieran involucrados entre las principales enfermedades infecciosas y d) que el manejo de ellas fuera seguro en las condiciones de trabajo correspondientes a la infraestructura del CICIMAR. Tomando en cuenta estos criterios se eligieron tres cepas patógenas de humanos con mecanismo conocido de resistencia a los antibióticos. Las cepas microbianas fueron adquiridas a través de la American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. La cepa de *Escherichia coli* (ATCC BAA-196) es productor de β -lactamasas de espectro extendido, presenta multiresistencia a antibióticos β -lactámicos como penicilinas y cefalosporinas, es resistente a ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, gentamicina, piperacilina, tobramicina y trimetropim/ácido clavulánico; *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42) β -lactamasa positivo, resistente a meticilina, penicilina, oxacilina, ampicilina sulbactam y 16 cefalotina; *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) caracterizada por la presencia de una bomba de eflujo que le confiere resistencia a eritromicina. La cepa utilizada en los ensayos de actividad antimycobacterial fue la H37Rv C (ATCC 27294), la cual presenta sensibilidad a isoniazida, rifampicina, estreptomomicina, etambutol y pirazinamida. En los ensayos de las pruebas de actividad anti-bioincrustante se utilizaron microorganismos formadores de biopelícula, la cual es considerada el primer evento de colonización y lo que prepara a la superficie para la posterior incrustación de macroorganismos. El panel de prueba fue conformado por 3 cepas bacterianas terrestres: *Escherichia coli* (ATCC 23176), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 3 marinas: *Polaribacter irgensii* (ATCC 700398), *Pseudoalteromonas elyakovii* (ATCC 700519), *Vibrio aestuarianus* (ATCC 35048) y 3 microalgas de agua dulce: *Fragilaria crotonensis*, *Cosmarium* sp., *Scenedesmus armatus*.

3.3.1. Actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con discos y reversión de la resistencia a los antibióticos

El ensayo de actividad antimicrobiana por difusión en agar con discos fue modificado para la detección de inhibidores del mecanismo de resistencia en las bacterias elegidas como blanco en este modelo. La modificación consistió en la adición de una concentración

subletal de antibiótico comercial al medio de cultivo utilizado en la fabricación de las placas de agar Mueller-Hinton, con esta modificación se espera que el efecto del extracto en los discos inactive el mecanismo de resistencia de la bacteria dejando que el antibiótico añadido al medio de cultivo ejerza su efecto. Discos de papel filtro Whatman No. 4 de 6.4 mm impregnados con 2 mg del extracto de prueba fueron colocados sobre la superficie de placas de agar Mueller-Hinton preparadas con y sin antibiótico previamente inoculadas con una suspensión del microorganismo de prueba a una concentración de 4.5×10^{-8} células mL⁻¹. Las placas fueron incubadas a 37° C por 24 h y el halo de inhibición fue medido al término de la incubación.

3.3.2. Actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el ensayo de microdilución en placa y el indicador azul de alamar

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

3.3.3. Efecto citotóxico contra células VERO por la técnica de microdilución en placa y exclusión del azul de tripano

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

3.3.4. Actividad anti-bioincrustrante por la técnica de micro-dilución en placa

Se utilizó medio líquido, compuesto de 5 g de peptona diluidos en 1 L de agua de mar filtrada y estéril para el cultivo de bacterias marinas. Las bacterias terrestres fueron

cultivadas en el caldo nutritivo CM0067 No. 2 a 25 g L^{-1} (Oxoid). Todas las bacterias se incubaron a 30° C durante 5 días para permitir su crecimiento. La densidad celular fue ajustada a $2 \times 10^8 \text{ células mL}^{-1}$ por espectrofotometría a una longitud de onda de 630 nm (Amsterdam, 1996). Los cultivos fueron incubados en placas de microdilución de 96 celdas a 30° C durante 48 h con los extractos de prueba. El efecto de los extractos fue determinado a 5 concentraciones diferentes 0.1, 1.0, 10.0, 25.0 y $50.0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Después de 48 h, se determinó la densidad óptica relativa de la suspensión de la muestra a 600 nm.

3.3.5. Actividad anticoagulante de extractos crudos polisacáridos

La actividad anticoagulante de los extractos algales se evaluó por medio de los ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), utilizando plasma sanguíneo obtenido de humanos sanos. El plasma sanguíneo se obtuvo a partir de humanos sanos. La sangre obtenida por venopunción se mezcló con una solución de citrato de sodio al 3.5% en proporción de 9 a 1 (v/v). El paquete celular se removió por centrifugación ($1700 \times g$), y el plasma recuperado se almacenó a -18° C hasta el momento de su utilización. El ensayo de tiempo de protrombina (TP), se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, $100 \text{ }\mu\text{L}$ de plasma humano citrado se mezclaron con $10 \text{ }\mu\text{L}$ de una solución del extracto de prueba (10 mg mL^{-1}) y se incubó a 37° C por 1 min. Después del tiempo de incubación se agregaron $200 \text{ }\mu\text{L}$ del reactivo de TP (Biopool® by Trinity Biotech, plc) preincubado por 10 min. a 37° C . A partir de ese momento se midió el tiempo de formación del coágulo. El ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, $100 \text{ }\mu\text{L}$ de plasma humano citrado, se mezclaron con $10 \text{ }\mu\text{L}$ de una solución del extracto crudo de prueba (10 mg mL^{-1}) y se incubó a 37° C por 1 min. Después del tiempo de incubación se agregaron $100 \text{ }\mu\text{L}$ del reactivo de TTPA (Biopool® by Trinity Biotech, plc), se incubó por 3 min. a 37° C y se agregaron $100 \text{ }\mu\text{L}$ de CaCl_2 al 0.25%. A partir de ese momento se midió el tiempo de formación del coágulo. En todos los casos, la formación del coágulo se inspeccionó visualmente. Todos los extractos fueron ensayados por duplicado. Con los datos se calculó el tiempo de coagulación promedio y la desviación estándar.

3.4 Aislamiento de ácido mirístico, fucosterol y un glucosildiacylglicerol a partir de *Sargassum horridum*

El ácido mirístico fue aislado a partir del fraccionamiento en columna cromatográfica de 0.520 mg de ESL2F1 de las 13 fracciones (CC25F1 a CC25F13, Figura 2) obtenidas en este primer fraccionamiento, la fracción ESL2F1 CC25F7695 eluída con 100% CH₂Cl₂, mostró dos manchas principales con *r_f* de 0.33 y 0.63 sobre placas de fase reversa C-18 en un sistema de 100% etanol. Esa fracción fue re-fraccionada en una columna de fase reversa C18 (Lobar) y eluída con un sistema isocrático de EtOH:H₂O (9:1). Las fracciones obtenidas fueron comparadas entre sí utilizando cromatografía en placa fina (TLC) y unidas por similitud en 3 fracciones identificadas como CC26F1, CC26F2 (cristales) y CC26F3, el análisis de TLC de los cristales de la fracción CC26F2 mostró el compuesto 4 aparentemente puro (ácido mirístico). El fucosterol (compuesto 5, Figura 2) fue obtenido a partir de la fracción CC26F3 por columna cromatográfica de fase reversa C-18 y eluída con un sistema isocrático de EtOH:H₂O (98:2), las fracciones obtenidas fueron unidas por similitud en 3 grandes fracciones CC27F1 a CC27F3, la fracción CC27F3 mostró ser un compuesto aparentemente puro (fucosterol). La fracción denominada como ESL2F3CC13F9Cr1 (CC13F9Cr1) fueron aislados por medio de cromatografía en columna a partir de 3.25 g de la fracción ESL2F3 obtenida del extracto etanólico de *S. horridum*, el fraccionamiento se llevó a cabo usando sílica-gel fase normal y un gradiente de elución utilizando mezclas de CH₂Cl₂, MeOH. En la fracción eluída con CH₂Cl₂:MeOH (8:2) se observó la formación de cristales, los cuales fueron separados por decantación y lavados con mezcla de CH₂Cl₂: MeOH (1:1). El estudio espectroscópico inicial sugiere que este último compuesto podría tratarse de un glucosildiacylglicérido, cuya estructura aun tratamos de establecer en forma inequívoca.

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

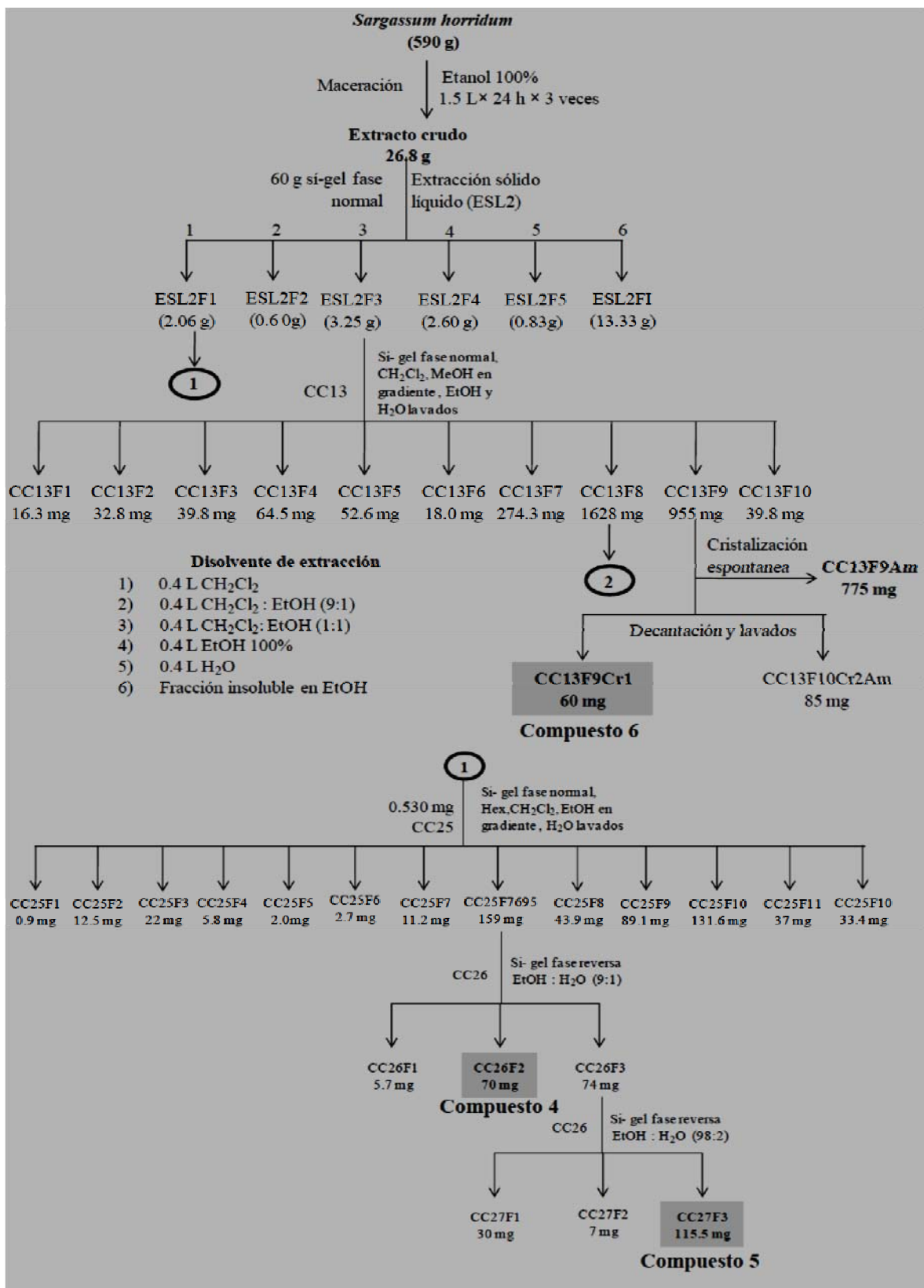


Figura 2. Esquema de fraccionamiento general del extracto crudo etanólico de *Sargassum horridum* (04-003) y aislamiento del ácido mirístico y fucosterol.

4. Resultados

4.1. Actividad antibacteriana y reversión de la resistencia a antibióticos del extracto crudo etanólico de *Sargassum horridum*

Como se mencionó anteriormente, el extracto crudo etanólico de *S. horridum* fue probado contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* utilizando el método de difusión en agar con discos. Simultáneamente, se probó capacidad del extracto para revertir la resistencia bacteriana a ciertos antibióticos. En el presente estudio se logró determinar que el extracto crudo etanólico de *S. horridum* (espécimen 04-003) fue capaz de revertir la resistencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42) a la ampicilina y de *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) a la eritromicina. Entre los reportes bibliográficos referentes a la búsqueda de inhibidores de los mecanismos de resistencia bacteriana, se mencionan como fuentes principales a las bacterias, en algunos casos son desarrollados por síntesis química. Un ejemplo de inhibidor de origen bacteriano es el ácido clavulánico producido por *Streptomyces clavuligerus*. Este ácido, actúa como un inhibidor de β -lactamasas (Hall *et al.*, 2003) mediante inhibición competitiva, la cual es causada por la unión irreversible de una estructura idéntica (un anillo lactámico de 4 miembros) a la del sustrato natural de las β -lactamasas. Creemos que inhibidores competitivos de β -lactamasas se pueden encontrar en las macroalgas, lo cual explicaría el efecto del extracto de *S. horridum* (04-003) y la ampicilina sobre la resistencia de *S. aureus*. Esta idea es apoyada por el aislamiento de sargassumlactam de *S. kjellmanianum* (Nozaki *et al.*, 1980), este compuesto integra en su estructura un anillo lactámico de 5 miembros el cual pudiera tener propiedades similares al anillo lactámico de 4 miembros de las penicilinas y cefalosporinas comunes.

Para el caso de las bombas de eflujo bacteriano se ha investigado el efecto de algunos inhibidores sobre la actividad de la bomba NorA expresada por algunas especies del género *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Kaatz & Seo, 1995; Markham *et al.*, 1999). Entre los compuestos que se han evaluado, se encuentra el alcaloide indólico reserpin y algunos derivados de la tirosina como el INF240 y MC207110. Otros compuestos con grupos estructurales como el bromofenol han sido investigados (Gibbon *et al.*, 2003; Markham *et al.*, 1999). La literatura muestra que compuestos relacionados estructuralmente con algunos

de los inhibidores de la bomba de NorA, están presentes en los extractos de algas del género *Sargassum*. Después de una extensa revisión bibliográfica a través de bases de datos electrónicas, no se encontraron informes sobre la reversión de la resistencia bacteriana a los antibióticos por efecto del uso de extractos algales, por lo que probablemente, nuestro estudio sea pionero en este ámbito. Esto abre una ventana de oportunidad para el estudio de nuevas moléculas con potencial farmacológico sobre el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias farmacoresistentes, lo cual tendría a su vez dos implicaciones importantes. La primera sería una reducción en el costo y tiempo de los tratamientos; esto debido a que muchos fármacos para los cuales ya existe toda la tecnología y han sido aprobados para su aplicación clínica y que actualmente son obsoletos contra bacterias resistentes a los mismos, podrían nuevamente entrar en circulación en combinación con estos nuevos inhibidores y la segunda implicación se vería directamente sobre la disminución en la generación e inducción de resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos, puesto que ya estos presentan dicha resistencia.

4.2. *Sargassum horridum* como fuente de compuestos con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*

El extracto de *S. horridum* (espécimen 04-003) fue evaluado por su capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* dando como resultado una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Adicionalmente este mismo extracto mostró mediana citotoxicidad con una IC_{50} de 19.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra células VERO (línea celular derivada del riñón de un mono verde africano adulto). Por lo que fue fraccionado con el propósito de aislar los compuestos responsables de la actividad mostrada. El fraccionamiento por medio de una extracción sólido-líquido permitió obtener 6 fracciones. Las fracciones ESL2F1, ESL2F2 y ESL2F3 mostraron actividad contra *S. pyogenes*, la ESL2F1 adicionalmente mostró ligera actividad contra *S. aureus*, ninguna de las fracciones fue activa contra *E. coli*. A pesar de que el extracto crudo mostró actividad contra MT con una CMI muy pequeña, sorprendentemente ninguna de las fracciones gruesas obtenidas del extracto presentó actividad contra *M. tuberculosis*. Esto sugiere que la actividad mostrada por el extracto crudo de *S. horridum* se deba a un efecto sinérgico de sus componentes sobre *M. tuberculosis*. Sin embargo, existen reportes en la literatura de compuestos aislados

del género *Sargassum* que han mostrado actividad contra cepas de *M. tuberculosis*, entre los compuestos activos se encuentran, el saringosterol, la saringosterona, fucosterol y diversos ácidos grasos. Por otra parte la citotoxicidad del extracto es alta con respecto a la actividad antimycobacteriana por lo que sugiere que los compuestos activos contra *M. tuberculosis* son diferentes a los responsables de la actividad citotóxica. Como resultado del fraccionamiento de ESL2F1 se logró aislar 3 compuestos (4, 5 y 6) figura 7, los cuales fueron identificados por comparación de sus datos espectrales con lo reportado en la literatura. En el ensayo de actividad antiTB de los compuestos 4, 5 y 6, solo el compuesto 4 (ácido mirístico) mostró actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* con una CMI de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, los compuestos 5 (fucosterol) y 6 (posible galactitol por comprobar) mostraron una CMI $> 100 \mu\text{g mL}^{-1}$. El ácido mirístico ya había sido reportado con anterioridad en un trabajo realizado con el alga *Polysiphonia virgata*, en ese trabajo aislaron diversos ácidos grasos y es ácido mirístico aparece como uno de los responsables de la actividad mostrada contra *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* con una CMI = $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nuestros resultados son consistentes al 100% con este reporte (Saravanakumar *et al.*, 2008). En otro trabajo se evaluó la actividad de diversos ácidos grasos contra 16 especies de *Mycobacterium*, el ácido mirístico mostró una concentración mínima inhibitoria del 40% (CMI₄₀) de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra la cepa de *M. aurum*, contra el resto de las cepas la CMI fue superior a los $400 \mu\text{g/mL}$ (Saito *et al.*, 1984), sin embargo aunque el ácido mirístico obtenido de *S. horridum* mostró una actividad antimycobacteriana interesante creemos que no es el único compuesto activo ya que el extracto etanólico crudo de *S. horridum* mostró una CMI de $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ una actividad 7 veces mayor al ácido mirístico, compuestos obtenidos de otras especies de algas cafés como el caso de *Lessonia nigrescens* de la que se obtuvo saringosterol y sus epímeros 24S y 24R mostraron CMI de 0.25, 1.0 y $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (Wächter *et al.*, 2001), muy probablemente este tipo de compuestos sean los responsables de la alta actividad mostrada por *S. horridum*.

4.3. Identificación estructural de compuestos aislados a partir de *S. horridum*.

El compuesto 4 (Figura 2) fue identificado por medio de ¹H-RMN como ácido mirístico, el espectro de este compuesto mostró desplazamientos químicos en el rango de 0.5 a 2.0 ppm consistente con lo reportado para el ácido mirístico (Catalan *et al.*, 1988). La pequeña señal

alrededor de 0.67 ppm corresponde a los protones del grupo metilo terminal (-CH₃) de la cadena de carbonos del ácido graso, el grupo de señales alrededor de 0.7 y 1.0 ppm corresponde a protones de grupos metilenos unidos a metilo (-CH₂-CH₃), la señal intensa alrededor de 1.1 y 1.3 ppm corresponde a los protones de cadena de grupos metileno [(-CH₂-)_n], la señal alrededor de 1.5-1.6 ppm corresponde a protones de grupos unidos a carbonos β del grupo carboxilo (-CβH₂-CαH₂-COOH), por último la señal alrededor de 1.95 ppm corresponde a los protones α del grupo metileno unido al grupo carbonilo (-CH₂-COOH). El compuesto 5 (CC27F3, Figura 2) mostró un espectro de protón complejo con múltiples señales, sin embargo los desplazamientos característicos de los esteroides pueden ser fácilmente identificados. En el espectro ¹H-RMN (Figura 15), las señales de los protones de los carbonos 18 y 19, las podemos observar a las 0.67 y 01.2 ppm respectivamente, las señales dobles de los metilos 21, 26, 27 y 29 las observamos a 0.96, 0.97, 0.98 y 1.24 ppm respectivamente. Los desplazamientos químicos mostrados por el compuesto 5 son consistentes con los reportados para la molécula de fucosterol. El compuesto 6 (Figura 2) mostró un espectro de ¹H-RMN consistente con un glucosildiácilglicérido. Actualmente se continúa trabajando para establecer la estructura química de ese compuesto de manera inequívoca.

4.4. Actividad anti-bioincrustante (o formadora de bio-película) por la técnica de micro-dilución en placa

En el caso de organismos formadores de bio-película, el extracto crudo de *S. horridum* mostró actividad inhibitoria frente a *Enterobacter aerogenes* y *Vibrio estuarinus* (CIM=1 y 0.1 µg mL⁻¹, respectivamente) y efecto estimulante de la microalga *Fragilaria crotonensis* y *Scenedesmus armatus* (0.1 y 1.0 µg mL⁻¹, respectivamente). Estos resultados son bastante interesantes, ya que sugiere que el extracto de *S. horridum* tiene potencial para ser utilizado en la industria acuícola para el control de la vibriosis en las etapas tempranas del camaronicultivo y algunos peces.

4.5. Actividad anticoagulante de extractos crudos polisacáridos

Los extractos acuosos obtenidos a 25° y 80° C a partir de *S. horridum* fueron capaces de aumentar el tiempo normal de tromboplastinas parcial activada (TTPA) por más de 10

veces a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, los mismo extractos resultaron inactivos cuando se evaluó su efecto frente al ensayo de tiempo de protrombina (TP). Las diferencias en la actividad observada pueden ser explicadas con base en el hecho de que ambos ensayos evalúan rutas alternas de la cascada de coagulación sanguínea. En cuanto a la actividad observada frente al ensayo de TTPA, esta fue debido a la presencia en el extracto acuoso obtenido a 25°C de fucoidán, un conocido polisacárido sulfatado.

5. Conclusiones e impacto de la investigación

Del estudio realizado y con la evidencia experimental obtenida, un número de importantes conclusiones fueron alcanzadas.

5.1. Con respecto al estudio de reversión de la resistencia bacteriana a los bacterianas, se encontró que después de una extensa revisión bibliográfica a través de bases de datos electrónicas, no se encontraron informes sobre la reversión de la resistencia bacteriana a los antibióticos por efecto del uso de extractos algales, por lo que **probablemente, nuestro estudio sea pionero en este ámbito**. Esto abre una ventana de oportunidad para el estudio de nuevas moléculas con potencial farmacológico sobre el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias farmacoresistentes, lo cual tendría a su vez dos implicaciones importantes. La primera sería una reducción en el costo y tiempo de los tratamientos; esto debido a que muchos fármacos para los cuales ya existe toda la tecnología y han sido aprobados para su aplicación clínica y que actualmente son obsoletos contra bacterias resistentes a los mismos, podrían nuevamente entrar en circulación en combinación con estos nuevos inhibidores y la segunda implicación se vería directamente sobre la disminución en la generación e inducción de resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos, puesto que ya estos presentan dicha resistencia.

5.2. Con respecto al estudio de actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* resulta particularmente interesante el hecho de que un extracto crudo pueda ser tan activo como lo mostró el extracto de *S. horridum* (04-003). Debe explicarse aún, porque otros extractos de la misma especie pero de muestras diferentes, no lo son. El potencial de

esta alga como fuente de compuestos anti-mycobacterianos aún debe seguir explorándose, ya que aunque en este trabajo se identificaron dos principios activos, ninguno de ellos era tan activo como el extracto crudo. Esto último sugiere que en el extracto podrían estar presentes compuestos con mayor actividad.

5.3. El estudio de actividad inhibitoria de bio-películas demostró que los extractos crudos de *S. horridum* poseen actividad inhibitoria contra organismos del *Vibrio*, los cuales, en su conjunto son un serio problema durante las primeras etapas del camaronicultivo. Pero adicionalmente, el estudio mostró que los mismos extractos son capaces de estimular el desarrollo de algunas microalgas de agua dulce. Esto último sugiere que los extractos obtenidos de *S. horridum* podrían ser fuente de compuestos con actividad tipo auxina/citocinina las cuales son de importancia vital en el desarrollo de las plantas. Se debería de explorar el potencial de aplicación de estos extractos en el mejoramiento de cultivos comerciales de plantas comestibles.

5.4. El estudio de actividad anticoagulante claramente mostró la presencia de fucoidán en el extracto acuoso obtenido a 25°C. Este último ha sido extensivamente estudiado desde varios puntos y su potencial de aplicación biomédica ha sido establecido.

Por todo lo mencionado hasta aquí, el presente estudio podría impactar diferentes áreas, más allá de la biomédica. Es importante no perder de vista que *Sargassum horridum* es una especie clave en numerosos ecosistemas de, prácticamente, todo el Golfo de California. Por ello, el conocimiento de la especie resulta de importancia estratégica en términos de conservación y aprovechamiento. Por otro lado, los resultados obtenidos servirán sin duda alguna, como base para estudios futuros relacionados con aspectos quimio-ecológicos entre otros.

6. Citas Bibliográficas

Amsler, Ch. 2008. Algal ecology chemical. Springer. Berlin Heidelberg. 313 pp.

- Ayyad, S.-E., Basaif, S., Badria, A., Ezmirly, S., Alarif, W., & Badria, F. 2011. Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum* sp. *Pharmacognosy Research* 3(3): 160-165.
- Castillo Suárez, A. N. 2008. Fauna asociada a mantos de *Sargassum* (Ochrophyta : Fucales) en el Sauzoso, Baja California Sur, México. Tesis de Maestría CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 119 p.
- Catalán, A. N. C., I. A. D. de Iglesias, J. Kavka, E. V. Sosa & W. Herz. 1988. Glaucolides and related sesquiterpene lactones from *Vernonia chamaedrys*. *Phytochemistry* 27: 197-202.
- Gibbon, S., M. Oluwatuyi & G. W. Kaatz. 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 51: 13-17.
- Guiry M. D. y G. M. Guiry. 2011. AlgaBase. World-wide electronic publications, National university of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 05 December 2011.
- Hall, G. B., S. J. Salipante, M. M. Barlow. 2003. Independent origins of subgroup B₁+B₂ and subgroup B₃ metallo-lactamases. *J. Mol. Evol.* 59: 133-141.
- Hernández-Carmona, G., M. M. Casas-Valdez, C. Fajardo-León, I. Sánchez- Rodríguez, E. Rodríguez-Montesinos. 1990. Evaluación de *Sargassum* spp. en la Bahía de La Paz, B.C.S., México. *Inv. Mar. CICIMAR.* 5 (1): 11-18.
- Kaatz, W. G. & M. S. Seo. 1995. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 39: 2650-2655.
- Markham, N. P. E., K. W. Klaychko, M. E. Johnson & A. A. Neyfakh. 1999. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemoth.* 43: 2404-2408.

- Nozaki, H., Y. Fukuoka, A. Matsuo, O. Soga & M. Nakayama. 1980. Structure of sargassumlactam, a new β , γ -unsaturated- γ -lactam, from the marine alga *Sargassum kjellmanianum*. *Chem. Lett.* 9: 1453-1454.
- Paul-Chávez, L. 2005. Taxonomía y dinámica poblacional del complejo sinicola (Fucales: Phaeophyta) para el suroeste del Golfo de California. Tesis Doctorado. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México. 175 p.
- Pesando, D. 1990. Antibacterial y antifungal activities of marine algae. *Introduction to Applied Phycology*, 3-26.
- Saito, H., H. Tomioka & T. Yoneyama. 1984. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 26: 164-169.
- Saravanakumar, D. E. M., P. I. Folb, B. W. Campbell & P. Smith. 2008. Antimycobacterial activity of the red alga *Polysiphonia virgata*. *Pharm. Biol.* 46: 254-260.
- Wächter, A. G., G. S. Franzblau, G. Montenegro, J. J. Hoffmann, M. W. Maiese & B. N. Timmermann. 2001. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *J. Nat. Prod.* 64: 1463-1464.
- Zertuche-González, J. a, Galindo-Bect, L. a, Pacheco-Ruíz, I., & Galvez-Telles, a. 2006. Time-Space Characterization of Commercial Seaweed Species from the Gulf of California using a Geographical Information System. *Journal of Applied Phycology* 18:543-545.