



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA

TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Ulva lactuca.

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO MARINO

PRESENTA:

GLORIA ELIZABETH LÓPEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR:

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR. OCTUBRE 2015



UABCS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

DEPARTAMENTO ACADÉMICO
DE BIOLOGÍA MARINA
P.E. Acreditado



Fecha: _____

**DR. ENRIQUE ALEJANDRO GÓMEZ GALLARDO UNZUETA,
JEFE DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA,
PRESENTE.**

Los abajo firmantes, Miembros de la Comisión Revisora del **TRABAJO DE TESIS** **TERMINADO** titulado: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Ulva lactuca*"; que presenta el (la) pasante de la Carrera de Biólogo Marino **C. GLORIA ELIZABETH LÓPEZ GONZÁLEZ**, comunicamos a usted, que otorgamos nuestro **voto aprobatorio** y consideramos que dicho trabajo está listo para su defensa a fin de obtener el título de Biólogo Marino.

Dr. Rafael Romero R
Nombre Completo

[Firma]
Firma

PRESIDENTE

Dr. Juan Manuel López Vivas
Nombre Completo

[Firma]
Firma

SECRETARIO

Jesús Iván Morillo Álvarez
Nombre Completo

[Firma]
Firma

VOCAL

Jesús Iván Morillo Álvarez
Nombre Completo

[Firma]
Firma

DIRECTOR DE TESIS

C.c.p. Dirección de Servicios Escolares.
C.c.p. Interesado
C.c.p. Archivo

DEDICATORIA

Con todo el amor del mundo a mi amiga, cómplice y compañera; la persona más especial en este mundo que incondicionalmente ha estado en todo momento motivándome: mi madre.

A mi familia, jamás los cambiaría por nada en este mundo.

Dedico esta tesis en general a todos aquellos que creyeron en mí, a quienes me apoyaron en cada paso hacia la culminación de mis estudios y diferentes logros, a todos aquellos que me regalaron por más grande o pequeño tiempo de su vida y vivieron junto a mi algún momento de felicidad, enojo o tristeza.

“Vivir es fácil, lo difícil es ser alguien en la vida”.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario en Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por permitirme el uso de las instalaciones y material utilizado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez por su gran paciencia, orientación y tiempo prestado a la realización de este proyecto, gracias.

Al Dr. Mauricio Muñoz Ochoa por su apoyo, amistad y orientación dentro de la realización de las pruebas de laboratorio. Gracias por ese buen humor que siempre me hizo tranquilizar los nervios.

Al Dr. Rafael Riosmena Rodríguez y al Dr. Juan Manuel López Vivas, por su orientación y tiempo prestado a este trabajo.

Al Dr. Mario Vergara, por la iniciativa a este proyecto.

A mi familia, que en todo tiempo estando aún lejos ellos están más cerca de mí con cada palabra de aliento o ironía expresada, mucho o todo de lo que he logrado es gracias a ustedes.

“Agradece y ama a quienes han ayudado a tu crecimiento personal y laboral”.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS.....	II
GLOSARIO.....	III
RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Descripción de <i>Ulva lactuca</i> (Linnaeus, 1753)	5
2.2. Ciclo de vida de <i>Ulva lactuca</i>	8
2.3. Hábitat y distribución de <i>Ulva lactuca</i>	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	13
5. ÁREA DE ESTUDIO.....	14
6. MATERIALES Y MÉTODO	17
6.1. Recolecta e identificación taxonómica.....	17
6.2. Obtención de extractos crudos	17
6.3. Fraccionamiento del extracto etanólico de <i>Ulva lactuca</i>	18
6.4. Ensayo de actividad antimicrobiana	21
6.5. Caracterización de la fracción activa por espectroscopia de infrarrojo	21
7. RESULTADOS	22
8. DISCUSIÓN.....	25
8.1. Rendimiento de los extractos	25
8.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	25
8.3. Caracterización de compuestos	26
9. CONCLUSIONES.....	30
10. BIBLIOGRAFÍA.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ulva lactuca</i> (Linnaeus 1753). http://www.algaebase.org/4/9/2015	7
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Ulva lactuca</i>	9
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Ulva lactuca</i> . http://www.discoverlife.org/18/08/2015	11
Figura 4. Localización del área de recolecta, en la Bahía de La Paz B.C.S., México	16
Figura 5. Esquema de obtención de extractos crudos.....	19
Figura 6. Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de <i>Ulva lactuca</i>	20
Figura 7. Cromatografía de capa fina de los extractos	22
Figura 8. Halo de inhibición frente a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> presentado por la sub-fracción F14-2 aislada a partir del extracto etanólico de <i>Ulva lactuca</i>	23
Figura 9. Espectro de absorción de infrarrojo de la sub-fracción F14-2.....	24

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Ubicación taxonómica de <i>Ulva lactuca</i> . http://www.itis.gov/8/10/2012	6
Tabla II. Rendimiento de cada extracto respecto a su peso fresco y extracto obtenido	22
Tabla III. Comparación de bandas de absorción de IR (ondas cm^{-1}) de la sub-fracción F14-2 aislada a partir de <i>Ulva lactuca</i> en el presente estudio y los compuestos reportados de <i>Ulva fasciata</i> en: Chakraborty <i>et al.</i> (2010) Antibacterial labdane diterpenoids of <i>Ulva fasciata</i> Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. Food Chemistry 119: 1399-1408.	29

GLOSARIO

Absorbancia: cantidad de luz que absorbe una muestra a una longitud de onda dada; es directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra.

Ácido acrílico: ácido carboxílico insaturado más simple, con un enlace doble y un grupo carboxilo unido a su C3.

Actividad antiviral: tipo de fármaco usado para el tratamiento de infecciones producidas por virus.

Actividad biológica: o bioactividad, es el efecto benéfico o adverso de una sustancia sobre un organismo vivo.

Acuicultura: conjunto de actividades, técnicas y conocimientos en crianza de especies acuáticas, vegetales y animales.

Antibacteriano: fármaco o sustancia capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado.

Antifúngico: o antimicótico, es aquella sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

Bioactivos: Relativo o perteneciente a una sustancia que tiene un efecto en el tejido vivo o causa una reacción en él.

***Candida albicans*:** hongo diploide asexual en forma de levadura.

Cepa: en microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

Chlorophyta: división de algas verdes, tienen como principal característica la presencia de clorofila a y b, causando su color verdoso.

Cromatografía: método físico de separación basadas en el principio de retención selectiva para identificar y determinar las cantidades de componentes.

Diterpenos: terpenos de 20 carbonos, se encuentran en las plantas superiores, hongos, insectos y organismos marinos.

***Escherichia coli*:** bacteria facultativa anaerobia, Gram-negativa, móvil por flagelos.

Esteroles: derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, se caracterizan por tener como función orgánica oxigenada el alcohol, el esteroles más común en los humanos y animales es el colesterol.

Fármaco: molécula bioactiva que, en virtud de su estructura y configuración química, puede interactuar con macromoléculas proteicas, generalmente denominadas receptores.

Glucósido: cualquier molécula en la cual un glúcido se enlaza a través de su carbono anomérico a otro compuesto mediante un enlace O-glucosídico o un enlace S-glucosídico.

Invertebrados: aquellos animales que carecen de columna vertebral o notocorda y de esqueleto interno articulado.

Lectinas: son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto.

Metabolito secundario: compuesto orgánico sintetizado por algún organismo vivo que no tiene un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo, pero que puede brindar una ventaja competitiva.

Microorganismo: seres vivos microscópicos; en este grupo se incluyen las bacterias, hongos, virus, protozoos y algas microscópicas.

Patógeno: agente biológico externo que se aloja en un ente biológico, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no.

Producto natural: compuesto final del metabolismo secundario de los organismos; algunas veces son particulares para cierta clase de organismos y pueden tener efectos farmacológicos.

Terpenos: se originan por polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de extractos y fracciones de *Ulva lactuca* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Candida albicans* por medio del ensayo de difusión en agar con discos. El material algal estudiado se recolectó en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México; este después de haber sido secado y molido, se le extrajo por maceración a temperatura ambiente y de manera sucesiva con hexano, diclorometano y etanol. El extracto etanólico fue, por mucho, el de mayor rendimiento, por lo que se sometió a un proceso de separación cromatográfica, y las fracciones obtenidas se evaluaron para determinar su actividad antimicrobiana. En cuanto a las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico sólo una de todas ellas mostró actividad antibacteriana frente a *V. parahaemolyticus* a la concentración de 2.0 mg mL⁻¹. El análisis estructural de la fracción activa conducido por medio de espectroscopia de infrarrojo sugiere fuertemente que la actividad observada contra *V. parahaemolyticus* es debida a la presencia de diterpenos oxigenados del tipo labdano. Es importante considerar que *V. parahaemolyticus* es un patógeno causante de importantes pérdidas económicas en acuicultura debido a su difícil control, y es en esa área en donde estos resultados podrían encontrar alguna aplicación.

Palabras clave: antimicótico, antibacteriano, *Ulva lactuca*, bioactivo, metabolitos secundario, diterpenos.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la década de los 80's y 90's, el estudio químico de algas marinas experimentó un gran incremento debido a la necesidad de nuevos compuestos biológicamente activos (Paul, 1988; Pawlik, 1993). Alrededor del 3% del total de las algas conocidas han sido estudiadas desde el punto de vista de sus metabolitos secundarios, habiéndose caracterizado poco más de 3,700 compuestos (Maschek y Baker, 2008).

De acuerdo con McClintock y Baker, hasta el año 2001 se habían aislado un total de 9,565 productos naturales provenientes de diferentes organismos marinos; sin embargo durante las últimas cinco décadas, se han reportado cerca de 15,800 publicaciones que cubren revisiones en: aislamiento, síntesis, determinación de actividad biológica y estudios ecológicos, entre otros (Bhakuni y Rawar, 2005). Por su parte Mayer y Hamann (2004 y 2005) reportan en más de 30 artículos científicos, publicados desde el 2000 hasta fechas recientes, el estudio de 56 estructuras novedosas aisladas de organismos marinos, entre las cuales encontramos: polisacáridos sulfatados, depsipéptidos, terpenos, alcaloides, glucósidos; así como diterpenos, eicosanoides, lectinas, esteroides y alcaloides (Faulkner, 1984; Hay, 1996; Ospina, 1997), a las que se le atribuyen actividades farmacológicas como antibacteriana, antiviral, anti-malárica, antimicótica, anti-tuberculosis y anticoagulantes, entre otras (De la Calle, 2007).

La identificación y caracterización biológica-molecular de organismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina moderna, agricultura, industria cosmética, de suplementos nutricionales, biomoléculas, biocatalizadores, agroquímicos, química fina, entre otras (Heinz, 1979; Oranday, 1988; Pelegrín, 2001; Evangelista-Martínez y Moreno-Enríquez, 2007).

Muchos organismos marinos entre los que se incluyen bacterias, hongos, fitoplancton y algas, así como algunos invertebrados son actualmente considerados importantes fuentes promisorias de sustancias bioactivas. Los estudios realizados con algas han demostrado que estas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras moleculares únicas, no

encontradas en otros organismos. La actividad inhibitoria de estos compuestos no parece estar limitada a algún grupo de alga en particular ya que miembros de los cinco grupos de algas marinas (rodofitas o algas rojas, feofitas o algas pardas, clorofitas o algas verdes, cianofitas o cianobacterias, y dinoflagelados) han mostrado ser capaces de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias, virus y hongos (Schwimmer y Schwimmer, 1955; Olesen *et al.*, 1964; Bhakuni y Silva, 1974; Abbott y Hollenberg, 1976; Faulkner, 1984).

Dada la abundancia de cloro y bromo en los océanos, no es de extrañar que la mayoría de los compuestos halogenados sean de origen marino. Las algas y el fitoplancton producen una gran diversidad de compuestos organohalogenados y, quizás, representan el 20-25% de todos los organohalogenados naturales conocidos (Darias, 2010). En general las macroalgas han proporcionado casi 3 mil productos naturales, representando aproximadamente el 20% del total de compuestos aislados en el ambiente marinos (Newman *et al.*, 2000; Blunt *et al.*, 2006).

Las Chlorophytas constituyen un gran grupo de interés farmacológico, productos provenientes de algunas especies han demostrado propiedades antioxidantes (Stein y Borden, 1984; Ortiz, 2011), anti-inflamatorias y actividad frente al virus del SIDA; algunas especies biosintetizan derivados fenólicos halogenados que han evidenciado propiedades anti-fitofágicas, anti-inflamatorias e inhibición de la biosíntesis del colesterol (Luján-Flores y León-Córdoba, 2008). Extractos de distinta polaridad de especies de *Ulva*, *Enteromorpha* y *Codium*, han sido descritos como anti-microbianos y anti-inflamatorios. Derivados glucosilados de esteroides obtenidos de *Ulva lactuca* han evidenciado actividad anti-inflamatoria en estudios *in vivo*, aunque resta determinar el o los mecanismos de acción para tal efecto.

En referencia a lo citado anteriormente en el presente trabajo se propone evaluar al alga *Ulva lactuca* (Chlorophyta, Tabla I) como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana frente a: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Candida albicans*. Además de la caracterización estructural de las posibles moléculas aisladas de dicha alga.

2. ANTECEDENTES

Los productos naturales son fuente importante de compuestos bioactivos (Fusetani, 2000). Desde tiempos remotos se conoce que los organismos marinos presentan los llamados metabolitos secundarios, es decir, compuestos inusuales que no están involucrados en el metabolismo primario; los cuales varían según el hábitat y organismos que los contengan, siendo más comunes en ambientes bentónicos y tropicales, debido a que los organismos están sujetos a altas tasas de ataque por consumidores en los arrecifes de coral (Hay y Steinberg, 1992; Paul, 1992; Pawlik, 1993; Scheuer, 1996). Sin embargo, los metabolitos secundarios también juegan papeles importantes en climas templado (Steinberg, 1992) y en comunidades bentónicas antárticas (McClintock, 1994) y posiblemente, en las comunidades de todo el mundo pelágicos (Huntley *et al.*, 1986; Paerl, 1988; Faulkner, 1994).

Los dos fila animales del mundo marino más estudiados son, Poríferos (esponjas) y Bryozoos. Por otra parte se han reportado similares mecanismos en las algas marinas, donde estas en un ámbito evolutivo han definido y seleccionado diversas estrategias de supervivencia (Fenical, 1978; Hay y Fenical, 1992; Hay y Steinberg, 1992; Paul, 1992).

Pratt *et al.* (1951) reportan el primer artículo científico sobre propiedades antimicrobianas de organismos marinos, en donde se tienen los primeros estudios de algas verdes, precisamente de una especie *Chlorella*, cuyo extracto soluble en éter inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; del género *Halimeda* reportaron nuevos diterpenos que mostraron propiedades antimicrobianas y citotóxicas (Valerie y Fenical, 1984).

Algunos extractos de algas marinas han sido estudiados y referidos por Harada, Noro y Kamey (1997) quienes evaluaron 1446 extractos acuosos y metanólicos procedentes de 306 especies de algas marinas de las costas de Japón mediante ensayos *in vitro*. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la efectividad de los extractos de cuatro especies de algas clorofitas frente a leucemia L1210, en particular el extracto metanólico de la especie *Cladophoropsis vaucheriaformis*, que exhibió el 86% de viabilidad para las células normales y selectivamente citotóxicos contra células de leucemia P388 y L1210.

Por otra parte, Pérez *et al.* (1998), observaron y demostraron la presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasa en algas marinas recolectadas en dos localidades de las costas del Departamento Federal y del estado Falcón, Venezuela, ensayaron con diferentes eritrocitos (conejo, caballo, ratones y humanos), encontrando que los eritrocitos tratados enzimáticamente fueron más susceptibles a la presencia de las lectinas, siendo las especies pertenecientes a la división Chlorophyta las que exhibieron mayor actividad hemaglutinante, a diferencia de las divisiones Phaeophyta y Rhodophyta.

Las Chlorophytas o algas verdes son los productores menos prolíficos en términos de productos naturales (Dupéron *et al.*, 1983) con menos de 300 compuestos conocidos y pocos metabolitos secundarios reportados anualmente. La característica química principal de dichas algas es la presencia relativamente común de 1,4-diacetoxibutadieno, un éster dienolato encontrado en muchos terpenos de algas verdes., los cuales llegan a mostrar una citotoxicidad notable (Faulkner, 1991; Munro y Blunt, 2005).

Los compuestos representativos derivados de las clorofitas son principalmente derivados isoprenoides (59%), acetogeninas (19%) y derivados de aminoácidos (14%), con pequeños porcentajes de aislamiento de derivados de carbohidratos y shiquimatos (McClintock y Baker, 2001). Gracias a la gran variedad de terpenoides sintetizados por las algas, estas pueden defenderse contra los herbívoros, ejemplo de ello es el alga verde *Cymopolia barbata*, que contiene mezcla de compuestos bromados e hidroquinonas preniladas (McConnell *et al.*, 1982; Hay *et al.*, 1988). Otro metabolito de esta alga, el bromoisocymobarbatol, que inhibe significativamente el ataque de sus depredadores (Park *et al.*, 1992).

Algunas especies de *Ulva* son usadas como alimento y en medicina popular; por ejemplo, *Ulva fasciata* se utiliza para cicatrizar heridas y posee actividad antimicrobiana debida principalmente a la presencia de ácido acrílico (Sieburth, 1960; Abdel y Edress, 1973; Dave y Parkh, 1978), el cual fue el primer compuesto reportado en algas con actividad antibiótica. *Ulva fasciata* también posee un compuesto con actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* que fue identificado como N-palmitoil-2-amino-1,3,4,5-tetrahidrooctadecano (Hari *et al.*, 1992). Algunas algas

verdes sintetizan otros compuestos bioactivos (Kumar y Zirong, 2004); por ejemplo, *Ulva lactuca* produce compuestos con propiedades anti-inflamatorias (Faulkner, 2002).

Castro-González *et al.* (1996) realizaron estudios químicos del alga verde *Ulva lactuca*, recolectada durante el verano en la ensenada de La Paz, B.C.S. (México). Los resultados fueron los siguientes: proteína cruda, 10.7%; carbohidratos, 30.9%; cenizas, 53.2%; fibra cruda, 4.8%; digestibilidad *in vitro*, 64.6%; digestibilidad multienzimática, 86.5%. Se detectó precipitación en la prueba cualitativa de alcaloides. Los minerales cuantificados fueron: calcio (0.84%), hierro (0.66%), fósforo (0.14%) y cloro (9.8%) en forma de cloruros.

2.1. Descripción de *Ulva lactuca* (Linnaeus, 1753)

Ulva lactuca (Figura 1) es un alga polimórfica de color desde verde claro a oscuro ubicada taxonómicamente dentro del Orden de las Ulvales (Tabla 1). Ovals cuando jóvenes, caracterizada por presentar hojas de talos membranosos ampliamente expandidas lobadas o profundamente hendidas con o sin perforaciones de hasta 30 cm de largo, con márgenes ondulados de un grosor de entre 40 y 55 μm en el borde de la lámina, en la parte media hasta 85 μm y en la región basal entre 80 y 100 μm (Norris, 2010), en estado joven presentan lóbulos recién formados de un grosor 20 μm ; se pueden encontrar hojas maduras principalmente a 6 cm de distancia del talo. Presenta hojas anuales con crecimiento difuso-marginal y células rizoides como método de sujeción al sustrato (Lee, 2008), con pocas células multinucleadas que se extienden hacia abajo entre el margen de la hoja. En estado joven las células rizoidales no se diferencian en tamaño de las que las rodean, a medida que el talo crece las células entre las rizoidales presentan diámetros más pequeños (Boraso de Zaixso, 2004).

Ulva lactuca presenta células de forma cuadrangular a poligonal dispuestas irregularmente en pequeños campos circulares o cuadrangulares. Un solo cloroplasto laminar o en forma de copa principalmente en la cara exterior de la célula, con uno o varios pirenoides. Se observan talos esporangiales y gamentagiales

morfológicamente similares con áreas fecundas marginales y/o terminales con gametos biflagelados, estos considerados isogametos o anisogametos (Abbott y Hollenberg, 1976). *Ulva lactuca* es sumamente oportunistas, debido a que la fase gemetofítica es longeva y resistente, manteniéndose en estado de latencia por largos periodos hasta 2 años (Pedroche *et al.*, 2005; Crémades *et al.*, 2006).

Tabla I. Ubicación taxonómica de *Ulva lactuca*. <http://www.itis.gov/8/10/2012>

Reino	Plantae
Subreino	Viridiaeplantae
División	Chlorophyta
Clase	Ulvophyceae
Orden	Ulvales
Familia	Ulvaceae
Género	Ulva
Especie	<i>Ulva lactuca</i> (Linnaeus 1754)

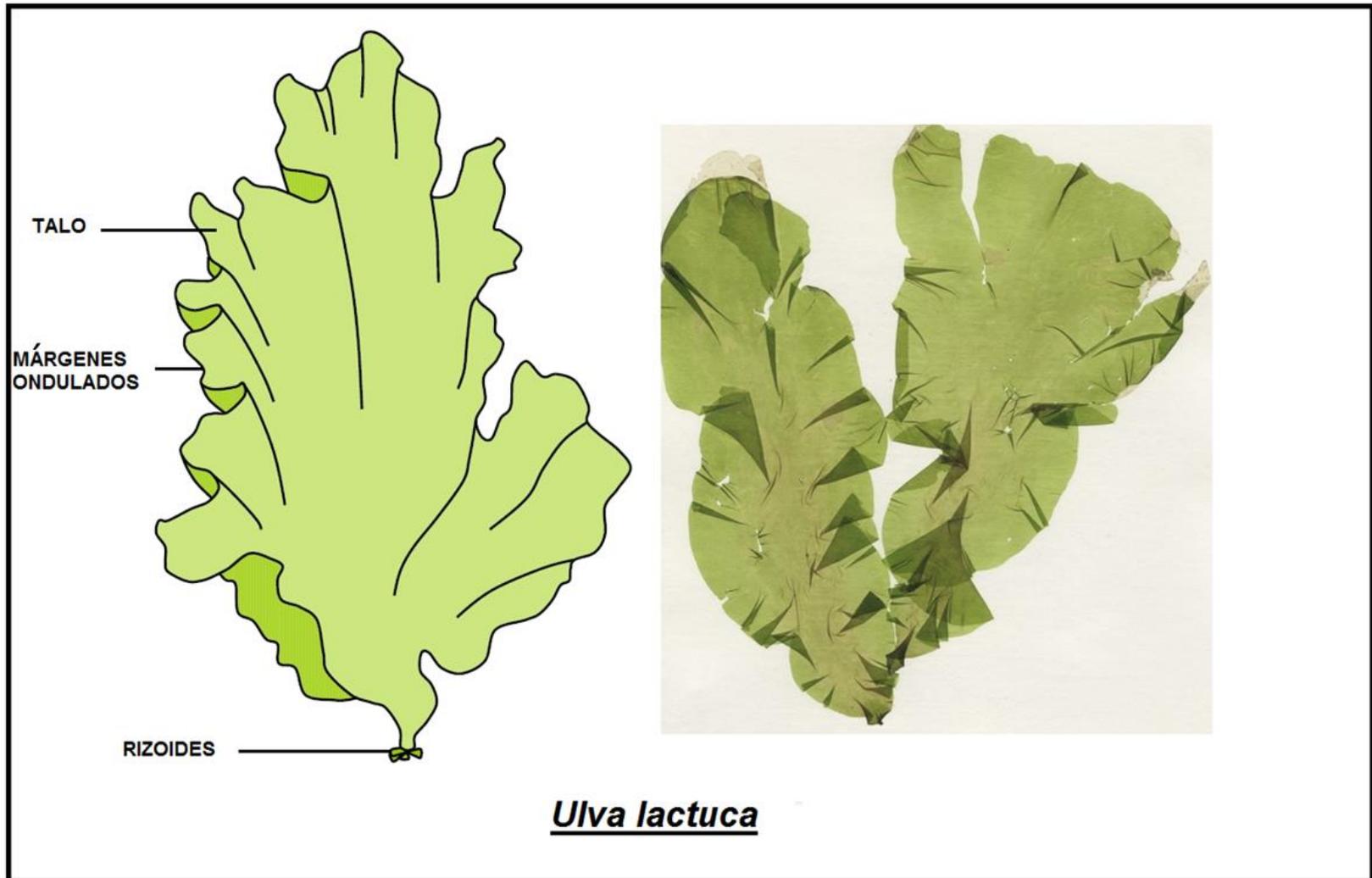


Figura 1. *Ulva lactuca* (Linnaeus 1753). <http://www.algaebase.org/4/9/2015>

2.2. Ciclo de vida de *Ulva lactuca*

Ulva lactuca como muchas otras especies de clorofitas, presenta alternancia de generaciones. El esporófito diploide que está constituido por una ancha fronde de sólo dos hileras de células de espesor, se diferencia y divide por meiosis, generando esporas haploides móviles. Estas zoosporas nadan propulsadas por sus cuatro flagelos, finalmente, algunas encuentran un sustrato adecuado para fijarse, allí las zoosporas pierden sus flagelos y comienzan a dividirse por mitosis produciendo un fino filamento que se desarrolla dando una fronde ancha de sólo dos hileras de células de espesor. El gametofito así producido tiene entonces el mismo aspecto que el esporófito, en otras palabras *Ulva lactuca*, tiene un ciclo de vida isomórfico (Figura 2; Purves, 2009). Además, en la mayoría de las especies de *Ulva*, los gametos femeninos y masculinos no son distinguibles estructuralmente entre sí, por ello, estas especies son isógamas: tienen gametos de aspecto idéntico. Otras clorofitas, incluidas otras especies de *Ulva* son anisógamas: los gametos femeninos son claramente más grandes que los masculinos (Des Abbayes *et al.*, 1989; Karp, 1998).

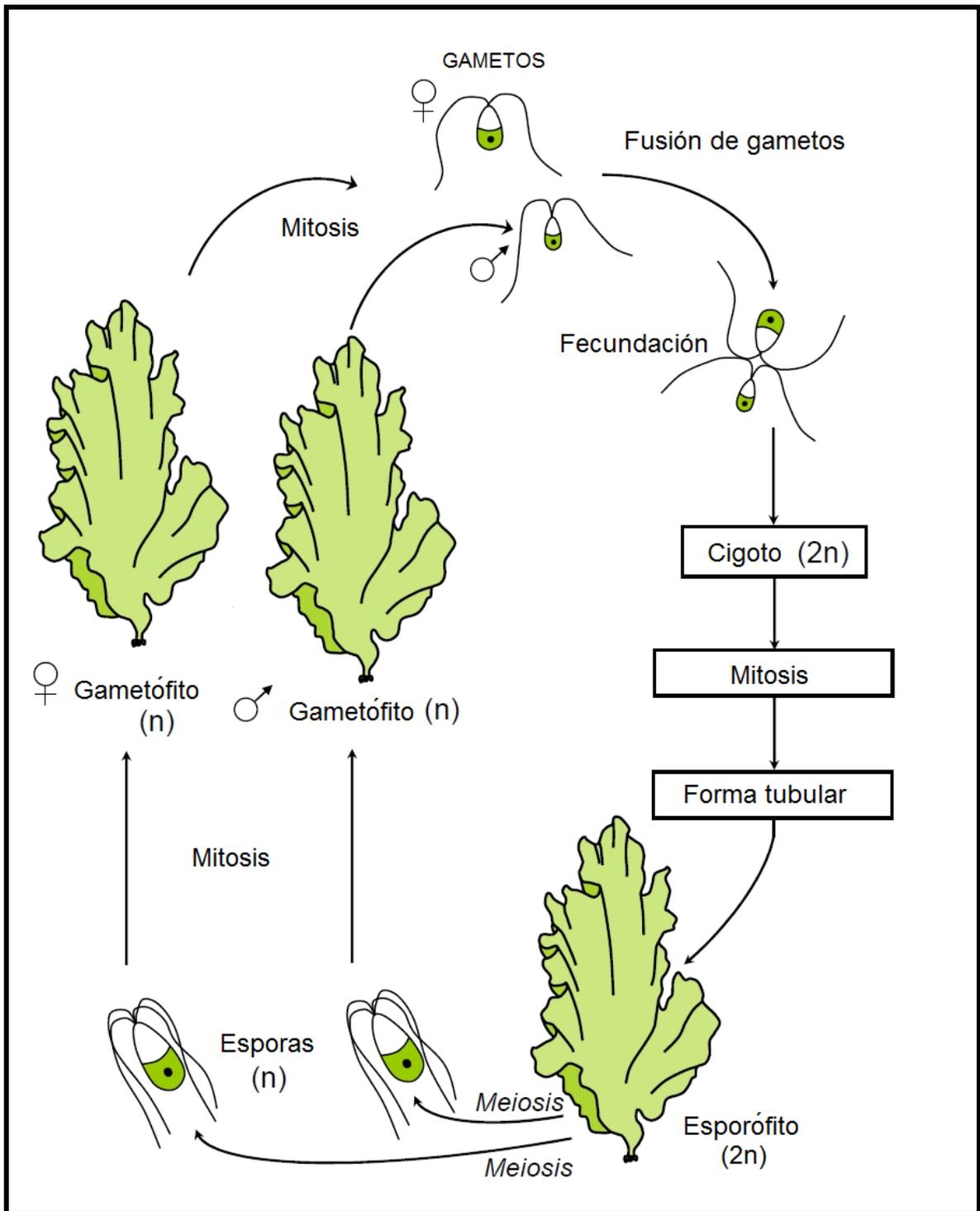


Figura 2. Ciclo de vida de *Ulva lactuca*.

2.3. Hábitat y distribución de *Ulva lactuca*

Cosmopolitas presente en casi todos los mares desde el intermareal al submareal, en charcas, rocas o sublitoral hasta 20 m de profundidad (Figura 3). Se caracterizan por una alta resistencia y tolerancia a cambios drásticos en su entorno. Pueden encontrarse en aguas dulces, salobres o saladas e incluso, sobre la nieve. Poco dependientes a la eutrofización ó trastornos ambientales e incluso, resistentes a contaminación y epifitismo (Pachecho-Ruíz *et al.*, 2002; Pedroche *et al.*, 2005). Sobreviven a periodos prolongados fuera del agua y hasta profundidades con 0.3 % de irradiancia incluyendo, márgenes de salinidad entre 3 – 100 ‰ (Casas-Valdez *et al.*, 1997; Águila-Ramírez *et al.*, 2005). Al tolerar salinidades bajas puede encontrarse en estuarios y también frecuentemente en zonas donde existen aportes nitrogenados. Son de invasión lenta, no agresivas (incluso como epibiontes), especialmente aprovechando nichos vacíos (Pedroche *et al.*, 2005; Crémades *et al.*, 2006).

Presenta su crecimiento en invierno, alcanza su máxima biomasa a finales de primavera (mayo-junio) y decae en verano-otoño (Aguilar-Rosas y Pacheco, 1986; Hernández *et al.*, 1997; De Casabianca y Posada, 1998; Pacheco-Ruíz *et al.*, 2002).

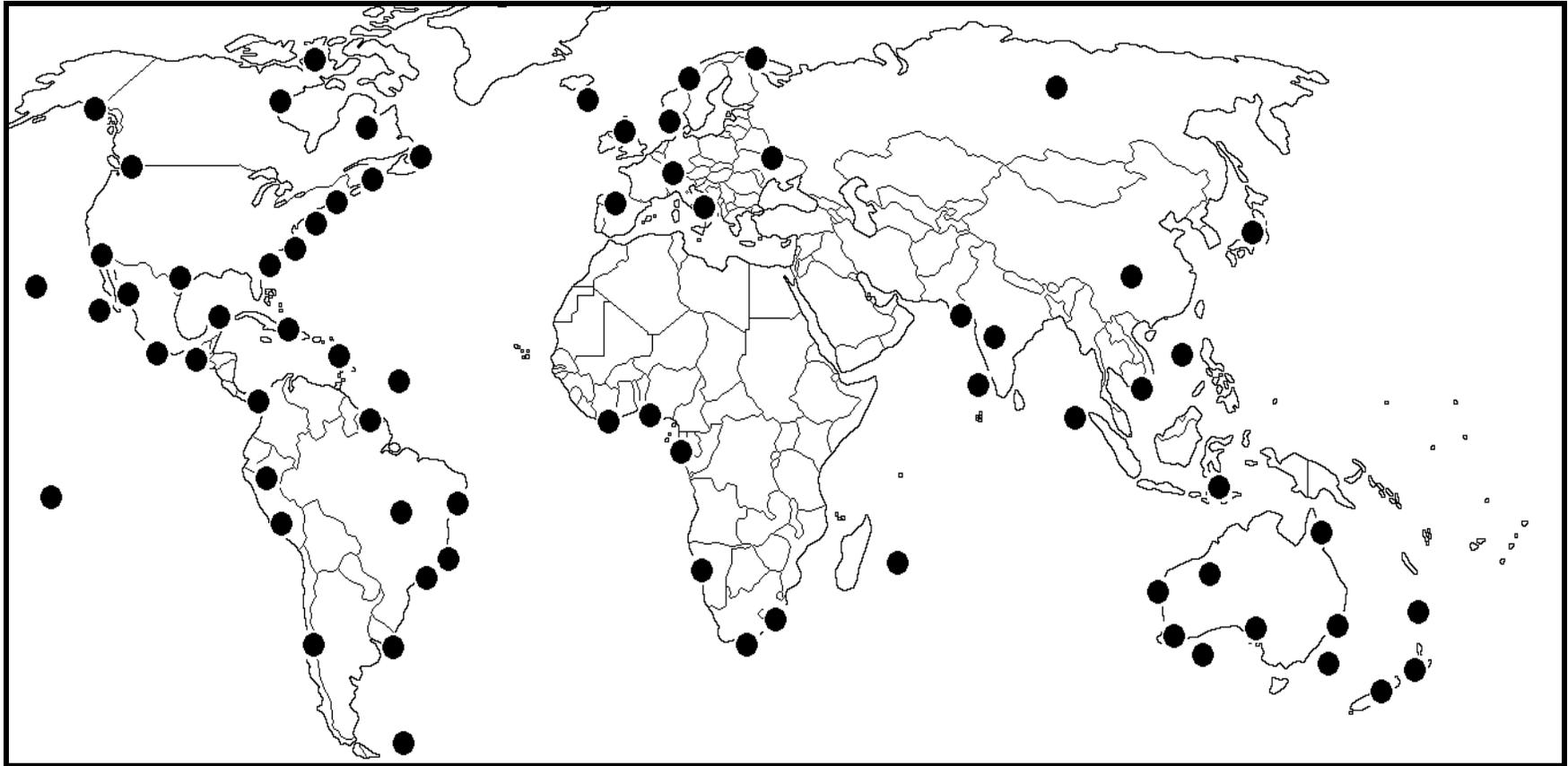


Figura 3. Distribución geográfica de *Ulva lactuca*. <http://www.discoverlife.org/18/08/2015>

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la búsqueda de compuestos con actividad biológica en los organismos marinos, particularmente en las macroalgas, ha interesado a un mayor número de investigadores. Sin embargo, los trabajos de aislamiento de dichas sustancias son escasos y la investigación sobre la posibilidad de que éstos sean utilizados como medicamentos con aplicación específica para el hombre es aislada. Algunas de estas sustancias pueden servir como una alternativa en el tratamiento en contra de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos comerciales (De Lara-Isassi *et al.*, 1989). Dada la importancia de este tipo de investigaciones el aislamiento, purificación y caracterización estructural de nuevos compuestos bioactivos, nos permite replantear estrategias para el aprovechamiento de los nuevos recursos en diversas áreas de interés, como lo son la farmacología, agricultura, acuicultura, industria cosmética, entre otras.

En este sentido, la búsqueda de compuestos activos comienza a dar un giro importante, principalmente teniendo como objetivo la búsqueda de compuestos contra hongos, virus o cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Por lo tanto, la estrategia de búsqueda de metabolitos novedosos ha cambiado lentamente en muchos laboratorios, tomando en cuenta que menos del 1% de las especies bacterianas y menos del 5% de las especies de hongos son conocidas, por lo que es grande el potencial de los organismos como proveedores de compuestos bioactivos útiles (Yung, 1997).

Dada la abundancia en la mayor parte del año y amplia distribución de *Ulva lactuca*, esta especie hace que tenga una posible utilidad como organismo productor de compuestos útiles. De esta alga hay muy poca información reportada acerca de su composición química contra microorganismos, lo cual sería útil desde el punto de vista científico y práctico, pues contribuye añadir una actividad más presente en los compuestos aislados del género *Ulva*. Además ofrecer información complementaria de gran ayuda en la planificación y potencial utilización del recurso, en sus diferentes áreas de uso.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar la actividad antimicrobiana del alga *Ulva lactuca* para determinar su uso y aprovechamiento como fuente de compuestos bioactivos.

4.2. Objetivos específicos.

➤ Obtener diferentes extractos orgánicos (hexánico, diclorometánico, y etanólico) a partir de *Ulva lactuca*.

➤ Fraccionar los extractos obtenidos por medio de métodos cromatográficos.

➤ Determinar la actividad anti-bacteriana de las fracciones obtenidas de *Ulva lactuca* contra bacterias Gram (+) y Gram (-).

➤ Determinar la actividad fúngica de las fracciones obtenidas de *Ulva lactuca* contra (*Candida albicans*).

➤ Identificar los principales grupos funcionales de las fracciones activas mediante espectroscopía de infrarrojo.

5. ÁREA DE ESTUDIO

La Bahía de La Paz, Baja California Sur 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´-24°06´N y los 110°18´-110°40´W (Fajardo-León, 1994). Está limitada al norte por “punta Cabeza de Mechudo” e isla San José, al oeste por el litoral de la planicie costera, al sur por la barrera arenosa “El Mogote” y al este por el archipiélago Espíritu Santo, el canal de San Lorenzo y punta Pichilingue (Figura 4; Velasco-García, 2009).

La Bahía de La Paz, presenta un 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). Su temperatura presenta un pico máximo en verano (agosto) y una mínima en invierno (febrero). La salinidad media se mantiene en 34.5‰. Geológicamente presenta un alternancia de claros arenosos con afloramientos rocosos. Referente a la vegetación de la línea costera está constituida principalmente de manglares 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).

Los vientos dominantes de noviembre a marzo provienen del noroeste y se les llama localmente “Collas”, de abril-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). Las corrientes superficiales que penetran a la Bahía de La Paz son determinadas por un régimen de mareas mixtas semidiurnas y por los vientos dominantes que, durante marzo-junio provienen del sur y en noviembre-febrero, del noroeste (Obeso-Nieblas, 2003; Velasco-García, 2009). El suministro de corrientes oceánicas a la bahía tiene dos aportes principales: por el canal de San Evaristo al norte (61 cm/s, magnitud máxima de corriente) y el canal de San Lorenzo al este (64 cm/s), formando giros ciclónicos que varía en dinamismo a lo largo del año (Velasco-García, 2009).

En la parte terrestre, los litorales de la bahía delimitan a la cuenca hidrológica de La Paz, caracterizada por una secuencia de rocas volcánicas, marcado por valles de abanicos aluviales compuestos por capas de conglomerados y sedimentos poco consolidados. Dichos valles, son formados por escurrimientos efímeros de corta trayectoria con un patrón de drenaje tipo subdentítico (Mackenzie y Masten, 2005; Velasco-García, 2009).

El Malecón, así comúnmente nombrado se encuentra adyacente al canal de mareas que alimenta la ensenada de La Paz. Por la topografía de este canal (10 m, profundidad máxima y 1 km de ancho), las zonas someras se encuentran al descubierto cuando la marea baja, separando a los dos canales de entrada y por el contrario, se impone la dirección del flujo formando un solo canal (Morales y Cabrera, 1982). Esta corriente de salida, toma dirección hacia la Bahía de La Paz al encontrarse con la saliente del muelle fiscal. El sustrato ha sido modificado, en gran parte, con escurrimientos antropogénicos. Presenta fondos de arena, limo y material de arrastre; además se observan unos espigones de roca, construidos con la intención de amortiguar el oleaje (Aguilera-Morales, 1999).

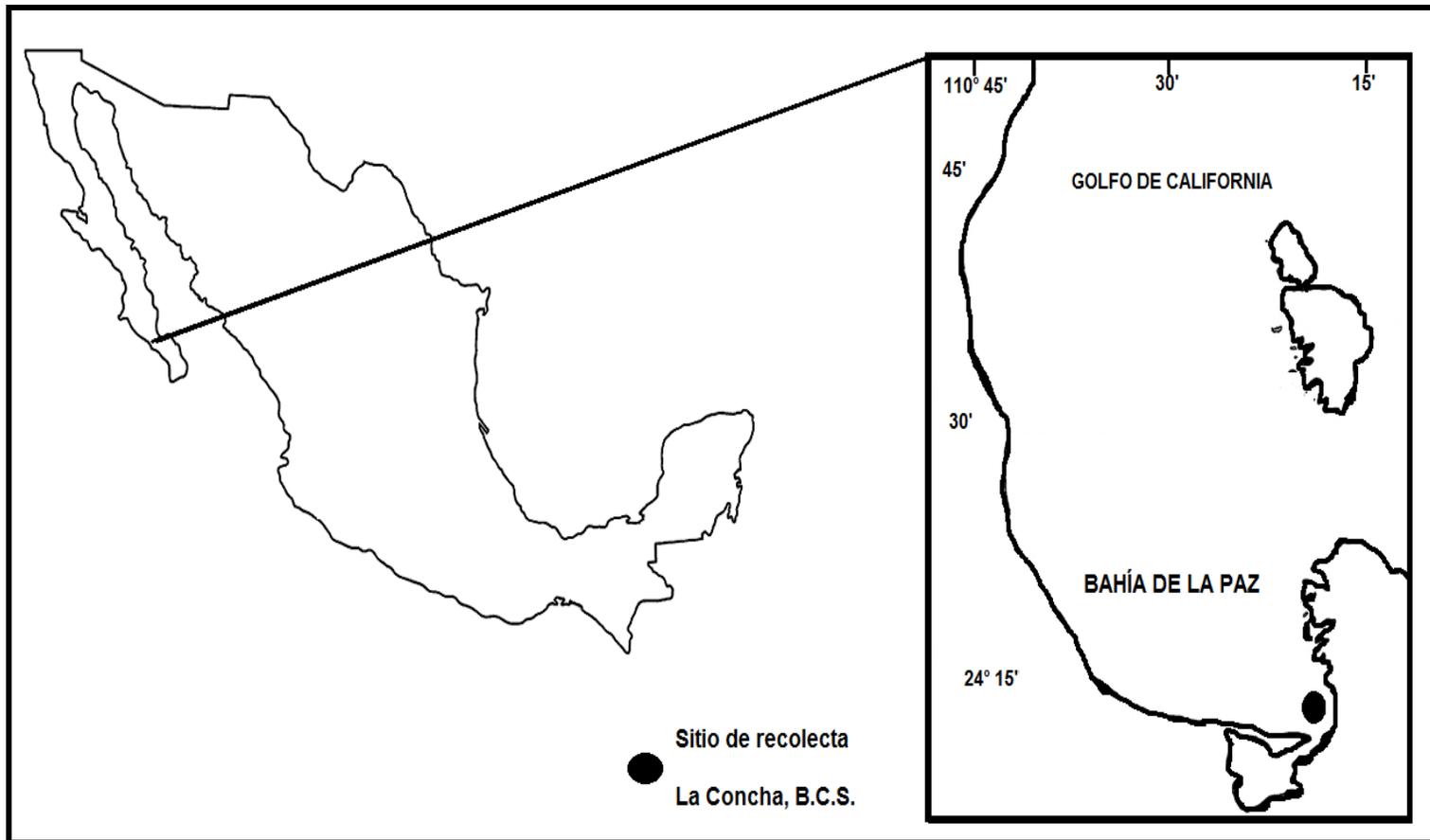


Figura 4. Localización del área de recolecta, en la Bahía de La Paz B.C.S., México

6. MATERIALES Y MÉTODO

6.1. Recolección e identificación taxonómica

La recolección de *U. lactuca* se realizó por medio de buceo libre a una profundidad entre 0.5 y 1 m, en la Bahía de La Paz, específicamente en la playa conocida como “La Concha” (Figura 4). La recolección se realizó durante el mes de febrero del 2011 e inmediatamente transportadas por vía terrestre al Laboratorio de Química de Algas Marinas del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas con sede en la ciudad de La Paz. Una vez, en el laboratorio, las algas se enjuagaron con agua de mar y después agua corriente para eliminar epífitos y cualquier otro material extraño, para después ser secadas al sol en un lapso de 48 h aproximadamente, para finalmente ser molidas manualmente en un molino común.

6.2. Obtención de extractos crudos

La obtención de los extractos crudos (Figura 5) se realizó a partir de 160 g (peso seco), los cuales fueron extraídos sucesivamente con diferentes disolventes en aumento de polaridad. El extracto hexánico se obtuvo a partir de la maceración simple del alga a temperatura ambiente con 0.55 L de hexano, por cada recambio, con un total de 5 recambios. El filtrado obtenido fue concentrado hasta sequedad a presión reducida a 40°C, en un rotavapor. El alga residual se sometió a extracción con diclorometano (CH_2Cl_2), por medio de maceración simple bajo las mismas condiciones que la anterior, sólo que en esta ocasión se utilizó con 0.6 L de CH_2Cl_2 por cada recambio, haciendo un total de 3 recambios. Igualmente, lo resultante fue concentrado hasta sequedad a presión reducida. Finalmente, del alga previamente extraída con hexano y diclorometano se extrajo nuevamente con etanol (EtOH), utilizando 0.6 L por recambio con un total de 7. El filtrado en todos los casos se llevó a sequedad presión reducida en rotavapor, se determinó el peso seco de cada extracto y se calculó el rendimiento porcentual en base seca utilizando la fórmula:

$$R=PE*100/PS$$

Dónde:

R= Rendimiento porcentual

PS= Peso seco del alga

PE= Peso del extracto

Posteriormente, los extractos se analizaron por medio de cromatografía en capa fina, usando como fase estacionaria sílica gel de fase normal, y como eluyentes mezclas en diferentes proporciones de CH₂Cl₂/EtOH, hexano/EtOAc y hexano/CH₂Cl₂/EtOH. Las placas desarrolladas fueron inspeccionadas bajo luz ultravioleta a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm). Posteriormente las placas se revelaron rociándolas con una solución de vainillina al 0.25% en ácido sulfúrico al 10% y calentadas en parrilla eléctrica hasta el desarrollo de color. Finalmente, cada cromatograma se foto-documentó.

6.3. Fraccionamiento del extracto etanólico de *Ulva lactuca*

El extracto etanólico fue por mucho el de mayor rendimiento porcentual, por lo que se eligió para ser fraccionado por medios físicos (Figura 6). Inicialmente, se realizó una extracción sólido-líquido, cuya fase sólida se preparó al disolver completamente 32.8 g de extracto crudo etanólico y mezclarlos con 328 g de sílica gel 60Å (70-230 mesh). El disolvente de la mezcla se dejó evaporar hasta sequedad bajo campana de humos durante 12 h. La fase sólida se extrajo sucesivamente con 0.85 L de hexano/CH₂Cl₂ (1:1), 1.14 L de CH₂Cl₂, 1.38 L de CH₂Cl₂/EtOH (7:3), 0.6 L de EtOH y finalmente 1.0 L de agua destilada. Se recolectaron cinco fracciones, las cuales se concentraron a presión reducida a una temperatura de 40°C. El perfil de fraccionamiento fue analizado por medio de cromatografía de capa fina y con esa base, la fracción eluída con CH₂Cl₂:EtOH (7:3) se seleccionó para ser adicionalmente fraccionada por medio de cromatografía en columna. Para ello, 1.21 g de la fracción se pasó a través de una columna empacada con 60 g de sílica-gel 60Å (230-400 mesh). La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad por pasos iniciando

con CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/EtOH (9:1), (9:2), (7:3), (6:4) y EtOH. Se recolectaron eluatos de 10 mL y se comparó su composición relativa por medio de cromatografía en capa fina para determinar el patrón de fraccionamiento, resultando finalmente 16 fracciones, las cuales fueron concentradas a sequedad y rotuladas como F1, F2, F3...F16. De entre todas ellas, la fracción F14 mostró un cromatograma relativamente simple con un compuesto mayoritario, por lo que se seleccionó para ser adicionalmente purificada. Para ello, se realizó una segunda columna cromatográfica con 50 g de sílica-gel 60Å (230-400 mesh) y 0.11 g de muestra. La elución se realizó con CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/EtOH (9:1), (8:2), (7:3), (1:1) y EtOH. El fraccionamiento fue monitoreado por cromatografía de capa fina, usando CH₂Cl₂/EtOH (7:3) como fase móvil. De acuerdo a lo observado, se unieron por similitud cromatográfica los eluatos 1-30,31-43, 44-55 y 56-78, para finalmente tener cuatro fracciones nombradas como F14-1, F14-2...F14-4.

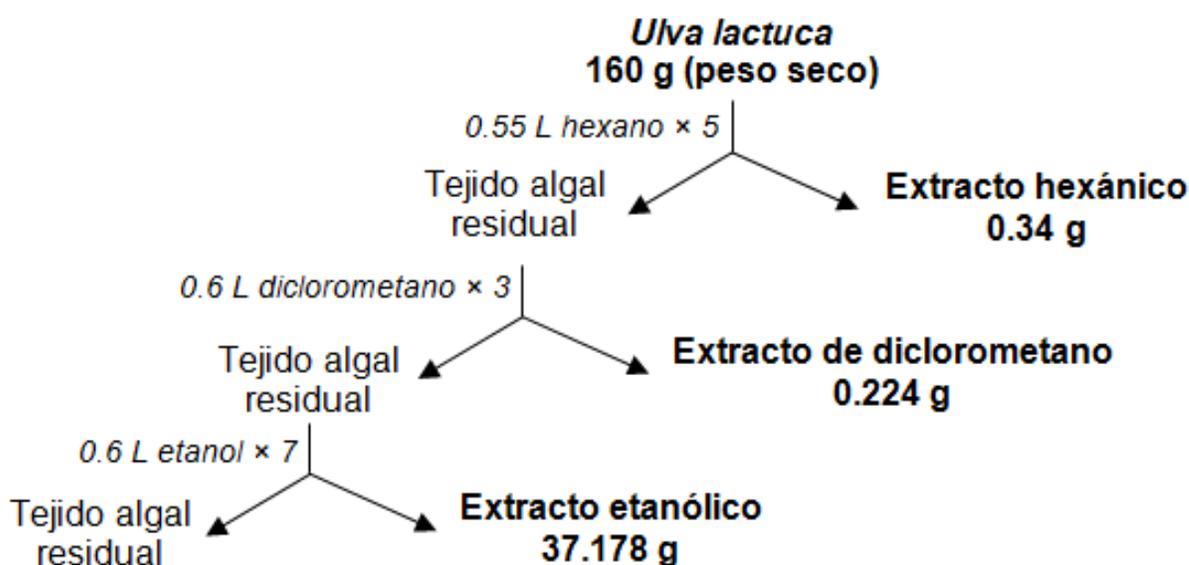


Figura 5. Esquema de obtención de extractos crudos

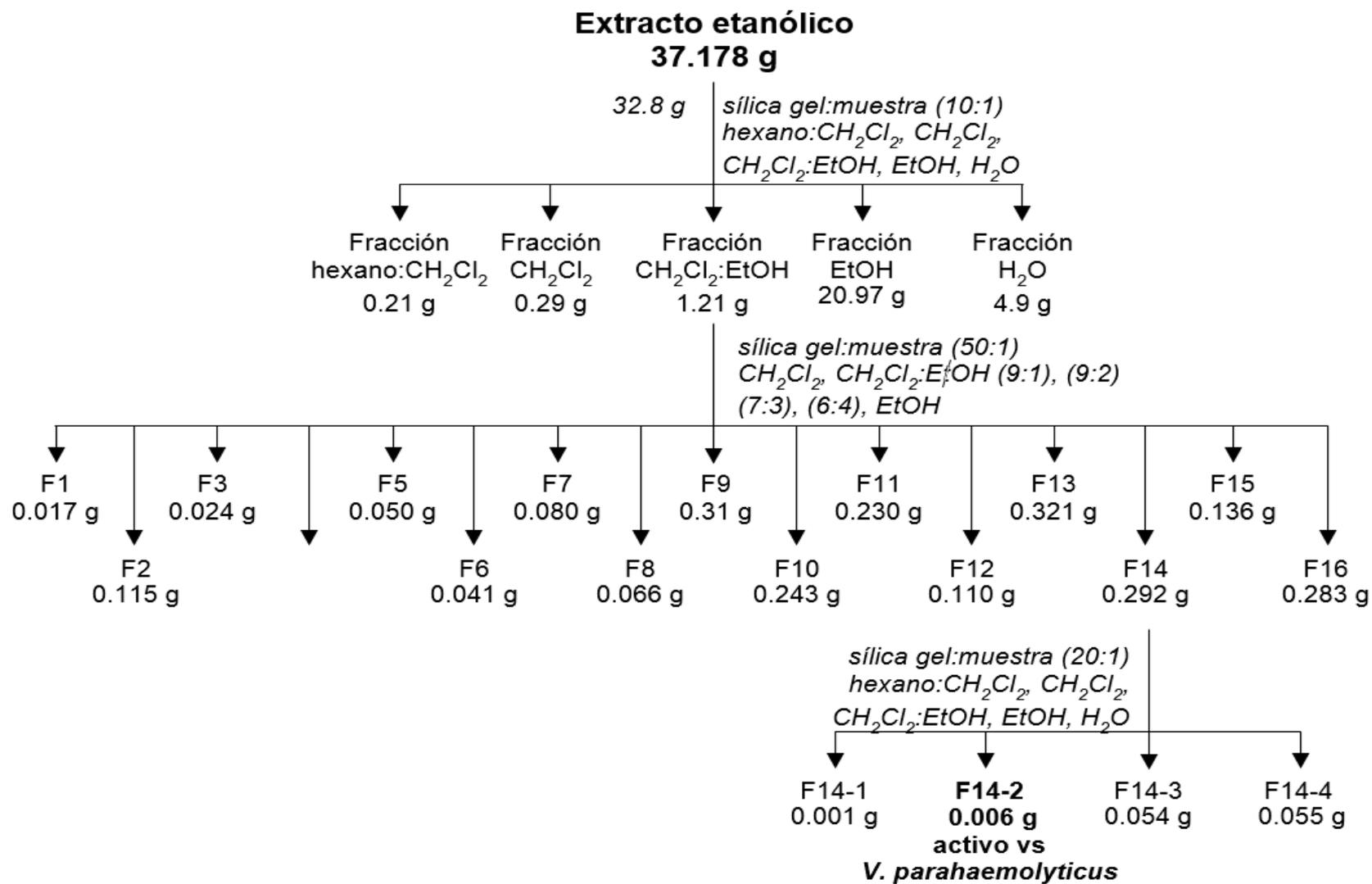


Figura 6. Esquema de fraccionamiento del extracto etanólico de *Ulva lactuca*

6.4. Ensayo de actividad antimicrobiana

Extractos y fracciones resultantes se evaluaron para determinar su actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*, así como contra el hongo levaduriforme *Candida albicans*. La actividad antimicrobiana se evaluó utilizando el método de difusión en agar con disco según Encarnación y Keer (1991). Todos los experimentos fueron realizados por duplicados, y para ello, cada disco de papel filtro estéril (Whatman No. 4, 6 mm de diámetro) se impregnó con una solución madre de cada muestra hasta tener una concentración final igual a 2 mg disco⁻¹. Los discos impregnados se colocaron sobre placas de agar, previamente inoculadas con una suspensión de microorganismos (1×10^8 células mL⁻¹). Se usó agar Mueller-Hinton y agar Mueller-Hinton 2.5% NaCl para *S. aureus* y *Vibrio* spp., respectivamente mientras que *C. albicans* se cultivó sobre agar tripticaseína-soya. Las placas fueron selladas e incubadas a 37°C por 24 h. Al cabo del tiempo de incubación se inspeccionaron las placas en busca de zonas de inhibición alrededor de cada disco de papel. El diámetro del halo de inhibición se midió en milímetros.

6.5. Caracterización de la fracción activa por espectroscopia de infrarrojo

Del total de fracciones, sólo una de ellas mostró actividad antimicrobiana, por lo que se analizó por medio de espectroscopia de infrarrojo para caracterizar su naturaleza químico-estructura. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo modelo Spectrum Two fabricado por Perkin-Elmer. El espectro de infrarrojo de la fracción activa se obtuvo en el rango espectral de 4,000 a 500 ondas cm⁻¹, con una resolución de 4 ondas cm⁻¹.

7. RESULTADOS

Como puede verse en la Tabla II, el extracto etanólico resultó ser el de mayor rendimiento, mientras que el hexano y el diclorometano produjeron rendimientos de extracción comparativamente marginales.

Tabla II. Rendimiento de cada extracto respecto a su peso fresco y extracto obtenido

Extracto	Peso (g)	Rendimiento %
Hexánico	0.3499	0.2186
Diclorometánico	0.2249	0.1405
Etanólico	37.178	23.23

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas de los extractos obtenidos, en donde usando EtOH como eluyente, se observa una mejor separación de manchas en diferentes polaridades.

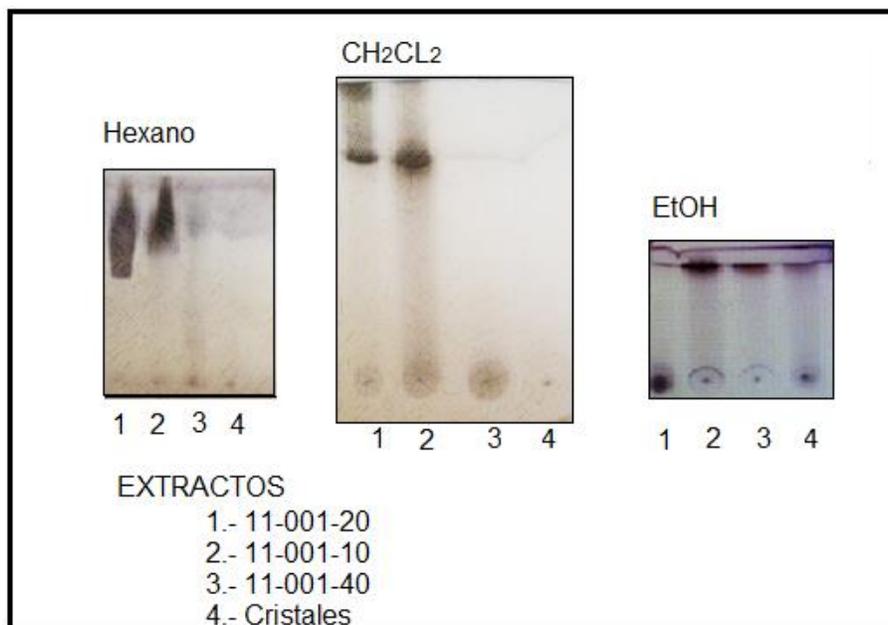


Figura 7. Cromatografía de capa fina de los extractos

En cuanto al fraccionamiento del extracto etanólico, solamente la sub-fracción **F14-2** (Figura 6) mostró actividad inhibitoria moderada frente a *V. parahaemolyticus* (Figura 8, halo de inhibición de 7 mm), siendo inactiva frente al resto de los organismos de prueba. Ninguna de las fracciones y sub-fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de *U. lactuca* mostró efecto inhibitorio frente a *S. aureus*, *E. coli*, *V. harveyi* y *C. albicans*.

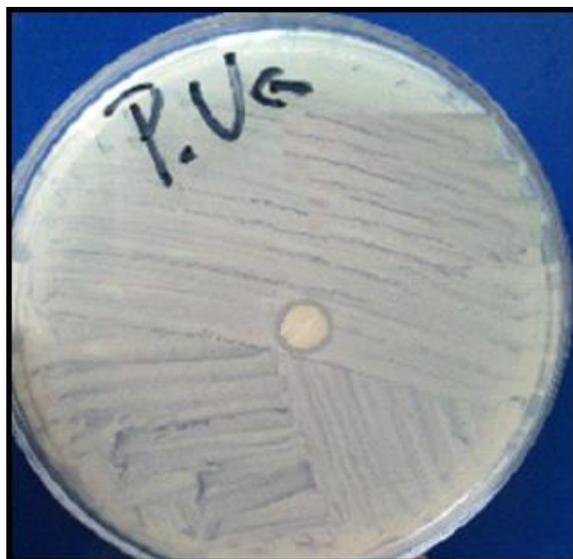


Figura 8. Halo de inhibición frente a *Vibrio parahaemolyticus* presentado por la sub-fracción **F14-2** aislada a partir del extracto etanólico de *Ulva lactuca*.

La fracción activa se aisló como un aceite incoloro a temperatura ambiente [6.0 mg; sólido ceroso bajo refrigeración; TLC (Si gel GF₂₅₄, 15 μ m, CH₂Cl₂) R_f=0.48], cuyo espectro de infrarrojo (Figura 9) mostró bandas de absorción [IR ν_{max} (HATR): 3340, 2920, 2850, 1715, 1650, 1510, 1450, 1410, 1377, 1235, 1050, 1030, 830, 800, 720 ondas cm⁻¹] consistente con las de un compuesto oxigenado de naturaleza no-aromática. Al comparar los datos espectrales y el perfil de actividad biológica con aquellos compuestos aislados previamente a partir de algas del género *Ulva*, se encontró buena evidencia para suponer que la fracción activa contra *V. parahaemolyticus* aislada a partir de *U. lactuca* sea de naturaleza terpenoidal, similar a la del labdano; un diterpeno bicíclico con una amplia variedad de productos naturales derivados a partir de él, los cuales son genéricamente referidos como “labdanos”.

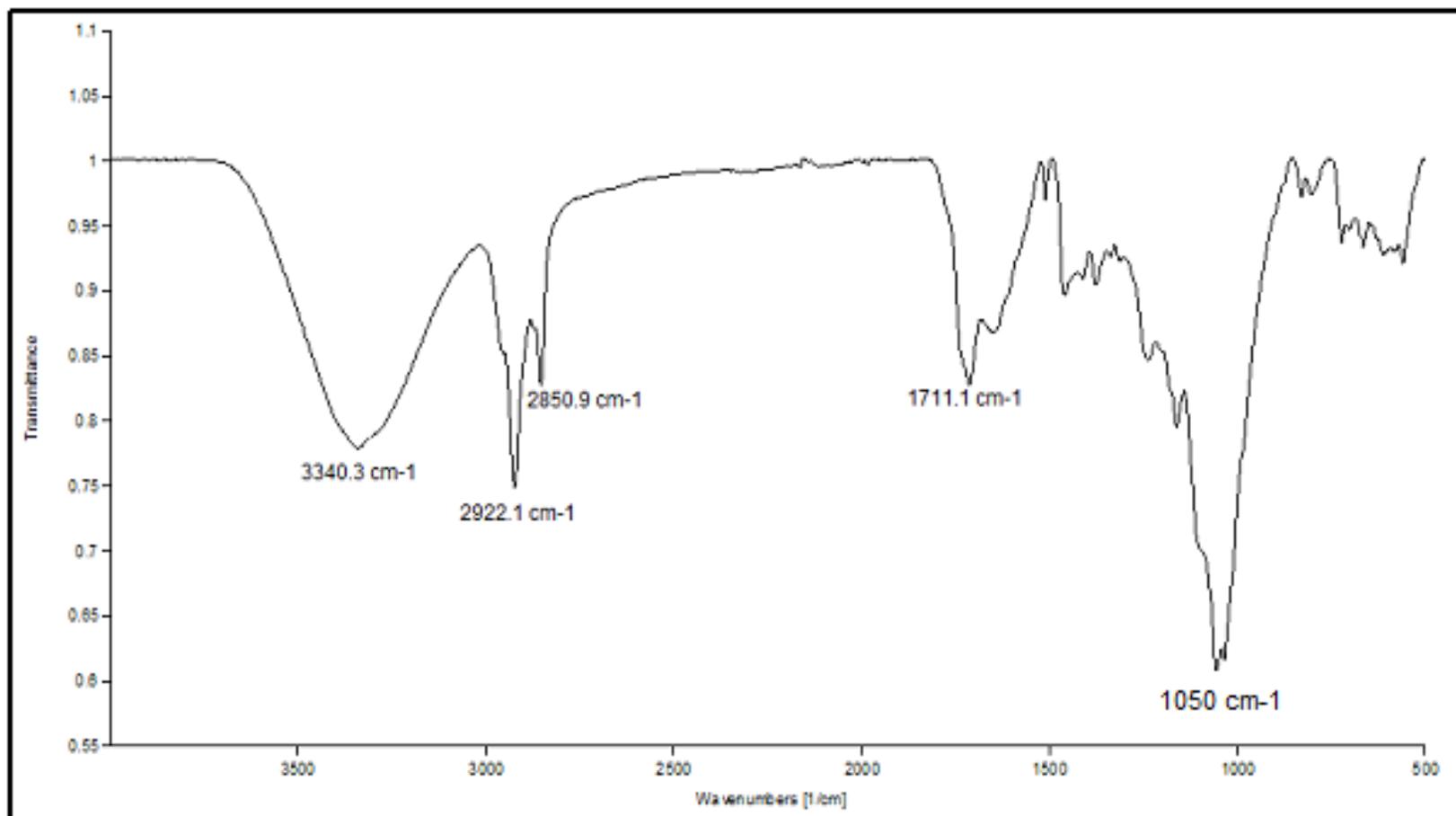


Figura 9. Espectro de absorción de infrarrojo de la sub-fracción **F14-2**.

8. DISCUSIÓN

8.1. Rendimiento de los extractos

En cuanto al rendimiento de los extractos orgánicos (Tabla II) y el análisis preliminar mediante cromatografía de capa fina (Figura 7), en el presente trabajo se reporta un mayor rendimiento en el extracto etanólico, de igual manera este extracto es el de mayor perfil de compuestos observados, por lo que se puede decir que los metabolitos presentes *U. lactuca* son mayormente solubles en dicho disolvente, que se caracteriza por su polaridad media-alta (Sreenivasa-Roa y Parekh, 1981; Karl-Gunnar y Srivastava, 1987, Vidyavathi y Sridhar, 1991). De acuerdo a Shizuri *et al.* (1984) el método de extracción por maceración simple, el cual fue utilizado para la obtención de los extractos orgánicos en el presente estudio, es uno de los más recomendados debido a su facilidad y rapidez. En cuanto a actividad biológica se refiere, este método de extracción es casi siempre el de elegido ya que permite aprovechar la mayor cantidad del alga; coincidiendo con la mayoría de los trabajos publicados sobre organismos marinos, en donde los autores utilizan maceraciones de material fresco y extracciones a temperatura ambiente.

8.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Dentro de las actividades biológicas más comúnmente reportadas en el caso de los productos de origen natural, está la actividad antimicrobiana. Una de las razones principales para ello es la relativa rapidez y facilidad de los métodos de bioensayo, frente a otros ensayos de actividad biológica (Márquez *et al.*, 2004). En este contexto se ha evaluado a *U. lactuca* como agente antimicrobiano frente a: *S. aureus*, *E. coli*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* y *C. albicans* donde se observó inhibición frente *Vibrio parahaemolyticus* (Figura 8).

Entre los reportes bibliográficos se menciona un estudio de prospección biológica de un grupo de algas marinas recolectadas en las aguas costeras de Oaxaca, México (De Lara-Isassi *et al.*, 1996); dicho estudio indicó que el extracto etanólico *U. lactuca* resultó inactivo frente *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E.*

coli, *Enterobacter aerogenes* y *Shygella sonnei*. Resultados similares se reportaron (De Lara-Isassi *et al.*, 1999) en *U. lactuca* recolectada en agua del estado de Veracruz (De Lara-Isassi *et al.*, 1999). En contraste, Águila-Ramírez *et al.* (2012) estudiaron seis especies de algas comunes del Golfo de California entre las cuales el extracto etanólico de *U. lactuca* mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*. Por su parte, Abd El-Bakú *et al.* (2008) sugieren que la actividad antibacteriana de *U. lactuca* está relacionada directamente con el contenido lipófilo de los extractos y en particular con la presencia de esteroides y altos niveles de ácido acrílico.

Troncoso *et al.* (2015) reportan que los extractos obtenidos con diclorometano y etanol a partir de una mezcla de *Ulva rigida* y *U. lactuca* (en proporciones no determinadas) mostraron una fuerte actividad inhibitoria frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* y *E. coli*. En ambos extractos se detectó la presencia de fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol), un diterpeno acíclico monohidroxilado reconocido por su propiedades antibacterianas y que además se le ha atribuido propiedades antimicóticas y antivirales (Plaza *et al.*, 2010; Jeyadevi *et al.*, 2012; Santoyo *et al.*, 2012). Similarmente, en el extracto crudo obtenido con acetato de etilo se observó la presencia, de 6-metil-2-fenilquinolina, descrita también como molécula antimicrobiana por Meléndez *et al.* (2008). Además, en extractos de acetato de etilo y diclorometano obtenidos a partir de un complejo *Ulva/M. pyrifera* se aisló el neofitadieno como compuesto antimicrobiano y antiviral (Jeyadevi *et al.*, 2012; Santoyo *et al.*, 2012).

8.3. Caracterización de compuestos

El espectro de infrarrojo de la fracción **F14-2** mostró una banda de absorción ancha centrada en 3340 ondas cm^{-1} característica del estiramiento asimétrico del enlace O—H que de acuerdo con Chakraborty *et al.* (2010) denota la presencia de un hidroxilo secundario. Adicionalmente, se observan bandas a 2920 y 2850 ondas cm^{-1} debidas al estiramiento de enlaces C—H de metilos (CH_3 —) y metilenos (— CH_2 —). La ausencia de bandas de absorción a frecuencias ligeramente mayores de 3000 ondas cm^{-1} así como la ausencia de bandas indicativas de sobretonos en la región

de 2200 ondas cm^{-1} denotan la ausencia de anillos aromáticos, apoyando la hipótesis de un compuesto de naturaleza alifática. Con estas primeras observaciones se comparó la información espectral de **F14-2** contra aquella reportada para metabolitos previamente aislados a partir de algas del género *Ulva*, tales como: diterpenos acíclicos derivados del fitol, ácidos grasos, esteroides, sesquiterpenos derivados del guaiano y diterpenos bicíclicos derivados del labdano. La Tabla III muestra una comparación de bandas de absorción de infrarrojo de la sub-fracción activa **F14-2** aislada a partir de *U. lactuca* en el presente estudio y diterpenos labdanos aislados a partir de *Ulva fasciata* (Chakraborty *et al.*, 2010), en donde son evidentes las similitudes en términos estructurales. Adicionalmente, se consideró que tanto los derivados del labdano obtenidos a partir de *U. fasciata* se aislaron como aceites incoloros similar a la **F14-2** y en ambos casos se observó actividad inhibitoria contra *V. parahaemolyticus*. Teniendo en cuenta las similitudes observadas por espectroscopia de infrarrojo, el estado físico de los compuestos aislados y su característico perfil de actividad antimicrobiana, se llegó a la conclusión de que la fracción **F14-2** de *U. lactuca* es estructuralmente un derivado oxigenado del labdano que recuerda aquellos reportados a partir de *U. fasciata* (Chakraborty *et al.*, 2010)

En cuanto al bajo número de fracciones bioactivas (sólo una del total) encontradas en el presente estudio a partir de *U. lactuca* podría explicarse con base en las interrelaciones existentes en cada medio. Es decir, en la zona de recolecta predominan planicies arenosas, con algunos manchones de limos y rocas en donde casi no se tiene presencia de organismos ya que es una área considerada intermareal, marcadamente somera y de baja pendiente (Gutiérrez, 2013). De igual manera dicha diferencia puede ser explicada por la metodología de extracción empleada tal como lo mencionan Kandhasamy y Arunachalam (2008), Lavanya y Veerappan (2011), diferencias en factores bióticos y abióticos propios de la zona de muestreo, así como también el estado fisiológico del organismo (Figueiredo *et al.*, 2008, Adaikalaraj *et al.*, 2012). Igualmente Pratt *et al.*, 1951; Coumbat *et al.*, 1981 hacen referencia a los factores que pueden influir de manera importante en la

ausencia, presencia e intensidad de la actividad de metabolitos responsables del poder bactericida de algas, entre los más importantes están la variación estacional, variación geográfica (Moreau *et al.*, 1984, Almodovar, 1964) e incluso el estado reproductivo del alga (Moreau *et al.*, 1984; Clark y Hufford, 1993).

Tabla III. Comparación de bandas de absorción de IR (ondas cm^{-1}) de la sub-fracción F14-2 aislada a partir de *Ulva lactuca* en el presente estudio y los compuestos reportados de *Ulva fasciata* en: Chakraborty *et al.* (2010) Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. Food Chemistry 119: 1399-1408.

Sub-fracción F14-2	Labda-14-en-8-ol	Labda-14-en-3a,8a-diol	Labda-14-en-8a,9a-diol	Labda-14-en-8a,hidroxi-3-ona	ent-Labda-13(16),14-dien-3-ona	ent-Labda-13(16),14-dien	ent-Labda-13(16),14-dien-3a-ol
—	—	—	3550 (OH)	3562 (OH)	3510	—	3550
—	—	—	—	—	—	—	3459 (OH)
—	3415 (OH)	3450 (OH)	—	—	3431 (OH)	—	3446
3340	—	3300 (st.asim. OH sec.)	3329 (st.asim. OH sec.)	3300	—	3341	—
2920	2908	2957 (st.metil CH)	—	—	2953	2920 (st. metil CH)	2915
—	—	—	2896 (st.metil CH)	—	—	—	—
2850	2846 (metil C-H)	2830 (st.metil CH)	—	—	2850 (st.metil CH)	2849	2850 (st.metil CH)
—	1740	—	—	—	1750	1720	—
1715	—	—	—	1715	1718	1710	—
—	—	—	—	1705	1705	—	—
1650	1670	1660	—	1682	—	—	1651
—	1615	—	—	—	—	—	1629
1510	—	1530 (C-O)	1529	—	—	—	—
1450	1452	—	—	—	1450	1452	1463
1410	—	—	—	—	—	—	—
1377	1389	—	—	—	1352	1369	—
—	1275	1260 (C-O)	1278 (C-O)	1265 (C-O)	1263	—	—
1235	—	1253	—	—	—	—	1253
1050	—	—	—	—	1050	—	—
1030	1026	—	—	—	—	—	1025
—	940	920 (C=C)	—	—	920	993	—
—	—	—	—	—	—	885	—
830	—	—	—	—	—	—	—
800	—	—	—	—	—	—	—
720	—	—	—	—	—	739	—

9. CONCLUSIONES

➤ *Ulva lactuca*, especie considerada cosmopolita de alta resistencia y tolerancia a cambios drásticos en su entorno es fuente de compuestos bioactivos con inhibición frente a la bacteria marina *Vibrio parahaemolyticus*.

➤ El análisis estructural de la fracción activa aislada en el presente estudio sugiere fuertemente que la actividad observada contra *V. parahaemolyticus* es debida a la presencia de diterpenos oxigenados del tipo labdano.

➤ Las bacterias del género *Vibrio* son de importancia en sanidad acuícola debido a que causan enfermedades en las etapas larvarias durante el cultivo de camarón, por lo que los hallazgos encontrados en este estudio son de potencial aplicación en el control de bacterias marinas patógenas.

➤ La presencia o ausencia de compuestos bioactivos, está estrechamente relacionada con las interrelaciones del organismo y el medio, diferencias en factores bióticos y abióticos propios de la zona, así como también el estado fisiológico del organismo.

➤ Las clorofitas son fuente prometedora de compuestos bioactivos con gran potencial farmacológico por lo que se recomienda realizar más estudios de estas algas sobre actividades biológicas.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbott I.A y G.J. Hollenberg. 1976. Marine Algae of California. Stanford University Press, Stanford, California. 827pp.
- Abd El-Baky, H.H., F.K. El Baz y G.S. El-Baroty. 2008. Evaluation of marine algae *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. *American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 3: 434-444
- Abdel A.F. y M. Edress. 1973. Seasonal Changes in the constituents of *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*. Vol 12. 481-485pp. *En*: Acylated sterylglucosides in some marine algae. *Phytochemistry*. 22(2).
- Adaikalaraj, G., M. Johnson, D.P. Raja., N. Janakiraman y A. Badu. 2012. Antibacterial potential of selected red seaweed from Manapad coastal areas, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. *Asia Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(2): 1077-1080 p.
- Águila-Ramírez R.N., M. Casas-Valdez, C.J. Hernández-Guerrero, y A. Marín-Álvarez. 2005. Biomasa de *Ulva* spp. (Chlorophyta) en tres localidades del malecón de La Paz, BCS, México. *Biología Marina y Oceanografía*. 40(1): 55-61.
- Águila-Ramírez R.N., A. Arenas-González, C.J. Hernández-Guerrero, B. González-Acosta, J.M. Borges-Souza, B. Véron, J. Pope y C. Hellio. 2012. Antimicrobial and antifouling activities achieved by extracts of seaweeds from Gulf of California, Mexico. *Hidrobiológica* 22(1): 8-15.
- Aguilar-Rosas, L.E y L. Pacheco-Ruíz. 1986. Variaciones estacionales de las algas verdes (Chlorophyta) de la costa Noroccidental de la Península de Baja California. *Ciencias Marinas* 12(1): 73-78.
- Aguilera-Morales B.E. 1999. Evaluación química, microbiológica y toxicológica de *Enteromorpha* spp., como fuente potencial de alimento. Tesis de Maestría. CICIMAR, IPN. 100 pp.
- Almodovar L.R. 1964. Ecological aspects of some antibiotic algae in Puerto Rico. *Botanica Marina* 6(1/2):143-146 Atlas. *En*: Brown A.E., K.W. Dobra y L.I. Miller. 1988. *Experimental microbiology*.

- Bhakuni D. y M. Silva. 1974. Biodynamic substances from marine flora. *Botanica Marina* 27: 40-51.
- Bhakuni D.S y D.S. Rawat. 2005. Bioactive marine natural products. Anamaya Publishers *Microbiológica* India. 1: (2) 396 pp.
- Blunt J.W., B.R. Copp, H.G. Munro, P.T. Northcote y M.R. Prinsep. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24: 31-86.
- Blunt J.W., B.R. Copp, H.G. Munro, P.T. Northcote y M.R. Prinsep. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23:26-78. *Bot. Mar.* 21(5): 323-326
- Boraso de Zaixso, A. 2004. Chlorophyta marinas de la Argentina. *Historia Natural, Buenos Aires, Series 2* (3): 95-119.
- Brock T.D. y M.T. Madigan. 1993. Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. México. 956 p.
- Casas-Valdez M.M., M.B. Cruz-Ayala y G. Elizabeth-López. 1997. Algas bentónicas más abundantes en la bahía de La Paz, BCS. La bahía de La Paz, investigación y conservación, UABCS-CICIMAR. 10 pp.
- Castro-González, M.I., F.R. Pérez-Gil, S. Pérez-Estrella y S. Carrillo-Domínguez. 1996. Composición química del alga verde *Ulva lactuca*. *Ciencias Marinas*. México, DF. 22 (2): 205-213.
- Clark A.M., y D.H. Hufford. 1993. Discovery and development of novel prototype antibiotics for opportunistic infections related to acquired immunodeficiency syndrome. *En: Kinghom A.D., F.M. Balandrin. Ed. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C. pp 282-286:*
- Combaut G., I. Codomer y J, Teste. 1981. Seasonal chemical evolution of the alga *Cystoseria elegans*. *Phytochemistry* 20:2036-2037.
- Cremades U.J., O. Freire G, y C.G. Peteiro. 2006. Biología, distribución e integración de algas alóctonas en las comunidades bentónicas de las costas de Galicia (España). *Anales del Jardín Botánico de Madrid, España* 63(2): 169-187.
- Dave M.J. y R. Parkh. 1978. Aminoacids of the green algae *Ulva*. Protein hidrolates. *Botánica Marina*. 21:323-326.

- Darias J. 2010. El género *Laurencia* como referente en el desarrollo de la química de productos naturales marinos. Instituto de Productos Naturales y Agrobiología. Islas Canarias, España.
- De Casabianca M.L y F. Posada. 1998. Effect of environmental parameters on the growth of *Ulva rigida* (Thau Lagoon, France). *Botanica Marina* 41: 157-165.
- De la Calle F. 2007. Fármacos de origen marino. *Treballs de la SCB*. 58: 141-155.
- De Lara-Isassi G., S. Álvarez-Hernández, C. Lozano-Ramírez y N. Hernández-Soto. 1999. Nuevas adiciones al conocimiento de la actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiológica* 9(2):159-169.
- De Lara-Isassi, G., A.A. Sobrino-Figueroa, C. Lozano-Ramírez, M.E. Ponce-Marquez y K. Dreckmann-Stay.1989. Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de las Costas de Michoacán, México. *Bol. Ins. Océano. Venezuela, Univ. Oriente* 28: 99-104.
- De Lara-Isassi, G., S. Álvarez-Hernández, C. Lozano-Ramírez.1996. Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Hidrobiológica, Rev. Biol. Trop.*, 44(2):895-898.
- Des Abbayes H., M. Chadefaud, J. Feldmann, Y. De Ferré, H. Gausсен, P.P. Grassé y A.R. Prévot. 1989. Botánica; vegetales inferiores. Reverte, Barcelona España. 1:768 pp.
- Duperon R., M. Thiersault y P. Duperon. 1983. Occurrence of Sterylglycosides and Encarnación En: R.D. y G.S. Keer. 1991. Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal Ethnopharmacology* 31: 181-192.
- 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.
- Evangelista-Martínez Z. y A. Moreno-Enríquez. 2007. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Biomédicas* 11(3): 50p.

- Fajardo-León, M.D.C. 1994. Evaluación de biomasa y determinación de especies de los mantos del género *Sargassum* spp. AGARDH.1821 (Fucalaeas, Phaeophyta) en la Bahía de La Paz, B.C.S., México, en primavera de 1988. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México.78p.
- Faulkner D.J. 1984. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Journal of Natural Products* 1: 251-280.
- Faulkner D.J. 1991. Marine natural products. *Journal Natural Products. Reports* 57(4): 1131-1137.
- Faulkner D.J. 1994: Marine natural products. *Not. Prod. Rep.* 11: 355-394.
- Faulkner D.J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod Rep.*19: 1-48.
- Fenical W. 1978. Diterpenoids. 174-245 pp. *En: P.J. Schever (Comps). Marine Natural products-Chemical and Biological Perspectives 2.* Academic Press, Nueva York.
- Figueiredo A.C., J.G. Barroso, L.G. Pedro, J.J.C. Scheffer. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23(4): 213-226. Fundamentals and applications. 2° Ed. Mcmillan Publishing Company. New York. 618p.
- Fusetani N. 2000. Drugs from the sea. Basel Karger. 158p. gorgonians: a preliminary study. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 273: 121-130 green alga *Ulva fasciata*. *Tetrahedron Letters.* 33(12): 1641-1644.
- Gutiérrez H.F.J. 2013. *Ulva lactuca* Linnaeus, como bioindicadora de la calidad sanitaria en la ensenada de La Paz y áreas adyacentes, B.C.S. Tesis de Licenciatura. UABCS. 66 p.
- Harada, H., T. Noro, Y. Kamey. 1997. "Selective antitumor activity from marine algae from Japan coasts". *Biol. Pharm. Bull.* 20 (5): 541-6.
- Hari S.G., S. Mithiesh y S.B. Dewan, 1992. An antiviral sphingosine derivative from the *En: Hashimoto, Y. 1976. Marine toxins and other bioactive marine metabolites.* Japon: Japan Scientific Societies Press.466pp.
- Hay M.E., J.E. Duffy y W. Fenical 1988. Seaweed chemical defenses: among-compound and amongherbivore variance, *Proc. 6th Int. Coral Reef Sym,* 3(43).

- Hay M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 200:103-134.
- Hay M.E. y P.D. Steinberg. 1992: The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. *En: Rosenthal J. and M. Berenbaum Ed. Herbivores: Their interaction with Secondary Metabolites, Evolutionary and Ecological Processes. Academic Press, San Diego: 371-413.*
- Hay M.E. y W. Fenical. 1992. Chemical mediation of seaweed. Herbivore interactions, *Plant Animal Interactions in Marine Benthos (D.M. John) Systematic Ass. (36):319-333.*
- Heinz A.H. 1979. Marine Algae and their products and constituents in Pharmacy. Marine algal Pharmaceutical Science. *En: Heinz A.H., L. Tore y T.L. Yukin Ed., Walter de Gruyter, Berlin, New York. N.Y: pp 25-34*
- Hernández I., G. Peralta, J. Pérez-Lloréns, J. Vergara y X. Niell. 1997. Biomass and dynamics of growth of *Ulva* species in Palmones River Estuary. *Journal of Phycology* 33: 764-772.
- Huntley M., P. Sykes, S. Rohan y V. Martin. 1986: Chemically- mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus purvus*: mechanism, occurrence and significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 105-120.
- Jeyadevi R., T. Sivasudha, A. Llavarasi y N. Thajuddin. 2012. Chemical constituents and antimicrobial activity of Indian green leafy vegetable *Cardiospermum halicacabum*. *Indian Journal of Microbiology*, 53: 208-213
- Chakraborty K., A.P. Lipton, R.P. Raj, K.K. Vijayan. 2010. Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southeastern coast of the Indian Peninsula. *European journal of Medicinal Chemistry. India.* 45:2237-2244.
- Chakraborty K., A.P. Lipton, R. Paulraj, D.C. Rekha. 2010. Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. *Food Chemistry. India.* 119: 1399-1408

- Kandhasamy M. y K.D. Arunachalam. 2008. Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweed of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology* 7(12): 1958-1961.
- Karl-Gunnar R. y L. M. Srivastava. 1987. Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. *Hydrobiologia* 152: 471-475
- Karp G. 1998. Biología celular y molecular. McGraw-Hill Interamericana Editores. México.
- Kumar R.J. y Xu. Zi-rong. 2004. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs* 2: 123-146.
- Lavanya R. y N. Veerappan. 2011. Antibacterial potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of Southeast coast of India. *Advances in Biological Research* 5(1): 38-44.
- Lee R.E. 2008. Phycology. Cambridge University press. 547 pp.
- Luján-Flores M y O. León-Córdoba. 2008 Biodiversidad algal de las costas patagónicas argentinas; estudio integral químico-biofarmacológico destinado a revalorizar los recursos a través de un potencial aprovechamiento industrial. Universidad Nacional de Patagonia San Juan Bosco. Subproyecto BB-34. Enlace: www.unp.edu.ar.
- Mackenzie L.D. y S.J. Masten. 2005. Ingeniería y ciencias ambientales. Mc.Graw-Hill/interamericana editores. 750 pp.
- Márquez M.D., J.E. Galeano, M.A. Martínez. 2004. Productos naturales con actividad antimicrobiana, Parte II. VITAE; Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia 111: 35-41.
- Maschek J., y B. Baker. 2008. Algal chemical ecology. Alemania: Springer.
- Mayer A. y M.T. Hamann. 2004. Marine Pharmacology in 2000: Marine Compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis and antiviral activities; affecting the Cardiovascular, Immune and Nervous Systems and other miscellaneous mechanism of action. *Mar. Biotechnology* 6: 37-52.
- Mayer A. y M.T. Hamann. 2005. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic,

- antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action Review *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 140: 265 – 286.
- McClintock J.B. & Baker B.J. 2001. *Marine chemical ecology*. CRC Press LLC. 610pp.
- McClintock J.B. 1994. An Overview of the Chemical Ecology of Antarctic Marine Invertebrates. The Ireland Lecture 1993. University of Alabama, Birmingham, 24 pp.
- McConnell O.J., P.A. Hughes, N.M. Targett y J. Daley 1982. Effects of secondary metabolites on feeding by the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J. Chem. Ecol.* 8:1427
- Meléndez C.M., V.V. Kouznetsov, M.A. Sortino, S.L. Álvarez y S.A. Zacchino. 2008. In vitro antifungal activity of polyfunctionalized 2-(hetero) arylquinolines prepared through imino Diels-Alder reactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 7908-7920
- Morales G.E.R. y H.R. Cabrera-Muro. 1982. Aplicación de un modelo numérico unidimensional a la ensenada de La Paz, BCS. *Ciencias Marinas* 8(2): 69-89.
- Moreau J., D. Pesando y B. Caram. 1984. Antifungal and antibacterial screening of Dictyotales from the French Mediterranean coast. *Hydrobiologia* 116(117): 521-524.
- Munro M.H.G. 1987. Marine natural products. Academic Pres Inc. pp.679
- Munro M.H.G y J.W. Blunt. 2005. Marinlit, a marine chemical literatura database, versión 12.5. Marine Chemistry Group, University of Canterbury, Christchurch, NZ.
- Newman D.J., G.M. Cragg y K.M. Snader. 2000. The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery. *Natural Products Reports*. 17: 215-234.
- Norris, J.N. 2010. Marine algae of the Northern Gulf of California: Chlorophyta and Phaeophyceae. *Smithsonian Contributions to Botany* 94(1-10):1-276.

- Obeso-Nieblas M. 2003. Variabilidad espacio-temporal de las condiciones oceanográficas de la Bahía de la Paz, BCS. Tesis de doctorado. CICIMAR, IPN, México. 337 pp.
- Olesen P.E., A. Marezki y L.A. Almondovar. 1964. An investigation of antimicrobial substances from marine algae. *Botanica Marina*. 6(3-4):224-231.
- Oranday C.M.A. 1988. Componentes químicos de algas del estado de Tamaulipas y sus aplicaciones farmacológicas. Facultad de Medicina. UANL. Tesis de Doctorado. 114p
- Ortiz V.J. 2011. Monografía. Composición Nutricional y Funcional de las Algas Clorofíceas Chilenas: *Codium fragile* y *Ulva lactuca*. Universidad de Chile. 25 pp.
- Ospina A. 1997. Actividad antimicótica de dos especies de algas del Pacífico colombiano. (Tesis) Universidad del Valle, Colombia. 5-12,18-40p.
- Pacheco-Ruiz I., J.A Zertuche-González, A. Chee-Barragán y E. Arroyo-Ortega. 2002. Biomass and potential commercial utilization of *Ulva lactuca* (Chlorophyta, Ulvaceae) beds along the North West coast of the Gulf of California. *Phycologia* 41(2): 199-201.
- Paerl H.W. 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnol. Oceanografic*. 33: 823-847.
- Park M., W. Fenical, y M.E. Hay. 1992. Debromoisocymobarbatol, a new chromanol feeding deterrent from the marine alga *Cymopolia barbata*, *Phytochemistry*, 31:4115
- Paul V.J. 1988. *En*: Daphne G. (Ed.), Marine chemical ecology and natural products research. USA: memories of the California Academy of Sciences
- Paul V.J. 1992: Ecological Roles of Marine Natural Products. Comstock Publishing Associates, Ithaca. 245 pp.
- Pawlik J.R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* 93: 1911-1922.
- Pedroche F.F., P.C. Silva, L.E. Aguilar-Rosas, K.M. Dreckmann y R. Aguilar-Rosas. 2005. Catálogo de Algas Marinas Bentónicas del Pacífico de México, Chlorophycota. Editorial: UABC, México. 146 pp.

- Pelegrín F.Y. 2001. Algas en la "botica". Departamento de Recursos del Mar de la Universidad Mérida del Cinvestav. Avance y perspectiva Vol.20.
- Pérez S., A. Levy y S. Gómez. 1998. Presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas en algas marinas de las costas venezolanas. *Act. Cient. Venez.* 49: 144-151.
- Plaza M., E. Ibáñez, S. Santoyo, L. Jaime, G.R. Blairsy, M. Herrero y F.J. Señoráns. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 450-455.
- Pratt R., H. Mautner, G.M. Gardner, Y. Sha y J. Dufrenoy. 1951. Report on antibiotic activity of seaweeds extracts. *Journal of the American Pharmacology Associatio.* 40:575-579.
- Purves, S.D. 2009. Vida. La ciencia de la biología. Editorial Médica Panamericana. Octava Edición. Argentina 1251.
- Santoyo S., L. Jaime, M. Plaza, M. Herrero, I. Rodríguez-Meizoso, E. Ibáñez y G. Reglero. 2012. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. *Journal of Applied Phycology*, 24: 731-741.
- Scheuer P.J. 1996. Marine metabolites as drug leads-retrospect and prospect: in biochemical aspects of marine pharmacology. *En: A: Lazarovivi, P.; Spira, M. E.; Zlotkin, E. [ed.]. Fort Collins: Alaken: 1-12.*
- Schwimmer M. y D. Schwimmer. 1955. The role of algae and plankton in medicine. Grune and Stratton, Nueva York. 317pp.
- Shizuri Y., A. Yamada, K. Laurequinone. 1984. Cyclolaurane sesquiterpene from the red alga *Laurencia nidifica*. *Phytochemistry* 23(11): 2672-2673.
- Sieburth J. 1960. Acrylic Acid, an "Antibiotic" Principle in *Phaeocystis* Blooms in Antarctic Waters. *Science* 132: 676-677.
- Silva G.C., R. Albuquerque-Costa, J.R. Oliveira-Peixoto, F.E. Pessoa-Nascimento, P.B. de Macedo-Carneiro, R.H.S. Dos Fernandes-Vieira. 2013. Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant *Vibrio*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41(1): 183-188.
- Sreenivasa-Rao P. y K.S. Parekh. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. *Botanica Marina* 24: 577-582.

- Stein J.R y C.A Borden. 1984. Causative and beneficial algae in human disease conditions: A review *Phycologica* (23):485-501.
- Steinberg, P.D. 1992. Geographical variation in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. *En: Ecological roles of marine natural products*. Cornell University Press, Ithaca, London. 51-92p
- Troncoso N., R. Saavedra, A. Olivares, J. Farias, S. San-Martín, H. Urrutia, C. Agurto. 2015. Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en al Región de Biobío, Chile. *Rev., de Biología Marina y Oceanografía. Chile* 50(1): 199-204.
- Valerie J y W. Fenical.1984. Novel bioactive diterpenoid metabolites from tropical marine algae of the genus *Halimeda* (Chlorophyta). *Tetrahedron*. 40(16):3053-3062
- Velasco-García J.A. 2009. Ambientes geológicos costeros del litoral de la Bahía de la Paz, BCS. Tesis de maestría. CICIMAR, IPN. 70 pp.
- Vidyavathi N. y K.R. Slidhar. 1991. Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the manglare coast of India. *Botánica Marina* 34: 279-284.
- Villamar C.A. 1965. Fauna malacológica de la Bahía de La Paz, B. C. Con notas ecológicas. *An. Del Inst. Nat. De Inv. Biologico-pesqueras* 1: 114-152.
- Yung P. 1997. The microbial world: Foundation of the world. *ASM News*. 63: 417-421.