



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ÁNGEL

EVALUACIÓN DE BIOACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE LA
PLANTA *Ardisia compressa* Kunth Y LAS MACROALGAS *Padina
durvillaei* Bory, *Chlorodesmis hildebrandtii* Gepp & Gepp y *Ulva
lactuca* Linnaeus

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA:
GARCÍA JUÁREZ GLADYS JOVITA

DIRIGIDA POR:
DR. J. MARCO VINICIO RAMÍREZ MARES

Puerto Ángel, Oaxaca, febrero de 2011



Puerto Ángel, Oaxaca, febrero 2011

Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel, Oaxaca

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de realizar la revisión detallada de la tesis: “Evaluación de bioactividad de extractos de la planta *Ardisia compressa* Kunth y las macroalgas *Padina durvillaei* Bory, *Chlorodesmis hildebrandtii* Gepp & Gepp y *Ulva lactuca* Linnaeus”, que presenta la pasante de Biología Marina Gladys Jovita García Juárez, se considera que cumple con los requisitos y la calidad necesarios para ser defendida

COMISIÓN REVISORA

Director

Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares

Dra. Beatriz Hernández Carlos

M. en C. Yolanda Huante González

M. en C. Minerva E Isis Camacho
Sánchez

Dr. Edgar F. Rosas Alquicira

RESUMEN

El incremento en el interés por los productos naturales, terrestres y acuáticos, han generado mayor consumo de los mismos y por ende de los metabolitos secundarios que han sido utilizados para prevenir o curar diversas enfermedades. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la capacidad antitopoisomerasa (utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente: JN394, JN362a y JN394t₁), la actividad antioxidante (método del DPPH) y la actividad antimicrobiana (método de difusión en disco y de dilución en tubo), de las macroalgas *Padina durvillaei*, *Chlorodesmis hildebrandtii* y *Ulva lactuca*, y de la planta *Ardisia compressa*. Para llevar a cabo la evaluación, se realizó la extracción metanólica y hexánica de las macroalgas y el fraccionamiento, a través de cromatografía en columna abierta, del extracto metanólico del tallo de la planta. La mayor actividad TOP II se obtuvo en los extractos: 1(extracto soluble en Hexano), 2(extracto soluble en Metanol), 7(extracto metanólico, insoluble color verde) y 10(recuperado de Metanol), de la macroalga *Padina durvillaei*. Las fracciones de *Ardisia compressa*, que presentaron actividad TOP II fueron; A, B, E, J, N, Q, S, B2, C2, E2, H2, I2, J2, K2, L2 y N2, siendo las de mejor actividad: B, J, H2 y Ñ2. La mayor actividad antioxidante se encontró en el extracto 1(soluble en hexano) obtenido de la macroalga *P. durvillaei*, el valor de TEC_{50} fue 6.8 min y el valor de EA 0.009×10^{-3} . Para el tallo de *A. compressa* la fracción E presentó el mayor efecto antioxidante, con valor de $TEC_{50}=0.8$ min y EA de 0.751×10^{-3} . Para la evaluación antimicrobiana los mejores extractos de macroalgas fueron el 9 (residuo de Metanol soluble en acetato) de *P. durvillaei*, y el 13 (Insoluble en Metanol) de *Chlorodesmis hildebrandtii*, los cuales inhibieron el crecimiento de *E. coli* (ATCC 35218), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) y *C. albicans* (ATCC 14053). El extracto 3 (Insoluble y suspendido en Metanol) de *P. durvillaei* inhibió el crecimiento de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. epidermidis* (ATCC 12228). La fracción F2, del tallo metanólico de *A. compressa* resultó buen antimicrobiano contra la cepa *E. coli*. De las tres macroalgas, *Padina durvillaei* es la que presentó mejor bioactividad. Se demostró la existencia de metabolitos secundarios bioactivos, responsables de las actividades antitopoisomerasa, antioxidante y/o antimicrobiana, en las macroalgas y planta estudiadas, lo que indica la presencia de compuestos que podrían contribuir en la prevención y tratamiento del cáncer. Por lo que es necesario continuar con esta línea de investigación realizando fraccionamientos biodirigidos hasta aislar los compuestos bioactivos.

DEDICATORIAS

Mama (†): Tu recuerdo está intacto en la memoria y en el corazón, gracias por haberme dado amor, felicidad y vida. Ya llegará el día en que festejemos con un abrazo nuestro encuentro. Del mar al cielo; te amo Mamá.

Papá mil gracias por hacerme crecer como persona, por estar conmigo, por nunca dejar de ser mi Papá. Te adoro.

A mis ángeles, Nelly y Gaby, que han crecido conmigo, por la fe en mí, por enseñarme a tener paciencia, prudencia, por su sabiduría pero sobretodo por llenarme de amor. Son lo más preciado que la vida me ha heredado: las amo.

A mis hermanas que las adoro por ser grandes mujeres Lupita y Kenia
A mi gran familia que es el pilar fundamental de mi existencia; gracias, muchas gracias por seguir de la mano. Los adoro.

Claro, claro, gracias, por el esfuerzo, por la paciencia, por el amor y por la dicha de encontrarte. Esto apenas empieza, Et amo Marco

Gracias Dios, gracias vida, gracias mar, por su plenitud, por su belleza, por hacerme tan exquisitamente feliz.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis el Dr. J. Marco Vinicio Ramírez Mares, mil gracias por brindarme la oportunidad de experimentar, aprender y avanzar. Y sobre todo por la tolerancia, paciencia y conocimiento brindada a esta tesis. Gracias por ser un excelente Director y enseñarme que la calidad académica debe ir ligada a la calidad humana.

A mis revisores la Dra. Beatriz Hernández Carlos, M. en C. Yolanda Huante González, M. en C. Minerva E Isis Camacho Sánchez y el Dr. Edgar F. Rosas Alquicira, gracias por su tiempo, sugerencias y comentarios aportados a este trabajo.

Al proyecto de CONACYT N0. 52065, se le agradece por el apoyo de investigación y la beca otorgada.

Gracias familia UMAR; Chema, Selene, Sac, Viri, Vane, Yis, Edith, Xochil, Pao, Ire, Wili, Yuka, Oax y Jorge, por haberse presentado en el momento exacto y permitirme ser parte de su vida. Gracias por conocerlos y aprender de ustedes.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Cáncer.....	5
2.2 Bioensayos.....	7
2.2.1 Topoisomerasas.....	7
2.2.2 Antimicrobianos.....	14
2.2.3 Antioxidantes.....	15
2.3 Biodiversidad.....	17
2.3.1 Biodiversidad de las plantas en México.....	17
2.3.2 Biodiversidad de macroalgas en México.....	18
2.3.3 Importancia del uso de plantas y macroalgas.....	18
2.3.4 Metabolitos secundarios.....	20
2.4 Selección del material biológico.....	22
2.5 Biología del material vegetal.....	22
2.5.1 Ardisia compressa.....	22
2.5.2 Padina durvillaei.....	24
2.5.3 Chlorodesmis hildebrandtii.....	25
2.5.4 Ulva lactuca.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. OBJETIVOS.....	27
4.2 Objetivo General.....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
5. HIPÓTESIS.....	28

	Página
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 Recolecta del material biológico	28
6.2 Procesamiento del material biológico	29
6.3 Bioensayos	29
6.3.1 Bioensayo antitopoisomerasa	29
6.3.1.1 Incubación de las cepas	29
6.3.1.2 Conteo de células y ajuste de concentración	30
6.3.1.3 Aplicación de muestras y controles	30
6.3.1.4 Determinación de las células viables	30
6.3.2 Bioensayo de antioxidantes	31
6.3.2.1 Método cualitativo	31
6.3.2.2 Método cuantitativo	31
6.3.2.3 Determinación de la mayor absorbencia del DPPH	31
6.3.2.4 Curva de calibración	31
6.3.2.5 Eficiencia antirradicalaria del Ácido ascórbico	32
6.3.2.6 Obtención de la eficiencia antirradicalaria de extractos	32
6.3.3 Bioensayo antimicrobiano	33
6.3.3.1 Método de difusión en agar	33
6.3.3.2 Preparación del estándar de McFarland	33
6.3.3.3 Preparación del inóculo	34
6.3.3.4 Inoculación de las placas	35
6.3.3.5 Criterio de Interpretación	36
6.3.3.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	37
6.3.3.6.1 Preparación del inóculo	37
6.3.3.6.2 Preparación de las diluciones de las muestras a evaluar	37
6.3.3.6.3 Inoculación de los tubos	37
6.3.3.6.4 Obtención de la concentración mínima inhibitoria	37
6.4 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1 Obtención de extractos	38
7.2 Fraccionamiento del extracto crudo de <i>A. compressa</i>	39
7.3 Disolución de extractos y fracciones	42
7.4 Evaluaciones antitopoisomerasa	42

	Página
7.5 Evaluaciones antioxidantes	51
7.5.1 Análisis cualitativo	51
7.5.2 Análisis cuantitativo	53
7.6 Evaluaciones antimicrobianas	57
7.6.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	60
8. CONCLUSIONES	61
9. REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Mecanismos de acción de la topoisomerasa I	9
2.	Mecanismo de acción de la topoisomerasa II	10
3.	Estructura química de la Camptotecina y sus derivados	11
4.	Estructura química del Etoposido	12
5.	Planta <i>Ardisia compressa</i> ; A) rama, B) flor-hoja, y C) fruto	23
6.	Macroalga <i>Padina durvillaei</i>	24
7.	Macroalga <i>Ulva lactuca</i>	26
8.	Ubicación de las zonas de colecta	28
9.	Ajuste de turbidez del inóculo de <i>K. pneumoniae</i> con el estándar de McFarland	34
10.	Placa inoculada	35
11.	Diluciones seriadas para determinar la CMI	38
12.	Crecimiento en porcentaje de la cepa JN394, probado en los extractos 1, 2, 3, 4, de la macroalga <i>Padina durvillaei</i> , recolectada en Puerto Escondido.	43
13.	Crecimiento en porcentaje de la cepa JN394, probado en los extractos, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la macroalga <i>Padina durvillaei</i> , recolectada en San Agustinillo.	44
14.	Crecimiento en porcentaje de la cepa JN362a, probado en los extractos 1, 2, 3 y 4 de la macroalga <i>Padina durvillaei</i> , recolectada en Puerto Escondido	45
15.	Crecimiento en porcentaje de la cepa JN362a, probado en los extractos 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la macroalga <i>Padina durvillaei</i> , recolectada en San Agustinillo	45
16.	Crecimiento en porcentaje de las cepas JN394 y JN362a. Probado en los extractos 11, 12 y 13 de la macroalga <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i>	46
17.	Crecimiento en porcentaje de las cepas JN394 y JN362a. Probado en los extractos 15, 16 y 17 de la macroalga <i>Ulva lactuca</i> .	47

Figura		Página
18.	Porcentaje de crecimiento de las cepas JN394 y JN362a, en presencia de las fracciones de la planta <i>Ardisia compressa</i> .	48
19	Porcentaje de crecimiento de las cepas JN394 y JN362a, en presencia de las fracciones de la planta <i>Ardisia compressa</i> (cont.)	48
20.	Porcentaje de crecimiento en la cepa JN394t. ₁ de los extractos 1, 2, 7, 10, 12 y 15, que presentaron actividad antitopoisomerasa, de las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> , Pto. Escondido, <i>Padina durvillaei</i> San Agustinillo, <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> y <i>Ulva lactuca</i>	49
21.	Porcentaje de crecimiento en la cepa JN394t. ₁ de las fracciones de <i>Ardisia compressa</i> que presentaron actividad antitopoisomerasa	50
22.	Reducción del DPPH en el cromatofolio. A) No hay reducción del DPPH, color morado B) se observa reducción del DPPH, presenta color amarillo.	51
23.	Curva de calibración del DPPH	53
24	Cinética del AA y obtención de la ecuación para calcular la CE ₅₀	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Clasificación de sensibilidad del microorganismo.	36
2.	Cantidad de material biológico y volumen de maceración.	39
3.	Cantidades y rendimiento de las fracciones de <i>Ardisia compressa</i> , obtenidas por cromatografía en columna abierta.	40
4.	Clasificación y rendimiento de los extractos de <i>Padina durvillaei</i> , <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> y <i>Ulva lactuca</i> .	41
5.	Concentración de Extractos de <i>Padina durvillaei</i> , <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> , <i>Ulva lactuca</i> y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> .	42
6.	Actividad registrada en el método cualitativo, para las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> , <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> , <i>Ulva lactuca</i> y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> .	52
7.	Molaridad y Absorbencia (ABS) de las diluciones de DPPH	53
8.	%DPPH remanente contra los µg de agente reductor AA	54
9.	Concentración efectiva 50 (CE ₅₀) de los extractos de las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> , <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> , <i>Ulva lactuca</i> y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> .	56
10.	Extractos de las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> , <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> , <i>Ulva lactuca</i> , y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> , que presentaron inhibición en <i>E. coli</i>	58
11.	Extractos de las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> y <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> , que presentaron inhibición en <i>K. pneumoniae</i> .	59
12.	Extractos de las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> y <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> , que presentaron inhibición en <i>S. epidermidis</i> .	59
13.	Extractos de las macroalgas <i>Padina durvillaei</i> y <i>Chlorodesmis hildebrandtii</i> y fracciones de <i>Ardisia compressa</i> , que presentaron inhibición en <i>C. albicans</i>	60
14.	CMI de los extractos y fracciones con actividad antimicrobiana.	61