



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



**“ESTUDIO DEL ALGA *Sargassum horridum*  
COMO FUENTE DE COMPUESTOS ACTIVOS  
CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

PATSY EUNICE PARDO FUENTES

LA PAZ, B.C.S. JUNIO DE 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 23 del mes de Mayo del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

ESTUDIO DEL ALGA Sargassum horridum COMO FUENTE DE
COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA Mycobacterium tuberculosis

Presentada por el alumno:

Table with columns for Pardo (Apellido paterno), Fuentes (materno), and Patsy Eunice (nombre(s)). Includes a registration number: A 1 0 0 0 8 8.

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

Signature of Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ
Director de Tesis

Signature of Dra. Gloria María Molina Salinas
DRA. GLORIA MARÍA MOLINA SALINAS
2º. Directora de Tesis

Signature of Dra. Christine Johanna Band Schmidt
DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT

Signature of Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz
DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

Signature of Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero
DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Signature of Dra. María Margarita Casas Valdez
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 11 del mes Junio del año 2012  
el (la) que suscribe ING. BIOQ. PATSY EUNICE PARDO FUENTES alumno(a) del  
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS  
con número de registro A100088 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ Y DRA. GLORIA MARÍA MOLINA SALINAS  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTUDIO DE ALGA *Sargassum horridum* COMO FUENTE DE  
COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: ppardof0900@ipn.mx - jimurillo2003@yahoo.com.mx - gmolina70@gmail.com  
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ING. BIOQ. PATSY EUNICE PARDO FUENTES

*nombre y firma*

**ESTUDIO DEL ALGA *Sargassum horridum*  
COMO FUENTE DE COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*.**

Presentado por:

**PATSY EUNICE PARDO FUENTES**

Este trabajo se realizó en los laboratorios del Laboratorio de química de algas del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, el laboratorio de Micobacteriología de la División de Biología Celular del CIBIN-IMSS, bajo la Dirección del Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez y la Dra. Gloria María Molinas Salinas.

Firmas

Director



---

Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez

Directora



---

Dra. Gloria María Molinas Salinas

### **A mi esposo:**

Por que tu estuviste ahí desde el momento en volví a soñar con todo esto, porque tú me inspiraste a continuar creciendo, porque tus miradas y tu risa, hicieron de éste tiempo una de las etapas más bonitas de mi vida...pero sé que lo mejor está por venir...

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez y la Dra. Gloria María Molinas Salinas por confiarme este proyecto y recibirme bajo su tutela. Su paciencia y permanente optimismo me alentaron mucho en este tiempo. Al Dr. Mauricio Muñoz Ochoa “Mao”, quien comenzó este proyecto, por su amistad, asesoría, apoyo y exhortación. A los profesores Liz, Dora y Alejandro del laboratorio de Química de algas del CICIMAR-IPN, por su disposición, colaboración y amistad.

Así mismo al Dr. Víctor Manuel Torres de la Cruz, técnico en investigación del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIN-IMSS). A la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro a través del CIBIN-IMSS, por el apoyo para la realización de los bioensayos de evaluación antituberculosa *in vitro*, así como para la identificación mediante espectroscopía de masas de los componentes de las fracciones bioactivas. A la Dra. Laura Elia Martínez García de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Jefa del Departamento de Genética donde se llevaron a cabo los estudios de espectroscopía de masas.

Los agradecimientos son extensivos a la Dra. Nury Pérez Hernández de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, por la adquisición de los espectros de resonancia magnética nuclear y su incondicional ayuda en la interpretación. Al Dr. Rafael Riosmena Rodríguez de la Universidad Autónoma de Baja California Sur por haber realizado la identificación taxonómica de *Sargassum horridum*.

Al comité tutorial, la Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero, la Dra. Christine Johanna Band Schmidt y el Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz por su tiempo, sugerencias y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por las becas de financiamiento.

A CICIMAR y su plantilla de profesores por los recursos y esfuerzos dedicados para la culminación de esta maestría.

El financiamiento de este trabajo de investigación provino de varias fuentes, entre ellas; el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [(ref. SEP 47942/A-1) “Búsqueda de Nuevos Quimiotipos Antibacterianos en Algas de las Costa de Baja California Sur”] y la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional [“Estudio del Potencial de Aplicación Biomédico y Ambiental de Algas del Género *Ulva* y *Sargassum* Recolectadas en el Golfo de California (ref. SIP 20111014)”, & “Estudio de la Actividad Antioxidante y Antibacteriana del Alga Café *Padina crispata*. Fase II (ref. SIP 20101182)”].

A mis padres, el M.C. Federico R. Pardo Macías y Eunice Fuentes Reyes, por motivarme a continuar mi preparación y facilitarme todo el proceso, gracias por creer en mí, ustedes son mi mayor motivador.

Al B. M. Victor Alfonso Tapia Rendón, quien como amigo me inspiró a comenzar esta carrera, y el día de hoy, como esposo, me apoya y me acompaña al alcanzar esta meta.

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa, crónica y mortal presente en todo el mundo, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. Debido al desarrollo de cepas resistentes a los fármacos tradicionales y el sinergismo con el virus de inmunodeficiencia adquirida, es urgente la búsqueda de nuevos agentes antituberculosos. En este sentido, las algas marinas resultan una interesante fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica diversa. En un estudio previo a este, el extracto crudo etanólico obtenido a partir de *Sargassum horridum*, mostró una potente actividad contra *M. tuberculosis* (CMI=  $6.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Esto último, aunado a los escasos estudios químicos sobre *S. horridum* y la abundancia del alga en el Golfo de California, dio lugar al presente trabajo. Con la finalidad de determinar los compuestos responsables de la actividad contra *M. tuberculosis* presentes en *S. horridum*, se evaluaron extractos obtenidos a partir de nuevas muestras. Durante el estudio, se aislaron un par de compuestos polares, el primero de ellos se identificó como manitol, mientras que el segundo se caracterizó parcialmente como un glucoglicerolípido. La actividad biológica de extractos, fracciones y compuestos se determinó utilizando la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv por medio del método de dilución en caldo en microplacas de 96 celdas y azul de alamar como indicador de actividad metabólica. La actividad contra *M. tuberculosis* se duplicó en cada paso del fraccionamiento, lográndose identificar una fracción medianamente activa (fracción CC7F5, CMI=  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). En todas las fracciones activas se descartó la presencia de quinonas, ácido mirístico (previamente aislado de *S. horridum*) y los fitoesteroles saringosterol y saringosterona. Estos compuestos han mostrado actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* y fueron reportados en otras algas del género *Sargassum*. Un análisis realizado mediante UPLC-EM de la fracción activa CC7F5 reveló la presencia de triglicéridos y ácidos grasos libres como principales componentes, lo que sugiere que la actividad del extracto podría ser debida a ese tipo de compuestos.



## ABSTRACT

Tuberculosis is a contagious, chronic and deadly disease present throughout the world, mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Due to the development of resistant strains to traditional drugs and synergy with human immunodeficiency virus, is urgent the search for new antitubercular agents. In this sense, marine seaweeds are an interesting source of secondary metabolites with diverse biological activities. In a previous study, an ethanolic crude extract obtained of *Sargassum horridum*, showed strong activity against *M. tuberculosis* (MIC= 6.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The latter, together with the few chemical studies on *S. horridum* and the abundance of the algae in the Gulf of California, gave rise to this work. With the purpose of determining the compounds responsible for activity against *M. tuberculosis* present in *S. horridum*, were evaluated extracts obtained from new samples. During the study, a couple polar compounds were isolated; the first was identified as mannitol, while the second was partially characterized like a glucoglycerolipid. The biological activity of extracts, fractions and compounds were assessed using the reference strain *M. tuberculosis* H37Rv by broth dilution method in 96 well microplates and Alamar blue as metabolic activity indicator. Activity against *M. tuberculosis* was duplicated at each step of fractionation, thereby obtaining a fraction with moderately activity (fraction CC7F5; MIC=25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). In all active fractions were discarding the presence of quinones, myristic acid (previously isolated from *S. horridum*) and phytosterols saringosterol and saringosterona. These compounds show inhibitory activity against *M. tuberculosis* and were reported in other algae of the genus *Sargassum*. Analysis by UPLC-MS of the active fraction CC7F5 revealed the presence of triglycerides and free fatty acids like main component, this allows us to suggest that the activity of extract could be due to this type compounds.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
GLOSARIO.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Impacto mundial de la tuberculosis.....	3
2.2. Desarrollo de los fármacos utilizados en los tratamientos contra <i>M. tuberculosis</i> .....	4
2.3. Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos y generación de resistencia.....	7
2.4. Productos naturales como agentes alternativos contra <i>M. tuberculosis</i> .....	9
2.5. Relevancia del alga <i>Sargassum horridum</i> .....	14
2.6. Antecedentes de compuestos aislados en el género <i>Sargassum</i> .....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	24
4.1 Hipótesis conceptual.....	24
4.2 Hipótesis alternativa.....	24
5. OBJETIVO.....	25
5.1. Objetivo General.....	25
5.2. Objetivos Particulares.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1. Recolecta de <i>S. horridum</i> .....	26
6.2. Extracción y fraccionamiento.....	27
6.3. Ensayo de actividad contra <i>M. tuberculosis</i> por el micrométodo de Alamar azul (MABA).....	32
6.4. Fraccionamiento biodirigido.....	33
6.5. Fraccionamiento en HPLC-UV.....	35
6.6. Búsqueda de compuestos antituberculosos conocidos en las fracciones activa.....	34
6.6.1. Estudio espectroscópico en UPLC-EM.....	34
6.6.2. Estudio del perfil cromatográfico en capa fina.....	35
6.6.3. Búsqueda de ácido mirístico en las fracciones activas.....	35

6.6.4. Identificación de quinonas.....	36
6.7. Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1. Actividad biológica contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	37
7.2. Estudio químico de las fracciones activas contra <i>M. tuberculosis</i> .....	39
7.3. Compuestos aislados durante el estudio de <i>S. horridum</i> .....	42
7.3.1. Obtención e identificación de manitol.....	42
7.3.2. Elucidación estructural del compuesto 2.....	45
7.4. Naturaleza química de los compuestos antituberculosos en <i>S. horridum</i> <06-009>.....	49
8. DISCUSIÓN.....	51
8.1. Actividad antituberculosa de <i>S. horridum</i> .....	51
8.2. Contenido de manitol.....	57
8.3. Aislamiento de un glucoglicerolípido.....	58
9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
10. LITERATURA CITADA.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de fármacos anti-tuberculosos de primera línea.

a) Estreptomina, b) rifampicina, c) isoniazida, d) pirazinamida y e) etambutol.

Figura 2. Alcaloides marinos antimicobacterianos. a) Araguspongina C de la esponja *Xestospongia exigua*, b) aerotonina de la esponja *Aplysina gerardogreeni*, c) ingenamina G de la esponja *Pachychalina* sp., d) manadomanzamina A de la esponja *Acanthostrongylophora* sp. y e) pseudopteroxazol de la gorgonia *Pseudopteroergorgia elisabethae*.

Figura 3. Terpenos y péptidos marinos antimicobacterianos. a) Monoterpeno halogenado del alga roja *Plocamium cartilagineum*, b) terpeno elatol del alga roja *Laurencia elata*, c) diterpenoide del coral *Pseudopteroergorgia elisabethae* y d) péptido oceanapia de la esponja *Oceanapia* sp.

Figura 4. Fronda de *Sargassum horridum*. Tomado de Paul- Chávez (2005).

Figura 5. Estructura química de los compuestos aislados de *S. horridum*:

a) Fucosterol y b) ácido mirístico.

Figura 6. Esteroles aislados en el género *Sargassum*. a) Saringosterol, b) saringosterona.

Figura 7. Estructuras quinólicas aisladas del género *Sargassum*. a) Naftoquinona, sargassumcetona; b) plastoquinona, ácido sargahidroquinoico y c) benzoquinona, sargatetraol.

Figura 8. Terpenos, cromenoles y ácidos grasos poliinsaturados en el género *Sargassum*. a) Crinitol, b) sargatriol y c) 1-octadecatetranoilglicerol.

Figura 9. Ubicación geográfica de San Juan de la Costa en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.

Figura 10. Fraccionamiento primario de *S. horridum* <06-009-41>.

Figura 11. Esquema de extracción de *S. horridum* <09-007>.

Figura 12. Obtención de manitol por cristalización a partir del extracto acuoso de *S. horridum* <09-007>: Am = aguas madres, Cr = cristales.

Figura 13. Esquema de fraccionamiento y purificación del compuesto 2 de CC6F3.

Figura 14. Esquema de fraccionamiento biodirigido de *S. horridum* <06-009>.

Figura 15. Perfil cromatográfico de las fracciones activas de *S. horridum* <06-009> usando el sistema de separación para saringosterol y saringosterona.

Figura 16. Comparación del perfil cromatográfico del ácido mirístico con las fracciones activas. a) CC7F4, b) CC7F5, c) CC7F6, y d) ácido mirístico. Sistema de separación hexano:acetona (8:2). Se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% como revelador.

Figura 17. Cromatograma en HPLC-UV de la fracción activa CC7F5.

Figura 18. Espectro de infrarrojo de la fracción insoluble ESL1F3 de *S. horridum*.

Figura 19. Comparación de espectro IR de la fracción insoluble de ESL1F3 y el manitol aislado por Muñoz-Ochoa (2010).

Figura 20. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 2. Rango de 180-50 ppm.

Figura 21. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 2. Rango de 40- 0 ppm.

Figura 22. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 2.

Figura 23. Estructura parcial del compuesto 2. R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>=ácidos grasos; R<sub>3</sub>= grupo sulfonil, amino o H.

Figura 24. Espectro de masas de la fracción activa CC7F5.

Figura 25. Ácidos grasos antimicobacterianos. a) Ácido 3-nitropropiónico, b) ácido esclerofrírico, c) ácido 2-hexadecinoico y d) ácido 2-metoxidecanoico.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad, mecanismo de acción y concentración inhibitoria mínima de los fármacos antituberculosos de primera línea.

Tabla 2. Productos naturales usados en combinación con fármacos antituberculosos de primera y segunda línea (Copp, 2003; Coll, 2003).

Tabla 3. Productos naturales marinos antituberculosos.

Tabla 4. Compuestos bioactivos aislados del género de *Sargassum*.

Tabla 5. Datos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto 2 aislado de *S. horridum*.

Tabla 6. Comparación de los desplazamientos químicos característicos de algunos azúcares en glucoglicerolípidos.

Tabla 1. Actividad, mecanismo de acción y concentración inhibitoria mínima de los antimicrobianos antituberculosos de primera línea.

Tabla 2. Productos naturales usados en combinación con fármacos de primera y segunda línea (Copp, 2003; Coll, 2003).

## GLOSARIO

**Actividad biológica:** referente a la respuesta que se pueda generar en algún sistema biológico.

**Algas:** Organismos vegetales acuáticos, unicelulares y multicelulares que integran el primer eslabón de la trama trófica en su biotopo, y que puede flotar libremente o permanecer fijos en un sustrato. Carecen de un auténtico sistema vascular.

**Antibacteriano:** Compuesto que inhibe el crecimiento de bacterias.

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

**Biomasa:** Medida cuantitativa de la materia viva por unidad de área, la cual generalmente se expresa en gramos por metro cuadrado.

**Caseum:** Necrosis específica de la tuberculosis, que da a los tejidos atacados una consistencia blanda semejante a la del queso.

**Citotoxicidad:** Que es tóxico para las células.

**Esterol:** Son compuestos químicamente relacionados con el colesterol, todos los esteroides poseen un núcleo básico de 4 anillos; el ciclopentanoperhidrofenantreno.

**Extracto:** Producto obtenido a partir de un organismo o parte de él, el cual es extraído con un disolvente, ya sea orgánico o a base de agua.

**Fármaco:** Sustancia química purificada que se utiliza para el tratamiento, la cura, la prevención o el diagnóstico de alguna enfermedad o también para inhibir la aparición de un proceso fisiológico no deseado.

**Frona:** Parte superior del talo, la cual está delimitada en su parte inferior por el estipe y en la parte superior por el ápice, en ella se encuentran los patrones de ramificación y define el tipo del talo.

**Glucona:** es el componente glucosídico (puede consistir en un monosacárido o un oligosacárido) de un glucósido.

**Isocrático:** término utilizado en cromatografía para designar un disolvente o mezcla de disolventes que se utiliza a lo largo de la misma, a diferencia de la cromatografía con gradiente de disolventes.

**Licuefacción del material caseoso:** La necrosis caseosa evoluciona hacia la licuefacción, al haber disminuido su densidad, se disemina por los bronquios, con lo que puede infectar otros segmentos, dicho material caseoso tiene gran cantidad de bacilos.

**Manto:** Extensiones donde la cobertura algal se aproxima al 100 % con respecto a un área determinada, constituido por una sola especie (monoespecífico) o de varias especies (multiespecífico).

**Meristemo:** Tejido vegetal o zona de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse activamente. A partir del mismo se forman los otros tejidos que forman el cuerpo vegetal.

**Metabolito secundario:** Compuesto químico producido por un organismo sin función aparentemente involucrada en procesos primarios como la reproducción y el crecimiento, sin embargo puede darle una ventaja competitiva al organismo que lo produce.

**Metabolito:** Compuesto químico producido por un organismo.

**Micobacterias:** Microorganismo de la familia de bacterias *Mycobacteriaceae*, del orden actinomicetales, de forma irregular, parásitas intracelulares, ácido-alcohol resistentes, cuyo género más importante es *Mycobacterium*.

**Producto natural:** Sea cualquier producto o sustancia producida u obtenida a partir de un organismo o parte de él, normalmente de naturaleza orgánica.

**Sinérgico:** Acción o efecto combinado de dos o más compuestos.



## ABREVIATURAS

<b>Å</b>	armstrongs
<b>ATCC</b>	siglas en inglés, American Type Culture Collection
<b>AU</b>	absorbancia
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C
<b>CC</b>	columna cromatográfica
<b>DCM</b>	diclorometano o cloruro de metileno
<b>CMI</b>	concentración mínima inhibitoria
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>ESL</b>	extracción sólido-líquido
<b>ELL</b>	extracción líquido-líquido
<b>EtOAc</b>	acetato de etilo
<b>EtOH</b>	etanol
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H
<b>Hex</b>	hexano
<b>HPLC</b>	siglas en inglés de cromatografía líquida de alta resolución
<b>MeOH</b>	metanol
<b>µL</b>	microlitros
<b>mg</b>	miligramos
<b>mL</b>	mililitros
<b>R<sub>f</sub></b>	factor de retención
<b>TB</b>	tuberculosis
<b>CCF</b>	cromatografía de capa fina.
<b>UPLC</b>	siglas en inglés de nano-cromatografía líquida

## 1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo consistió en la obtención de fracciones activas contra *Mycobacterium tuberculosis* a partir de un extracto crudo etanólico de *Sargassum horridum*. Las fracciones activas fueron analizadas para determinar la naturaleza química de los compuestos responsables de la actividad observada, con la finalidad de evaluar el potencial farmacológico del alga como fuente de nuevos agentes antituberculosos. La tuberculosis (TB) pulmonar, causada principalmente por *M. tuberculosis* se encuentra presente en todo el mundo, y nuestro estado no está exento de ella. El lento crecimiento del organismo y los prolongados tratamientos para la enfermedad hacen muy difícil erradicarla. Además, el incremento de la población afectada por el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) provee individuos más susceptibles a la enfermedad, permitiendo que la incidencia de TB se incremente (Hongmanee, 2009). Los fármacos de primera línea fueron introducidos hace más de cincuenta años y se requiere una combinación de fármacos para ser eficaces. Sin embargo, los efectos adversos de éstos fármacos y los largos periodos de tratamiento hacen que los pacientes no completen correctamente los tratamientos contribuyendo al desarrollo de cepas resistentes (Hongmanee, 2009). Factores como los antes mencionados, hacen necesario el desarrollo de nuevas estrategias para erradicar esta enfermedad, entre ellas, el desarrollo de nuevos agentes antituberculosos (Gupta *et al.*, 2012). Debido a la diversidad de sus estructuras químicas, los productos naturales marinos han sido considerados una alternativa importante en la búsqueda de nuevos agentes con potencial farmacéutico (Saravanakumar *et al.*, 2008). En el presente estudio se consideró necesario determinar el o los principios activos contra *Mycobacterium tuberculosis* presentes en el alga marina *S. horridum*. Esta alga café, perteneciente al género *Sargassum*, tiene una representatividad importante en la península de Baja California, ya que su distribución abarca el noroeste del Pacífico Mexicano y el Golfo de California, y ha sido descrita como la especie más común de su género en la Bahía de La Paz (Paul-Chávez, 2005). Actualmente, son pocos los estudios realizados sobre la composición química y actividad biológica de ésta especie. Es por esto que las hipótesis se construyeron sobre los antecedentes científicos de actividad biológica y

antimicobacteriana reportadas en el género de *Sargassum*, así como de compuestos aislados en el género que pudiéramos relacionar con actividad antimicobacteriana. Como parte del estudio químico del alga, se identificaron de manera parcial dos compuestos que fueron aislados durante el proceso de fraccionamiento y son descritos en éste trabajo. Las fracciones activas fueron analizadas mediante técnicas de rápida identificación de compuestos activos que pudieran estar presentes como responsables de la actividad contra *M. tuberculosis*; todo esto con la finalidad de evitar trabajo innecesario de aislamiento y caracterización de principios activos ya reportados en el género. Existe un antecedente importante de actividad antituberculosa en el género de *Sargassum*, el fitoesterol saringosterol (Wächter *et al.*, 2001; Ayyad *et al.*, 2003), por lo que uno de los objetivos principales fue descartar la presencia de éste compuesto en las fracciones que resultaran activas. Lo que se buscó durante el desarrollo de este trabajo, no fue el tradicional fraccionamiento biodirigido, sino la implementación de estrategias que nos permitieran ser más analíticos durante la búsqueda. Todo conocimiento generado sobre compuestos antituberculosos, ya sea de estructura, actividad, origen, etc, puede aportar valiosa información en el desarrollo de fármacos antituberculosos, en este sentido, *S. horridum*, representa un interesante objeto de estudio.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Impacto mundial de la tuberculosis

El género *Mycobacterium* está constituido por 85 especies conocidas. Algunas de esas bacterias causan enfermedades en humanos y otras en animales. Entre las principales enfermedades de origen micobacteriano se encuentra la tuberculosis (TB) pulmonar, y dos enfermedades de tipo cutánea, lepra (*Mycobacterium leprae*) y úlcera de Buruli (*Mycobacterium ulcerans*). La tuberculosis es causada por la bacteria *M. tuberculosis*, y en menor grado *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum* (Okunade *et al.*, 2004). Esta mortal enfermedad ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad, el siglo pasado casi se erradicó por completo, pero múltiples factores favorecieron su resurgimiento y el día de hoy debe tratarse con nuevas estrategias. La tuberculosis pulmonar es una enfermedad contagiosa de transmisión aérea, cuando las personas tosen, estornudan o hablan, propagan la bacteria mediante las minúsculas gotas de saliva. Solo se necesita inhalar una pequeña cantidad para ser infectado, y una persona con tuberculosis activa sin tratamiento puede infectar entre 10 y 15 personas cada año. La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, dado que su sistema inmunológico actúa formando una barrera alrededor de la bacteria, manteniéndola en estado de latencia por años. Cuando el sistema inmunológico se ve debilitado la enfermedad puede manifestarse. De hecho, la tuberculosis es una de las principales causas de mortandad entre los pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (WHO, 2012). La pandemia del VIH contribuyó en gran medida a que en el siglo pasado la tuberculosis recobraría fuerza, proveyendo un gran reservorio de individuos susceptibles a ella. Los síntomas de la tuberculosis activa son tos, a veces con esputo que puede ser sanguinolento, dolor torácico, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudoración nocturna. Anualmente mueren anualmente cerca de 2 millones de personas en el mundo, y se estima que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada. De esas personas, una de cada diez contraerá tuberculosis activa en algún momento de su vida (WHO, 2012). En el 2010 se reportaron 8.8 millones de nuevos casos en todo el mundo, 1.4 millones de muertes por TB (0.35 millones asociados a VIH) y fueron atendidos 5.7 millones de casos nuevos y

recurrentes (WHO, 2011). De acuerdo con la información disponible a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en México se ha presentado una disminución en la incidencia de la tuberculosis, aunque esta continúa presentándose con cerca de 15 mil nuevos casos de tuberculosis pulmonar y cerca de 2 mil defunciones cada año (Castellanos-Joya, 2008). En el año 2011 se reportaron más de 14,512 nuevos casos en todo México, de los cuales 95 se presentaron en Baja California Sur (Secretaría de Salud. México, 2012). Hasta la semana cinco del presente año, 2012, se han reportado 1,031 nuevos casos de TB en México (Secretaría de Salud. México, 2012).

## **2.2. Desarrollo de los fármacos utilizados en los tratamientos contra *M. tuberculosis***

Los agentes antimicrobianos comunes no son igual de eficaces contra la tuberculosis ya que *M. tuberculosis* presenta tiempos de generación muy largos y posee la capacidad de entrar en periodos de latencia con actividad metabólica limitada. La pared celular de *M. tuberculosis* es sumamente compleja, está compuesta por dos segmentos, en el segmento inferior, por encima de la membrana, tiene una capa de peptidoglucano unido covalentemente a otra capa de arabinogalactano micolato. Esto es conocido como complejo micolil arabinogalactanpeptidoglucano (mAGP). El segmento superior está formado por lípidos libres, algunos ácidos grasos. Lípidos, proteínas y glucolípidos se encuentran intercalados entre éstos dos segmentos. Al romperse la pared celular, éstos últimos se solubilizan fácilmente en disolventes y pueden ser extraídos, mientras que el complejo mAGP permanece insoluble. Se considera que el complejo insoluble es esencial para la viabilidad de la célula y que los nuevos fármacos pueden ser diseñados contra ese objetivo en particular (Brennan, 2003). Sin embargo, esa misma complejidad le proporciona un carácter fuertemente hidrofóbico, y le da gran resistencia a los antisépticos. *M. tuberculosis* puede multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de los agentes antimicrobianos es fácil, pero también puede encontrarse en cavidades pulmonares, pus o material caseoso, en donde la penetración de los antimicrobianos resulta más difícil. Además, el pH del material caseoso y del interior de los macrófagos es muy bajo y esto también condiciona la

actividad de los antimicrobianos. Es por esto que la tuberculosis debe ser tratada con fármacos antimicrobianos con actividad específica antituberculosa (Coll, 2003). Entre 1940 y 1950, los “agentes antituberculosos de primera línea” o “fármacos de primera línea” fueron descubiertos (figura 1); estreptomina, ácido p-aminosalicílico, isoniazida, pirazinamida, rifampicina y etambutol. Al introducir el concepto de “cóctel de medicamentos” y la rifampicina, el más potente agente antituberculoso (desarrollada en 1963), los tratamientos se acortaron a tan solo 6 meses y el número de casos de tuberculosis decreció drásticamente (Chakroborty, 2011). En los 90’s se reportaron las primeras cepas multifármaco resistentes, las cuales son resistentes a isoniazida y rifampicina. Para éstos casos se introdujeron los “agentes antituberculosos de segunda línea”. Éstos agentes antimicobacterianos pertenecen al grupo de las fluoroquinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina), aminoglucósidos (kanamicina, amikacina) y polipéptidos (capreomicina), ácido p-aminosalicílico, cicloserina, protionamida y tiacetazona (Chakroborty, 2011). El incremento de su uso dio lugar a las cepas llamadas “extremadamente resistentes” las cuales han adquirido resistencia a las fluoroquinolonas y a los aminoglucósidos (Chakroborty, 2011; Coll, 2003).

Los agentes utilizados para el tratamiento de las cepas multifármaco resistentes son más costosos y tóxicos que los agentes antituberculosos de primera línea (Saravanakumar *et al.*, 2008). Otra problemática actual es que parte del panel de agentes antirretrovirales administrados en pacientes de VIH, específicamente los inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa y los inhibidores de la proteasa, interactúan con las rifamicinas entorpeciendo el tratamiento contra la tuberculosis (Saravanakumar *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que la resistencia a los agentes antimicobacterianos se debe a mutaciones cromosómicas espontáneas en los genes que codifican la diana del agente o enzimas implicadas en la activación del fármaco. La mayoría de los brotes de cepas multiresistentes han ocurrido en enfermos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA. Coll, 2003).

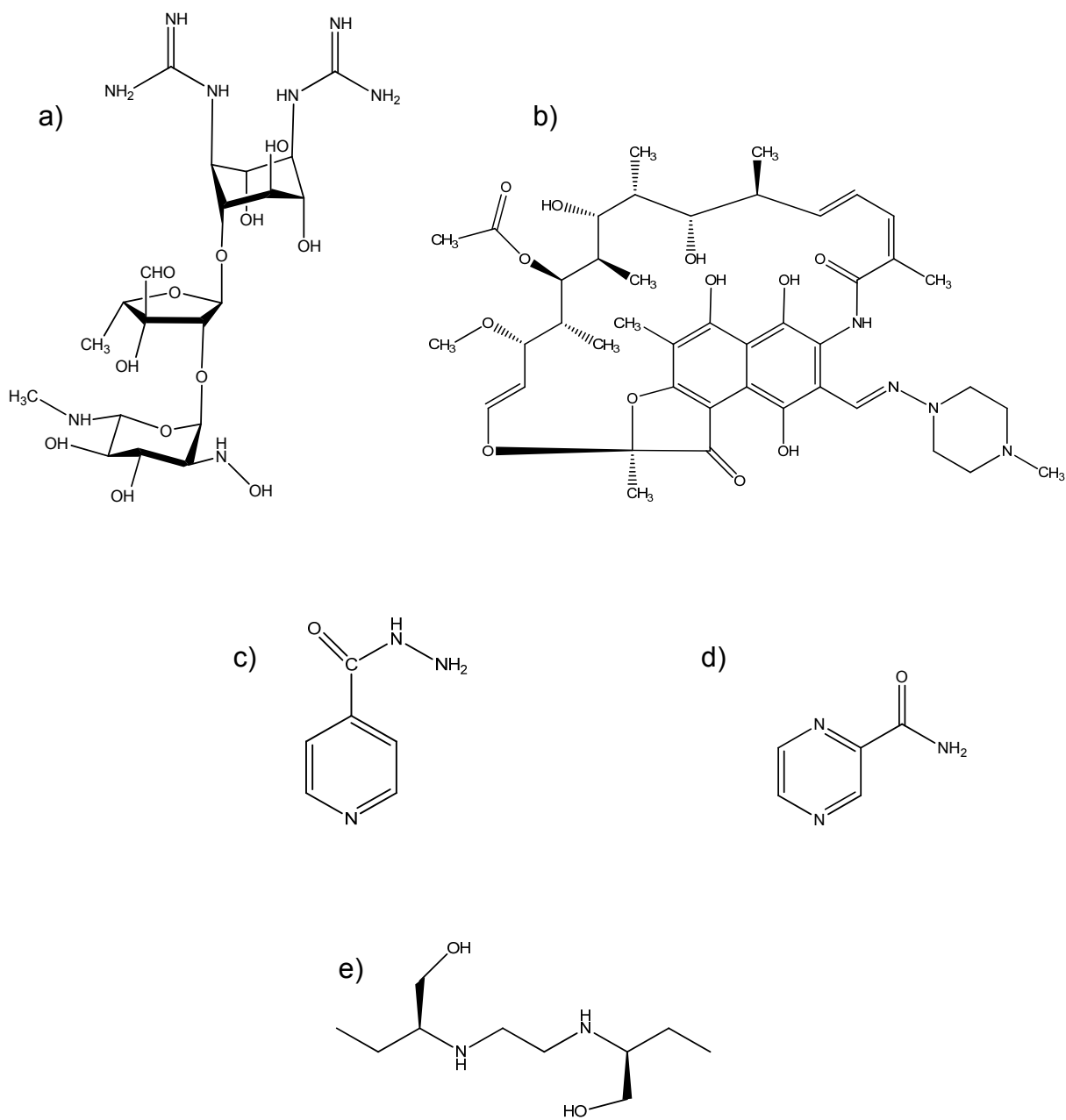


Figura 1. Estructura química de fármacos de primera línea. a) Estreptomina, b) rifampicina, c) isoniazida, d) pirazinamida y e) etambutol.

### **2.3. Mecanismo de acción de fármacos antituberculosos y generación de resistencia**

La isoniazida es un pro-fármaco que al ser oxidado por la catalasa-peroxidasa de la micobacteria produce un potente derivado capaz de bloquear la síntesis de los ácidos micólicos de la pared celular de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 1993). Si se origina mutación en el gen *kat G* que codifica para la enzima catalasa-peroxidasa se produce la resistencia contra la isoniazida. También se han observado mutaciones en el gen *inh A*, que sobre expresa la enzima reductasa de la proteína transportadora de ácidos grasos acilenólicos, compensando la acción inhibitoria de la isoniazida y provocando una resistencia de bajo nivel. La isoniazida es activa tan sólo frente a los bacilos en replicación activa, siendo su papel muy limitado en las poblaciones que replican lentamente, como las del caseum, o en las poblaciones latentes como las del interior de los macrófagos (tabla 1; Coll, 2003).

La rifampicina, al igual que las rifamicinas es un potente inhibidor de la síntesis de ARNm y por tanto de la transcripción genética (McClure *et al.*, 1978). Ataca a las células de *M. tuberculosis* metabólicamente activas y también en estado de latencia, excelente para los focos necróticos e interior de los macrófagos. Si hay mutación en la región que codifica para la polimerasa (*rpoB*) entonces se crea resistencia (tabla 1; Coll, 2003).

La pirazinamida se difunde pasivamente al interior de los macrófagos, donde es convertida en ácido pirazinoico por la pirazinamidasa, se acumula intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo actuando sobre su diana, una enzima implicada en la síntesis de los ácidos micólicos (Zimhony *et al.*, 2000). La pirazinamida solo afecta a los bacilos latentes en el interior de los macrófagos y es específica para *M. tuberculosis*. La resistencia contra pirazinamida es creada por mutaciones en el gen estructural (*pncA*) o en el promotor de la pirazinamidasa (tabla 1; Coll, 2003).

El etambutol inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana. La resistencia contra etambutol se asocia a cambios en una región genómica que



codifica arabinosil transferasa, relacionada con la síntesis de componentes de la pared celular (tabla 1; Telenti *et al.*, 1997; Coll, 2003).

La estreptomina es un antibiótico aminoglucósido que interfiere en la síntesis proteica bloqueando la traducción de ARNm tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica. El mecanismo conocido de resistencia es debido a la alteración de la diana sobre la que actúan los aminoglucósidos como consecuencia de las mutaciones cromosómicas (tabla 1; Musser, 1995; Coll, 2003).

**Tabla 1. Actividad, mecanismo de acción y concentración inhibitoria mínima de los fármacos antituberculosos de primera línea.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Actividad</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>
Isoniazida	Bactericida, bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	0.025-0.05
Rifampicina	Bactericida, bacilos metabólicamente activos, en estado de latencia y con crecimiento intermitente	Inhibición de la transcripción	0.005-0.2
Pirazinamida	Bactericida, bacilos en estado de latencia y con crecimiento intermitente	Desconocido	20.0
Etambutol	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis de la pared celular	1.0- 5.0
Estreptomina	Bacilos metabólicamente activos	Inhibición de la síntesis proteica	8.0

#### 2.4. Productos naturales como agentes alternativos contra *M. tuberculosis*

En química farmacéutica el término “producto natural” está reservado a los compuestos derivados del metabolismo secundario, el cual hace referencia a compuestos que no están involucrados en el desarrollo o mantenimiento de un organismo. Los productos naturales o metabolitos secundarios son específicos para muchas especies y muy a menudo son producidos para interactuar a nivel ecológico (Amsler, 2008). Los metabolitos secundarios no se producen bajo todas las condiciones, y en la mayoría de los casos se desconoce su función. Esos compuestos y sus derivados semisintéticos han sido fuente de novedosas estructuras y hoy en día son utilizados como agentes antimicobacterianos (tabla 2), como es el caso de la estreptomina, aislado de la bacteria *Streptomyces griseus* y la capreomicina, aislada de *Streptomyces capreolus* (Copp, 2003). Todos éstos son productos naturales utilizados en combinación con otros agentes antimicobacterianos como agentes de primera y segunda línea (Copp, 2003).

**Tabla 2. Productos naturales usados en combinación con fármacos antituberculosos de primera y segunda línea (Copp, 2003; Coll, 2003).**

Agente anti-TB	Tipo de compuesto	CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
<b>Estreptomina</b>	Aminoglucósido	0.5
<b>Kanamicina</b>	Aminoglucósido	6.0
<b>Amikacina</b>	Análogo semisintético de la kanamicina	1.0
<b>Capreomicina</b>	Péptido cíclico	5.0
<b>Vomicina</b>	Rifamicina sintética análoga de la rifampicina	4.0
<b>Rifabutin</b>	Rifamicina sintética análoga de la rifampicina	10.0
<b>Cicloserina</b>	Análogo de la D-alanina	10.0

Si consideramos que el ambiente marino, provee de un sinnúmero de escenarios para los organismos que habitan en él, no es de extrañar que los productos naturales marinos sean considerados una alternativa interesante en la búsqueda de nuevos agentes antimicobacterianos. Compuestos con actividad antimicobacteriana han sido aislados de esponjas, gorgonias y corales suaves, entre otros organismos de origen marino (Saravanakumar *et al.*, 2008). König *et al.* (2010) evaluó 39 compuestos de origen marino contra *M. tuberculosis* y *M. avium*. Ellos presentaron estructuras químicas muy diversas, como terpenos, compuestos aromáticos y alifáticos, alcaloides y esteroides. Del total, 15 de ellos fueron aislados de algas rojas, con concentraciones inhibitoria mínima en el rango de 16 a 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1 de un alga café, 3 de cianobacterias, 10 de esponjas de las cuales 7 presentaron una concentración inhibitoria mínima por debajo de los 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1 de un coral suave, 1 de una gorgonia, 3 de líquenes y 3 de origen semisintético. Estas interesantes estructuras químicas sirven de modelos o base para la síntesis de compuestos activos contra *M. tuberculosis* (Bakkestuen *et al.*, 2005).

Algunos de los productos naturales marinos recientemente descritos (tabla 3; Okunade *et al.*, 2004) con actividad antimicobacteriana pertenecen a las clases de los alcaloides (figura 2), flavonas, cumarinas, cromonas, chalconas, terpenoides, esteroides, saponinas, fenoles, polifenoles y péptidos (figura 3).

Pero el desarrollo de un fármaco antimicobacteriano va más allá de la actividad biológica de una molécula, son muchas las características que deben ser evaluadas en un compuesto activo, entre ellas su facilidad de síntesis, el peso molecular, debe ser lipofílico, no inducir resistencia contra otros fármacos existentes, estudios de eficacia y toxicidad *in vivo*, etc. Los esfuerzos de estas investigaciones llevaron en el 2009, veinte nuevos compuestos a estudios en fase pre-clínica y clínica y veinte más en fase de desarrollo (Hongmanee, 2009).

**Tabla 3. Productos naturales marinos antituberculosos.**

Organismo	Tipo de compuesto/ nombre	Actividad CMI ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Referencia
<i>Clathria (Thalysias) abietina</i>	Péptidos	5.7	Davis <i>et al.</i> , 2004
<i>Agelas nakamurai</i>	Alcaloide/ igelasina E y sus derivados sintéticos	1.56- 6.25	Bakkestuen <i>et al.</i> , 2005
<i>Aplysina gerardogreeni</i>	Alcaloide/ aerotionina	6.25- 25.0	Encarnación- Dimayuga <i>et al.</i> , 2003
<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	Alcaloides/ manadomanzaminas A, manadomanzaminas B	1.5-1.9	Copp & Pearce, 2007
<i>Pachychalina</i> sp.	Alcaloide/ ingenamina G	8.0	Copp & Pearce, 2007
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Diterpeno alcaloidal/ pseudoteroxasol	12.5	Rodríguez & Rodríguez, 2003
<i>Polysiphonia virgata</i>	Ácidos grasos/ ácido oleico, ácido linoleico, ácido láurico, ácido mirístico	25-50	Saravanakum ar <i>et al.</i> , 2008.
<i>Plocamium cartilagineum</i>	Monoterpeno halogenado	32.0	Copp, 2003
<i>Laurencia elata</i>	Terpeno/ elatol	32.0	Copp, 2003
<i>Laurencia obtusa</i>	Terpeno/ descloroelatol	32.0	Copp, 2003
<i>Sargassum ringoldianum</i> , <i>Lessonia nigrescens</i>	Esterol/ saringosterol epímero 24S, epímero 24R	0.125-1.0	Wächter <i>et al.</i> , 2001

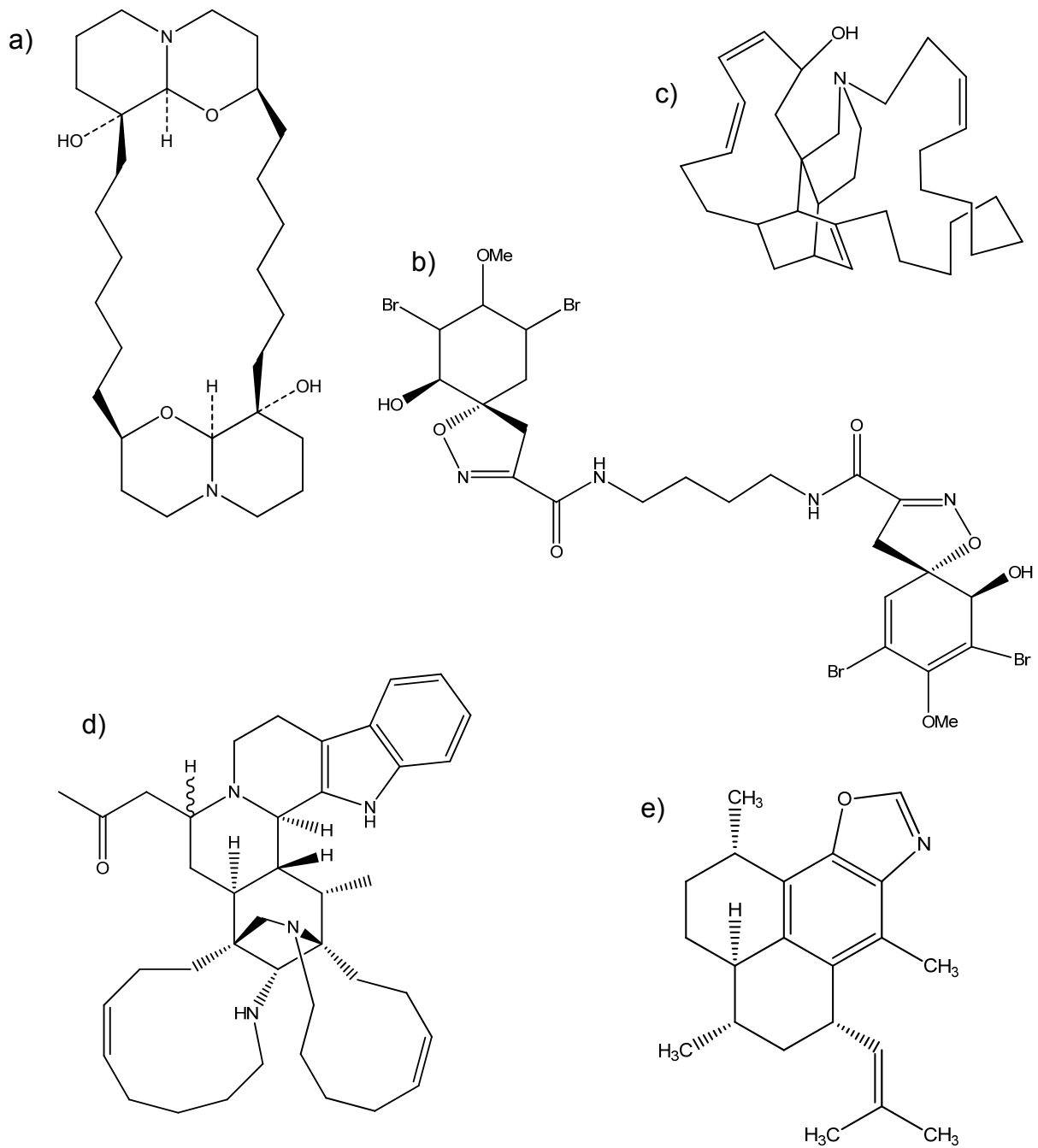


Figura 2. Alcaloides marinos antimicrobianos. a) Araguspongina C de la esponja *Xestospongia exigua*, b) aerotonina de la esponja *Aplysina gerardogreeni*, c) ingenamina G de la esponja *Pachychalina* sp., d) manadomanzamina A de la esponja *Acanthostrongylophora* sp. y e) pseudopteroxazol de la gorgonia *Pseudopterozorgia elisabethae*.

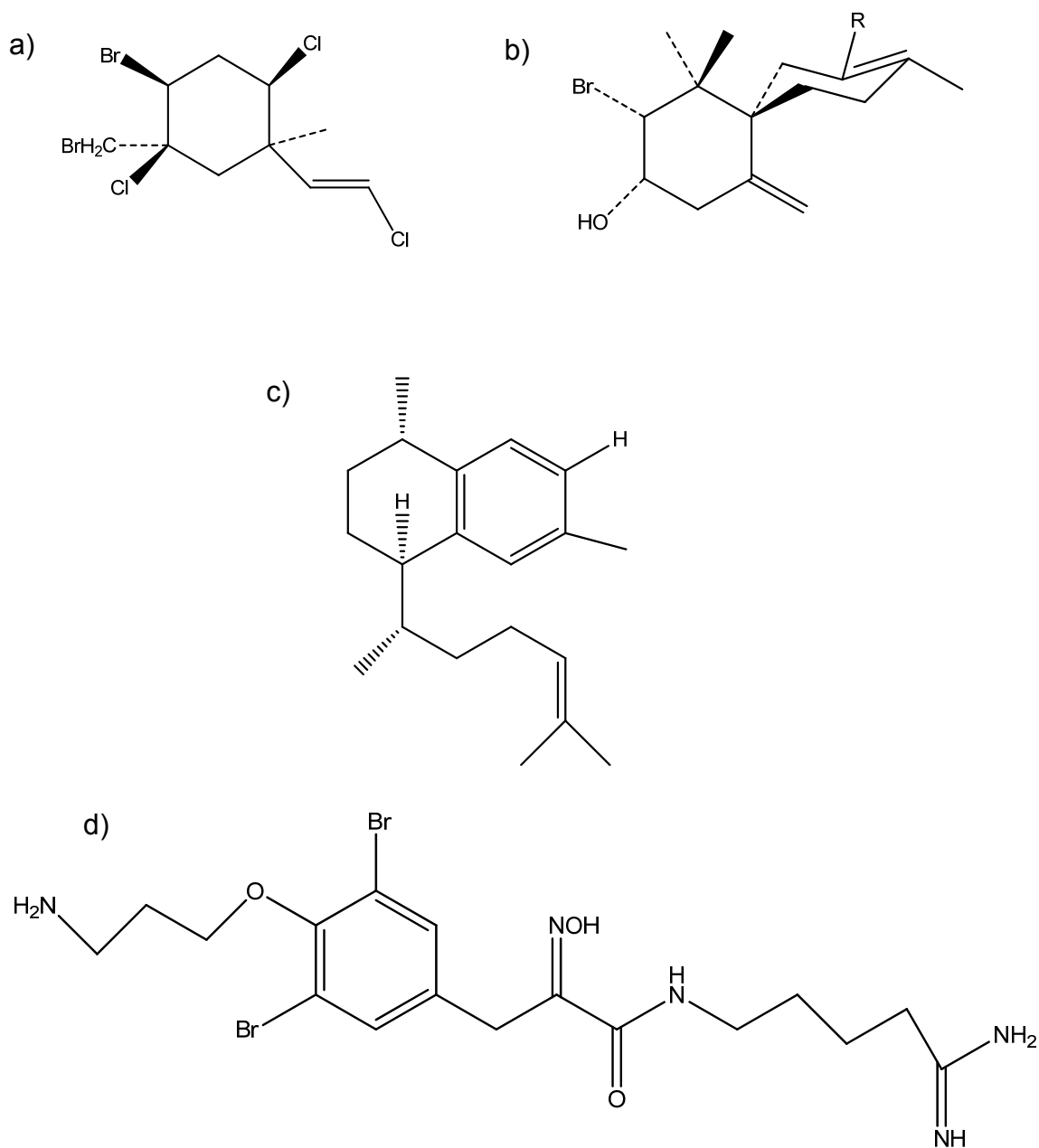


Figura 3. Terpenos y péptidos marinos antimicrobianos. a) Monoterpeno halogenado del alga roja *Plocamium cartilagineum*, b) terpeno elatol del alga roja *Laurencia elata*, c) diterpenoide del coral *Pseudopterogorgia elisabethae* y d) péptido oceanapia de la esponja *Oceanapia* sp.

## 2.5. Relevancia del alga *Sargassum horridum*

La base de datos *AlgaeBase* registra 874 nombres de especies para el género *Sargassum*, de los cuales 340 están reconocidos taxonómicamente (Guiry y Guiry, 2011), y al menos 62 especies han sido estudiadas por su impresionante productividad y diversidad de productos naturales (Ayyad *et al.*, 2011). La variedad de estructuras químicas aisladas de este género incluye plastoquinonas, hidroquinonas, cromenoles, cromenones, esteroides, glicéridos, shikimatos como fenilalanina, tirosina, triptófano y sus derivados, diterpenos complejos, metabolitos de origen terpeno-aromáticos, además de ácidos grasos y fenoles (Pesando, 1990; Amsler, 2008; Ayyad *et al.*, 2011). Estos metabolitos exhiben diversa actividad biológica, que favorecen al alga como estrategias de supervivencia, pero que también han probado tener aplicaciones biotecnológicas. Algunas algas producen metabolitos secundarios atractantes de gametos para favorecer su fecundación (Lozano, 1991), poseen actividad antimicrobiana que evita la colonización de organismos epifitos o bacterias degradadoras (Bhadury & Wright, 2004), e incluso son determinantes en la competencia por el espacio al producir sustancias que afectan la predilección de los herbívoros por estas especies. Un claro ejemplo es el de los florotaninos o polifenoles, exclusivos de las algas cafés, estos 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 antifúngica (Amsler, 2008). Entre sus aplicaciones farmacológicas podemos citar actividad antibiótica, anti-VIH, anticoagulante, antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante (Ayyad *et al.*, 2011).

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 presenta una reproducción sexual o asexual. Estas características, junto con la capacidad de flotación que le proveen sus aerocistos, hacen que se disemine fácilmente, se extienda y reproduzca 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, Guerrero y a lo largo de ambas costas de la Península de Baja California (Castillo-Suárez, 2008).

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).

*Sargassum horridum* fue descrita por primera vez por Setchell y Gardner en 1924 durante uno de los primeros estudios de algas en Norteamérica, incluyendo el Golfo de California (figura 4). 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 *Sargassum 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 puede formar bosques en arrecifes rocosos (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, Baja California Sur, demostró la presencia de dos temporadas bien definidas, de marzo a junio con máximos de biomasa ( $0.323 \text{ kg/ m}^2$ ), y de mínima biomasa ( $0.126 \text{ kg/m}^2$ ) de julio a enero (Paul-Chávez, 2005). 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. El 94% de los mantos en la Bahía de La Paz pertenecen a *S. horridum* y el 4% de *Sargassum lapazeanum*, y dado que en una reevaluación taxonómica Paul-Chávez (2005) determinó que *S. horridum* y *S. sinicola* son la misma especie, se puede considerar que *S. horridum* es la especie más común del género *Sargassum* en la Bahía de La Paz.





TYPE OF *Sargassum horridum* Setchell & Gardner

Proc. Calif. Acad. Sc., ser. 4, 12: 734, pl. 20: figs. 65, 66. 1924.



*oogonium few or no  
antheridia*

ALGAE OF Gulf of California  
*Sargassum horridum* S. + G.  
Type  
La Paz Marchant, 22

Figura 4. Fronda de *Sargassum horridum*. Tomado de Paul- Chávez (2005).

## 2.6. Antecedentes de compuestos aislados en el género *Sargassum*

Con la finalidad de evaluar el potencial farmacológico de las algas marinas en la península de Baja California, Muñoz-Ochoa *et al.* (2010) evaluaron 62 especies algales contra *M. tuberculosis* y otras bacterias patógenas resistentes a antibióticos con mecanismos de resistencia conocidos [*Staphylococcus aureus* (ATCC BAA-42), *Streptococcus pyogenes* (ATCC BAA-946) y *Escherichia coli* (ATCC BAA-196)]. El 80% de los extractos mostraron actividad antimicrobiana contra los microorganismos de prueba y un 5% mostró actividad antimicobacteriana. El extracto crudo de *S. horridum* colectado en la Bahía de La Paz, B.C.S., fue el único que logró revertir la resistencia de *S. aureus* y *S. pyogenes* a la ampicilina y eritromicina. En este mismo estudio, el extracto crudo de *S. horridum* mostró fuerte actividad contra *M. tuberculosis in vitro* (CMI= 6.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Del extracto activo se aislaron fucosterol y ácido mirístico (figura 5), solo éste último mostró actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294, CMII= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A pesar de estos resultados, la actividad del extracto crudo no se atribuyó exclusivamente a la presencia de ácido mirístico, sino que el autor propone un efecto sinérgico entre los componentes del alga (Muñoz-Ochoa, 2010).

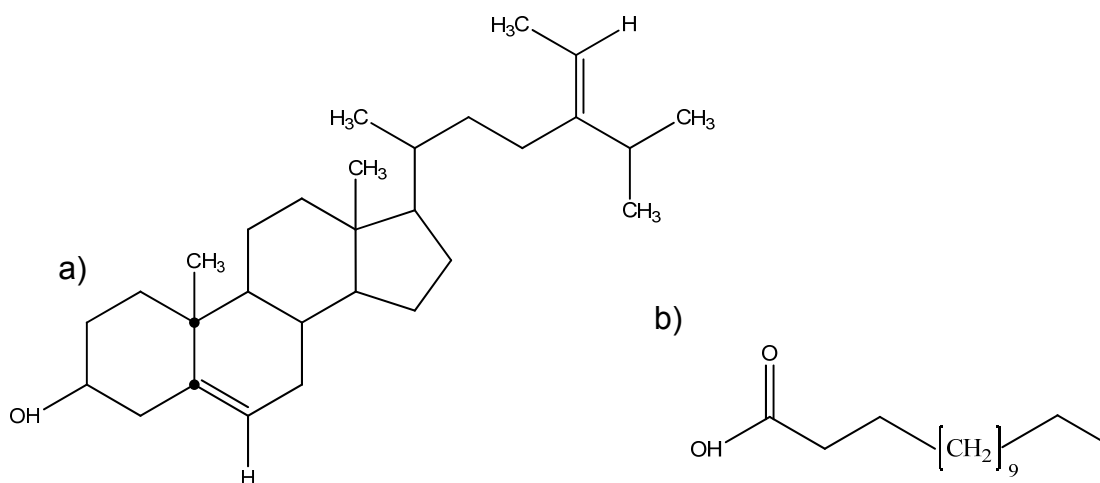


Figura 5. Estructura química de los compuestos aislados de *S. horridum*: a) Fucosterol, b) ácido mirístico.

Tomando en cuenta la propuesta de Paul-Chávez (2005) consideramos el antecedente de un estudio en *S. sinicola*, donde se evaluó como recurso de explotación comercial la variación estacional de alginatos, manitol, fibra cruda y yodo. Se encontró que la concentración de estos compuestos no se ve afectado por la concentración de nutrientes en el medio, sin embargo, su concentración decrece con la senescencia del alga (Rodríguez-Montesinos *et al.*, 2008). Previamente se reportó actividad antimicrobiana en extractos crudos de *S. horridum* en la Bahía de La Paz contra *Bacillus subtilis* pero sin la identificación de los compuestos responsables (Castro-Reyes, 1997).

La literatura científica y bases de datos especializadas en productos naturales, como; Dictionary of Natural Products® y MarinLit® reportan que el género *Sargassum* es fuente de diversos compuestos bioactivos. No todas las moléculas aisladas fueron evaluadas biológicamente, principalmente los primeros compuestos descritos, ya que el objetivo de esos estudios era de carácter meramente químico. Se recolectó información sobre las estructuras químicas reportadas en el género de *Sargassum*, ya los estudios sobre *S. horridum* son escasos (tabla 4).

El antecedente más importante de actividad contra *M. tuberculosis* en el género *Sargassum* es el fitoesterol saringosterol aislado de *Sargassum asperfolium* en el Golfo de Suez, donde también se aisló otro metabolito esteroidal, la saringosterona (Ayyad *et al.*, 2003; figura 6). El grupo funcional cetónico en el esqueleto de la saringosterona, sugiere es un derivado oxidado del saringosterol. No hay reportes de actividad antimicobacteriana de la saringosterona. El saringosterol se aisló anteriormente en otra alga café *Lessonia nigrescens*, donde se reportó su actividad contra *M. tuberculosis* (CMI=  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), siendo así uno de los compuestos más activos entre los productos naturales antimicobacterianos reportados en el periodo de 1990 a 2003 (Copp, 2003; Hongmanee, 2009). Esta molécula se sintetizó a partir de fucosterol de la misma *L. nigrescens* y se reportó que tanto el compuesto aislado, como el semisintético exhiben la misma actividad biológica y ambos, son una mezcla 1:1 de sus epímeros 24R y 24S. Este mismo estudio, reveló que al separar los

epímeros, el 24R es ocho veces más activo que el 24S, con una CMI de 0.125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente (Wätchter *et al.*, 2001).

**Tabla 4. Compuestos bioactivos aislados del género de *Sargassum*.**

Tipo de compuesto	Fuente	Molécula	Actividad biológica	Referencia
Ácido graso	<i>S. horridum</i>	ácido mirístico	antituberculoso, CMI=50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Muñoz-Ochoa, 2010.
Ácidos grasos derivados de monoglicéridos	<i>S. sagamianum</i>	1-octadecatetraenoil y once derivados sintéticos de éste.	inhibición enzimática contra COX-2 y sPLA2-IIA	Chang <i>et al.</i> , 2008.
Esterol	<i>S. asperfolium</i>	saringosterol y sus epímeros 24R y 24S	antituberculoso, CMI=0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Wätchter <i>et al.</i> , 2001
Esterol	<i>S. horridum</i>	fucosterol	antioxidante	Muñoz-Ochoa, 2010.
Naftoquinona	<i>S. kjellmanianum</i>	kjellmanianona	activa contra <i>E. coli</i> K12, <i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i>	Nakayama <i>et al.</i> , 1980; Nozaki <i>et al.</i> , 1995; Faulkner, 1984.
Plastoquinona	<i>S. sagamianum</i> var. <i>yezoense</i>	sargahidroquinona	antioxidante	Segawa & Shirahama, 1987.
Plastoquinona	<i>S. sagamianum</i> var. <i>yezoense</i>	yesoquinona	antioxidante	Segawa & Shirahama, 1987.
Plastoquinonas	<i>S. micracanthum</i>	2-geranilgeranil-6-metilbenzoquinona.	antioxidante y	Iwashima <i>et al.</i> , 2005.
Plastoquinonas	<i>S. micracanthum</i>	derivado hidroquinónico de 2-geranilgeranil-6-metilbenzoquinona.	antioxidante y antiviral	Iwashima <i>et al.</i> , 2005.
Carotenoide	<i>Sargassum</i> sp.	fucoxantina	antioxidante y antitumoral	Ayyad <i>et al.</i> , 2011.
Isoprenoide cromenol	<i>S. tortile</i>	sargatriol	citotóxico	Numata <i>et al.</i> , 1991.
Cromeno	<i>S. micracanthum</i>	derivado cromeno de 2-geranilgeranil-6-metilbenzoquinona	antioxidante y antiviral	Iwashima <i>et al.</i> , 2005.
Diterpeno alicíclico	<i>S. tortile</i>	crinitol	inhibe el crecimiento de insectos	Kubo <i>et al.</i> , 1985.
Ftalato	<i>S. wightii</i>	diocil-ftalato	antibacteriano	Sastry & Rao, 1995.
Sulfoglicerolípido	<i>S. wightii</i>	1-0 palmitoil- 3-0(6'-sulfo- $\alpha$ -quinovopiranosil)-glicerol.	antibacteriano. Activo contra <i>Xanthomonas oryzae</i> v. <i>oryzae</i>	Arunkumar <i>et al.</i> , 2005.

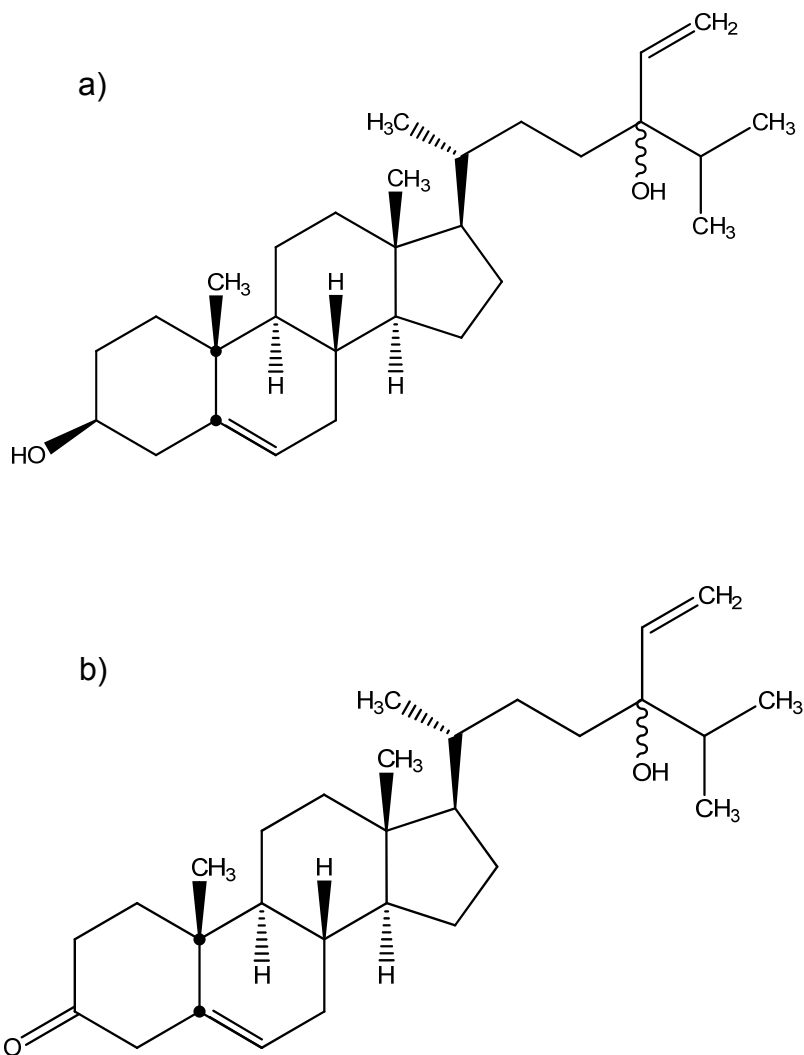


Figura 6. Esteroles aislados en el género *Sargassum*. a) Saringosterol, b) saringosterona.

Destacan los reportes de estructuras quinólicas, como naftoquinonas, plastoquinonas e hidroquinonas (Nakayama *et al.*, 1980; Faulkner, 1984. Nozaki *et al.*, 1995; Iwashima *et al.*, 2005) con actividad antibacteriana y antioxidante (figura 7). Esta información es muy interesante, considerando que las quinolonas son conocidos agentes antituberculosos, especialmente las fluoroquinolonas y algunos

son usados como fármacos de segunda línea, como es el caso de la ciprofloxacina, ofloxacina, esparfloxacina y levofloxacina (Coll, 2003).

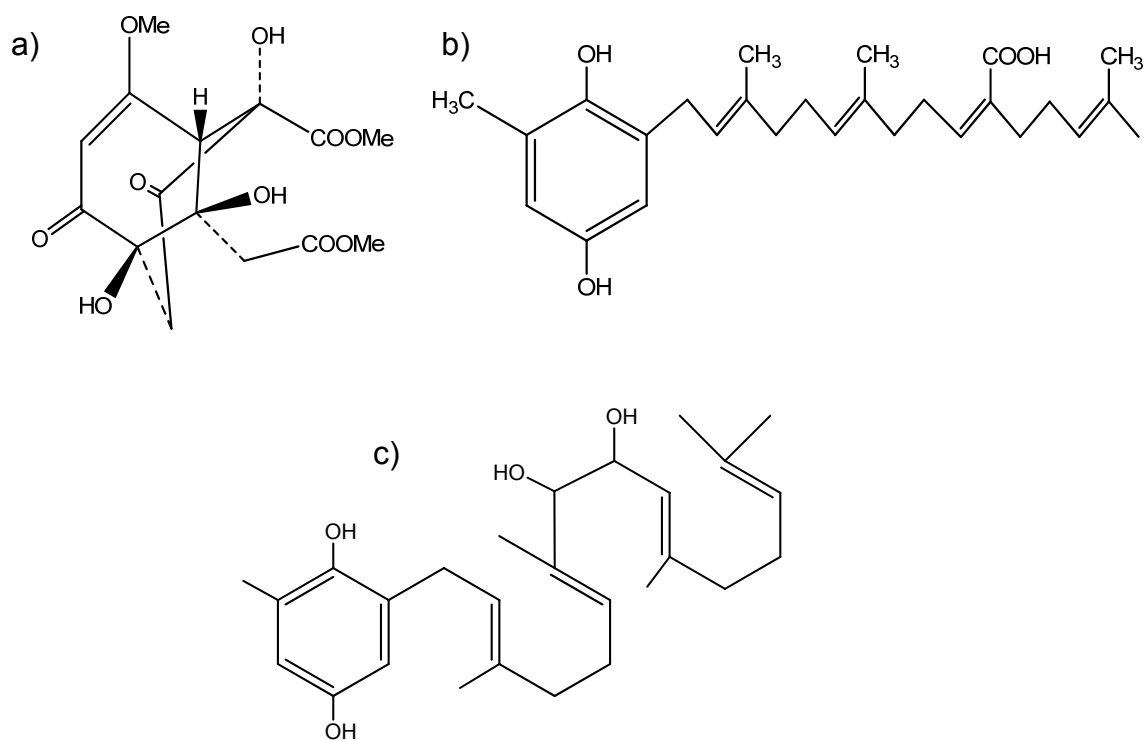


Figura 7. Estructuras quinólicas aisladas del género *Sargassum*. a) Naftoquinona, sargassumcetona; b) plastoquinona, ácido sargahidroquinóico y c) benzoquinona, sargatetraol.

La actividad antituberculosa del ácido mirístico reportado por Muñoz-Ochoa (2010) es el único reporte de ácidos grasos antituberculosos en el género de *Sargassum*, pero la actividad de estos compuestos y de los ácidos grasos en general como antimicrobiano y principalmente como antimicrobiano, ya ha sido documentado en muchos organismos, ya que los ácidos grasos son metabolitos primarios (Rosell & Srivastava, 1987; Carballeira *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2007; Carballeira, 2008). Sin embargo estos forman parte estructural de muchos metabolitos secundarios e influyen en su actividad, como es el caso de los ácidos

grasos poliinsaturados derivados de monoglicéridos (figura 8) caracterizados en *Sargassum sagamianum*. Estos mostraron significativa inhibición de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> y ciclooxigenasa-2, las cuales se encuentran involucradas en procesos inflamatorios, la enfermedad de Alzheimer, hipertensión y fallas en el corazón (Chang *et al.*, 2008).

Entre otras estructuras con actividad antimicrobiana podemos citar un sulfoglicerolípido y un éster de ftalato en *Sargassum wightii*, el crinitol, un diterpeno alicíclico con propiedades insecticidas.

Todo esto nos da un pequeño panorama químico de lo que podemos esperar en el estudio de ésta especie, y revela la ventana de oportunidad que representa su estudio.

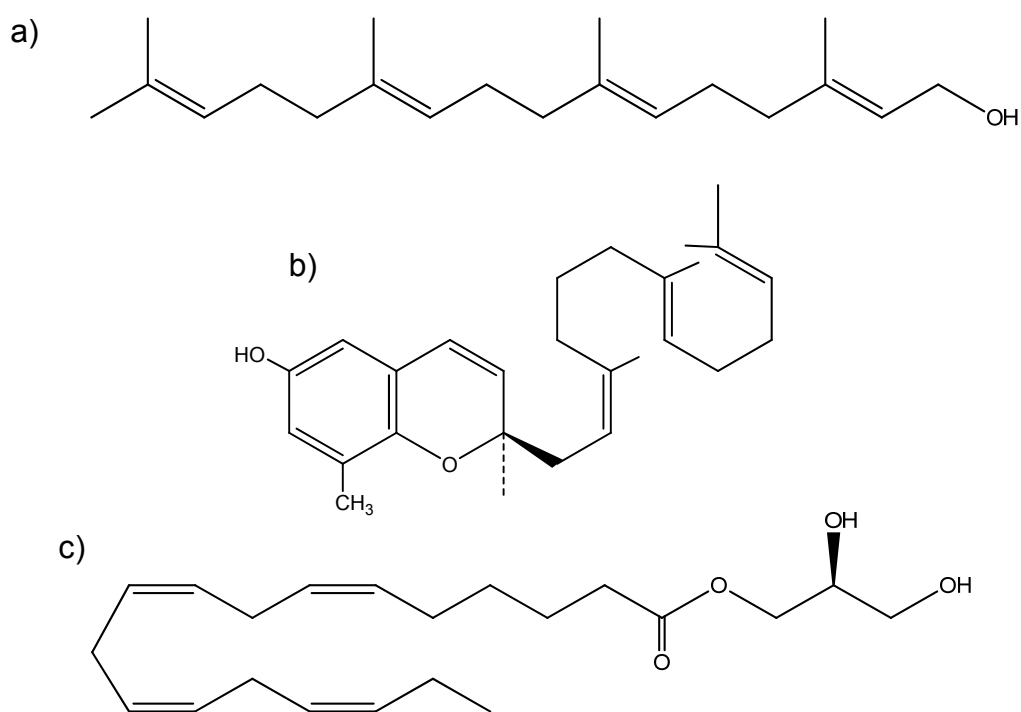


Figura 8. Terpenos, cromenoles, ácidos grasos poliinsaturados en el género *Sargassum*. a) Crinitol, b) sargatriol, c) 1-octadecatetraoilglicerol.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En los últimos 30 años no han sido introducidos nuevos agentes antimicobacterianos, por lo que es urgente la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes con tiempos de tratamiento más cortos y económicos (Gautam *et al.*, 2007). El desafío de nuevos descubrimientos y la urgente necesidad de nuevos fármacos antituberculosos de fuentes naturales requieren de una investigación multidisciplinaria, micobacteriología de vanguardia y nuevas herramientas químicas en el área de productos naturales (Pauli *et al.*, 2005). Los organismos marinos son considerados una importante fuente de sustancias con potencial farmacéutico. En este sentido, numerosas revisiones señalan a las algas como uno de los principales productores de estos compuestos (Magallanes *et al.*, 2003).

Entre los esfuerzos por aportar nuevos conocimientos en el estudio de compuestos activos contra *M. tuberculosis*, ya se han identificado un número de especies algales en la península de Baja California con potencial antimicobacteriano (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2010), entre ellas, el alga café *S. horridum*. En dicho estudio no fue posible determinar el o los compuestos responsables de tan potente actividad en el extracto crudo, lo cual sucede con frecuencia en el aislamiento de productos naturales. El aislamiento e identificación de compuestos activos no es una tarea fácil, ya sea por la pérdida de estabilidad en los compuestos bajo las condiciones de fraccionamiento, por la baja abundancia natural del compuesto presente en el momento del muestreo, la pérdida de efectos aditivos o sinérgicos entre constituyentes análogos, además del riesgo de “reaislamiento” de compuestos conocidos (Cos *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008).

Sin embargo, tomando en cuenta la abundancia de *S. horridum*, su accesibilidad, los antecedentes de actividad biológica en el género y la escasez de estudios en la especie, consideramos que era necesario realizar un estudio más profundo sobre *S. horridum* como fuente de compuestos activos contra *M. tuberculosis*, adoptando estrategias diferentes y optimizando la búsqueda en base a los antecedentes químicos del género de *Sargassum*.



## **4. HIPÓTESIS**

### **4.1 Hipótesis conceptual**

En la literatura científica se encontró que el alga *S. asperfolium* recolectada en el Golfo de Suez contenía el fitoesterol saringosterol y un derivado de éste, la saringosterona (Ayyad *et al.*, 2003). El saringosterol se aisló en otras algas café como *Lessonia nigrescens* y se reportó su actividad contra *M. tuberculosis* (Wächter *et al.*, 2001). En base en lo anterior el saringosterol y la saringosterona son los compuestos responsables de la actividad de *S. horridum* contra *M. tuberculosis*.

### **4.2 Hipótesis alternativa**

Si los fitoesteroles saringosterol y saringosterona no son los compuestos responsables de la actividad antimicobacteriana en *S. horridum*, entonces su actividad se debe a la presencia ácidos grasos o quinonas bioactivas, las cuales se han aislado de varias especies del mismo género.

## 5. OBJETIVO

### 5.1. Objetivo General

Identificar el o los compuestos responsables de la actividad contra *M. tuberculosis* observada en el extracto crudo etanólico del alga café *S. horridum* recolectada en la Bahía de La Paz (B.C.S., México).

### 5.2. Objetivos Particulares

- 1) Obtener fracciones con actividad biológica *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv (CMI < 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a partir de un extracto crudo etanólico de *S. horridum*.
- 2) Determinar la presencia o ausencia del fitoesterol saringosterol, o su derivado saringosterona en las fracciones con actividad antituberculosa de *S. horridum*.
- 3) Implementar procesos para la rápida identificación de compuestos conocidos bioactivos diferentes de la saringosterona y el saringosterol en las fracciones que resulten activas. Como parte del estudio químico del alga, purificar y elucidar la estructura química de los compuestos que se obtengan como consecuencia del fraccionamiento del extracto.
- 4) Determinar la naturaleza química de él o los principios activos en las fracciones que presenten actividad antimicobacteriana.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Recolecta de *S. horridum*

El alga fue recolectada en San Juan de la Costa ubicada en Bahía de La Paz, B.C.S., México ( $24^{\circ}22'00$  norte y  $110^{\circ}42'00$  oeste) en el mes de mayo del 2006 entre 1 y 2 m de profundidad sobre sustrato rocoso (figura 9). La identificación taxonómica estuvo a cargo del Dr. Rafael Riosmena Rodríguez del Laboratorio de Ficología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. La muestra se limpió con agua dulce para eliminar detritus y material extraño. Posteriormente las algas fueron secadas al sol, molidas y almacenadas en recipientes herméticos a  $-20^{\circ}$  C hasta el momento de su extracción. La muestra se etiquetó en el laboratorio como <06-009> *Sargassum horridum*.

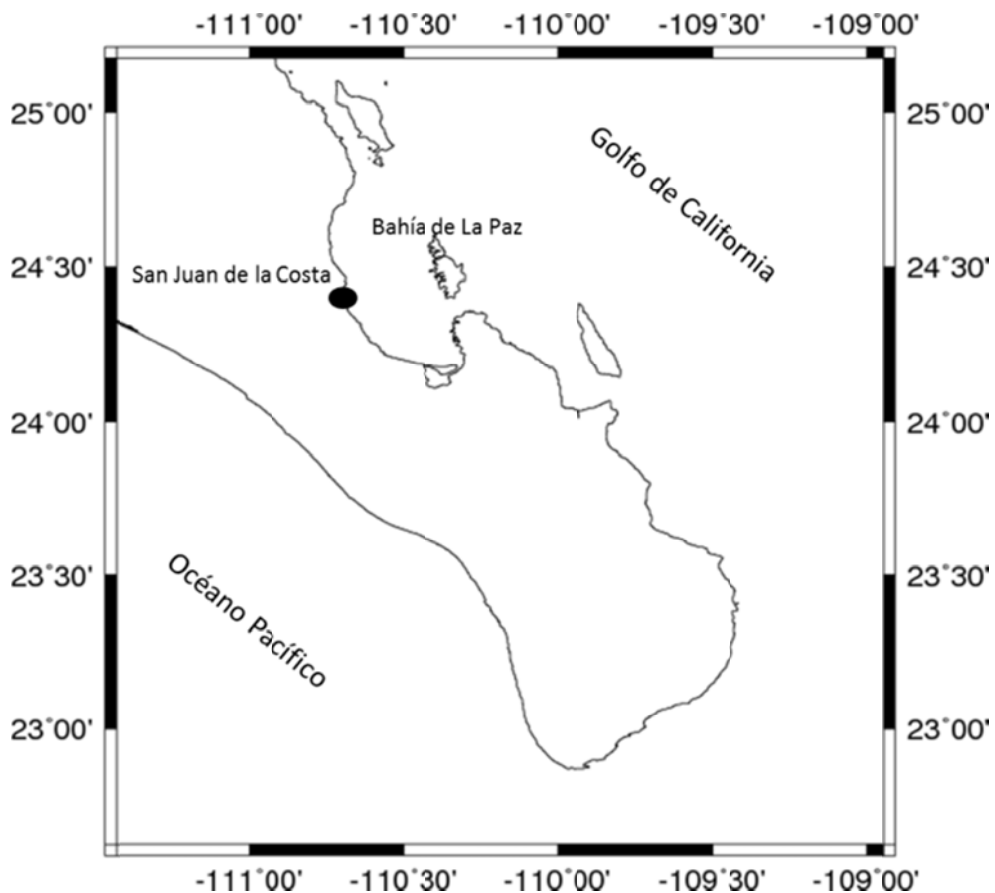


Figura 9. Ubicación geográfica de San Juan de la Costa en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, México.

## 6.2. Extracción y fraccionamiento

A partir del alga seca (1.55 kg de *S. horridum*) se obtuvo un extracto etanólico usando 3 L de etanol destilado (EtOH) vía maceración por 24 h a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación ocasional. Se recuperó el residuo mediante filtración. El procedimiento de extracción se repitió 3 veces más. Las cuatro soluciones obtenidas se unieron y se concentraron con ayuda de un rotavapor a 40°C a presión reducida. El extracto de origen etanólico se etiquetó como <06-009-41> *S. horridum*. El extracto etanólico se disolvió en diclorometano (DCM) y se filtró utilizando papel filtro con la finalidad de retirar material inorgánico, de esta manera se obtuvo una fracción soluble y una insoluble. Se realizó una extracción líquido-líquido a la fracción soluble en DCM con agua destilada (H<sub>2</sub>O), con la finalidad de extraer las sales que aún permanecieran en el extracto, obteniendo una fracción orgánica ESL1F1 y una fracción acuosa ESL1F4. El residuo del filtrado inicial se solubilizó en etanol destilado (EtOH) y se filtró de nuevo, se concentraron las fracciones identificándose la fracción etanólica como ESL1F2 y el material insoluble como ESL1F3 (figura 10). Todas las fracciones se concentraron a sequedad a presión reducida, se pesaron y almacenaron en refrigeración en viales.

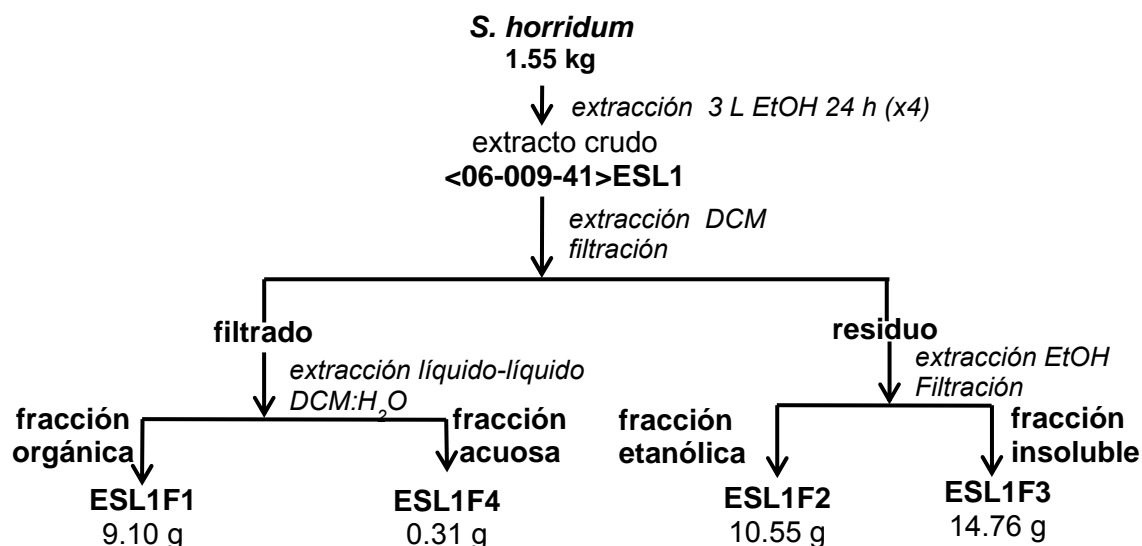


Figura 10. Fraccionamiento primario de *S. horridum* <06-009-41>.

La fracción insoluble de *S. horridum* ESL1F3 de consistencia seca y granulosa se analizó mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) identificando señales características de un compuesto conocido como manitol. Se sometió a cristalización para aislar el compuesto revelado en el IR pero la concentración en la fracción no fue suficiente. Se realizó un segundo experimento de extracción utilizando 1 kg de alga seca de una recolecta diferente (*S. horridum* <09-007>), antes de la extracción con EtOH se llevaron a cabo extracciones con disolventes y mezclas de polaridad ascendente con la finalidad de retirar pigmentos y obtener mayor definición en el fraccionamiento de acuerdo a la naturaleza polar de los compuestos. Las extracciones se llevaron a cabo vía maceración en oscuridad, a temperatura ambiente con agitación ocasional usando 3 L de disolvente, durante 7 días, repitiendo dos veces más dicho procedimiento. Al final de cada extracción se filtró el disolvente, se unieron los extractos y se secaron a presión reducida, etiquetándose de acuerdo al disolvente utilizado (figura 11).

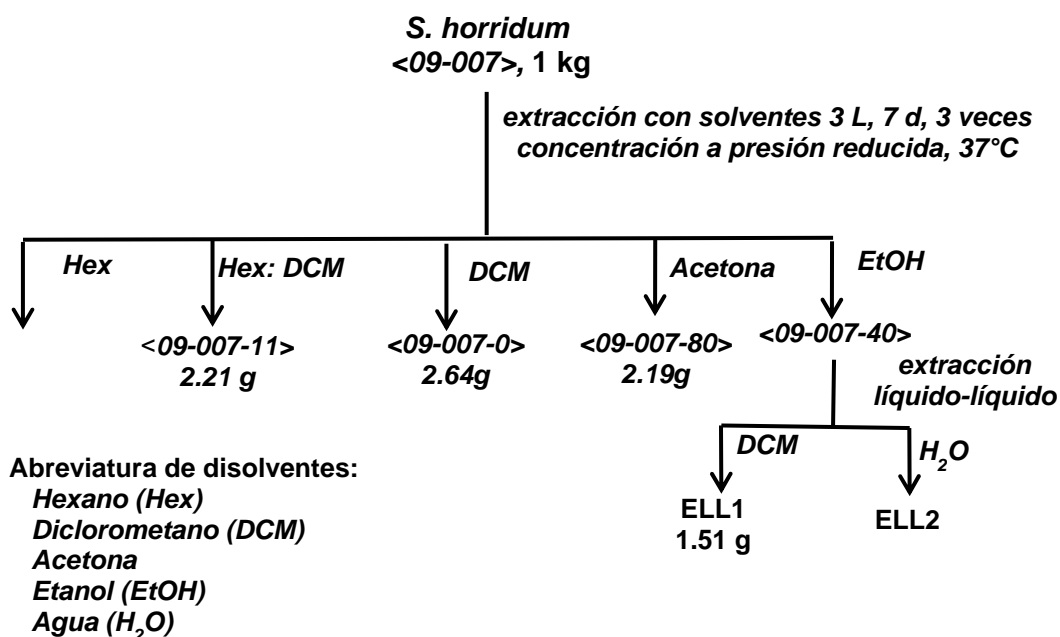


Figura 11. Esquema de extracción de *S. horridum* recolecta <09-007>.

El extracto etanólico se particionó mediante extracción líquido-líquido con DCM y H<sub>2</sub>O. En el extracto acuoso se observó cristalización espontánea, por lo que realizamos numerosos pasos de cristalización adicionando EtOH y separando los cristales de las aguas madres. De esta manera se obtuvieron cristales más grandes y en mayor cantidad, los cuales se identificaron como compuesto 1 (figura 12).

Se comparó la fracción acuosa del primer experimento con los cristales del segundo experimento de extracción (compuesto 1) mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron cromatoplaques de sílica gel adheridas a un soporte de aluminio (0.2 mm de espesor, diámetro de poro 60 Å, con indicador fluorescente a 254 nm de longitud de onda) y EtOH al 100% como fase móvil. Se reveló mediante la aspersion de una solución de ácido sulfúrico al 10% y posterior calentamiento de la cromatoplaque.

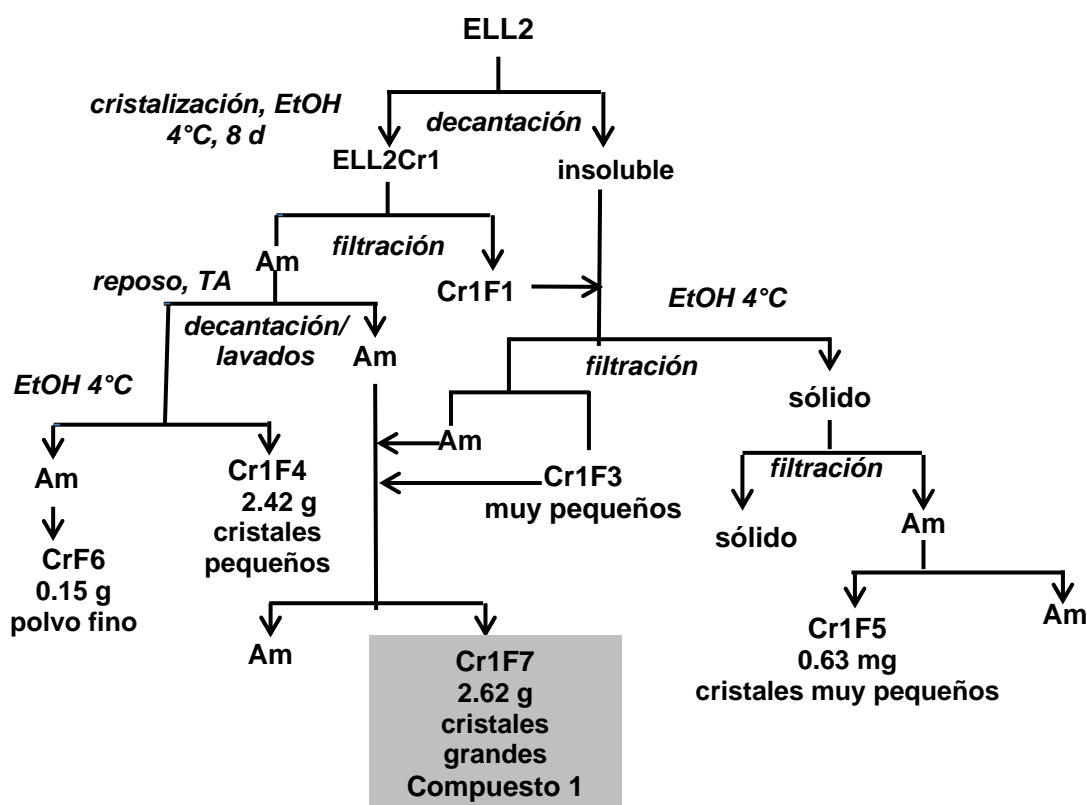


Figura 12. Obtención de manitol por cristalización a partir del extracto acuoso de *S. horridum* <09-007>: Am = aguas madres, Cr = cristales.

Posterior al primer experimento, se fraccionó ESL1F1 (9.10 g) usando sílica gel (27 g, relación muestra: sílica de 1:3, Bulk Microparticle Media para HPLC, 60 Å, tamiz 230-400 ASTM) en columna cromatográfica (CC, 2.8 cm de diámetro, 57 cm de altura) usando una mezcla de DCM: EtOH y un gradiente de polaridad ascendente. El sistema de elución se seleccionó ensayando con diversos disolventes mediante CCF. Se monitoreó el fraccionamiento usando CCF, las fracciones semejantes se unieron, se secaron y almacenaron en viales previamente pesados, de esta forma se obtuvieron 19 fracciones.

Al considerar el grado de pureza y rendimiento, se seleccionó la fracción CCIF17 para su purificación. Debido a su alta polaridad, se procedió a fraccionar mediante cromatografía de fase reversa. Se realizaron tres columnas cromatográficas consecutivas (CC2, CC3, CC4) usando una columna Lobar C18 (Merk Lobar 2240-10 LiChroprep RP-18, 40-63  $\mu\text{m}$ , columna pre-empacada, calibre A, para cromatografía líquida), con bomba peristáltica y como eluyente mezclas de MeOH: H<sub>2</sub>O (2:8, 3:7, 1:1, 7:3, 8:2, 10:0) en gradiente. Se unieron las fracciones con mayor concentración del compuesto y menos impurezas y se determinó continuar la purificación mediante fase normal usando sílica gel (44 mg de muestra/ 9 g Si gel, Bulk Microparticle Media para HPLC, 60 Å, tamiz 230-400 ASTM) en CC (1.0 cm de diámetro, 24.5 cm de altura) usando mezclas de DCM: MeOH (98:2, 95:5, 9:1, 7:3). Para optimizar la separación de los compuestos se seleccionó el sistema de elución de mejor resolución y se fraccionaron nuevamente en fase normal usando un sistema de elución isocrático DCM: MeOH en proporción 8:2 (20 mg de muestra/ 6 g Si gel, Bulk Microparticle Media para HPLC, 60 Å, tamiz 230-400 ASTM) en CC (1.0 cm de diámetro, 20 cm de altura). A partir de este fraccionamiento se aisló el compuesto 2 (figura 13).

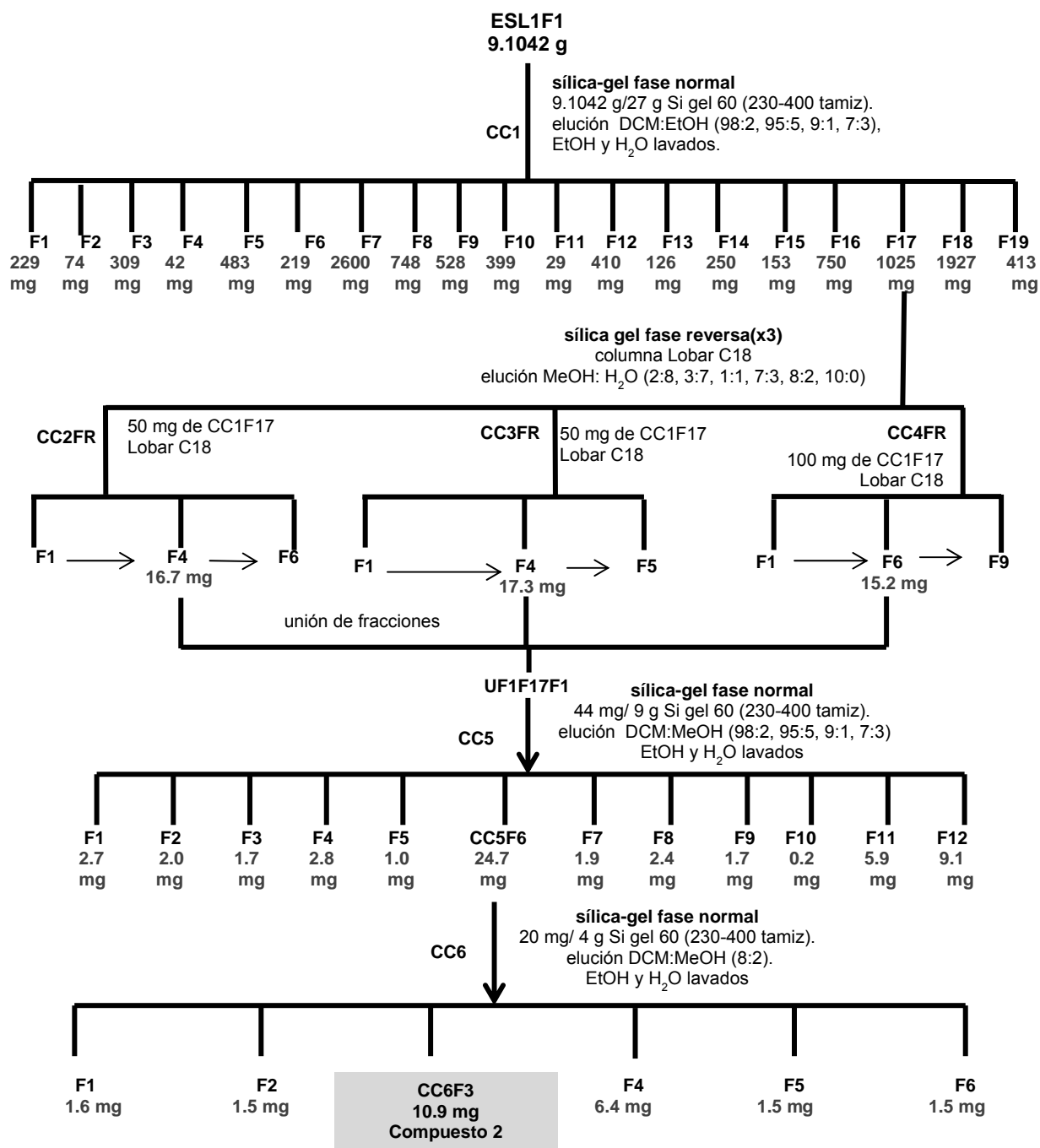


Figura 13. Esquema de fraccionamiento y purificación del compuesto 2 de CC6F3.



### 6.3. Ensayo de actividad contra *M. tuberculosis* por el micrométodo de Alamar azul (MABA)

Para la evaluación de la actividad antimicobacteriana se empleó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), la cual es una cepa de referencia sensible a todos los agentes antituberculosos de primera línea disponibles (estreptomina, isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida; Chakroborty, 2011). La actividad de extractos y fracciones se determinó usando el ensayo de microdilución en placa con azul de Alamar (microplate assay blue alamar) modificado por Molina-Salinas *et al.* (2006).

La cepa de prueba fue cultivada a 37°C en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson) suplementado con 0.2% de glicerol y 10% de ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa (Becton Dickinson) hasta alcanzar crecimiento logarítmico. Cada cultivo fue diluido hasta lograr una concentración celular de aproximadamente  $6 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias·mL<sup>-1</sup>, la cual fue determinada comparando la suspensión con un patrón no. 1 de McFarland realizado con un nefelómetro.

Los extractos y fracciones fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) a una concentración de 2 mg·mL<sup>-1</sup> a temperatura ambiente durante una hora para asegurar la esterilidad de la solución de prueba. Posteriormente se diluyeron usando medio de cultivo estéril para reducir la concentración del DMSO. Una concentración mayor a 2.5% de DMSO es tóxico para la micobacteria (Cos *et al.*, 2006). La concentración final de la solución de extracto/fracción fue de 100 µg·mL<sup>-1</sup>.

Las pruebas de actividad se realizaron por duplicado sobre placas de microdilución de 96 celdas de fondo plano, cubiertas con tapas de poliestireno de baja evaporación. Cada celda se llenó con 100 µL de caldo Middlebrook 7H9 suplementado con ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa. Doscientos microlitros de la solución de extracto/fracción fueron adicionados a la primera celda de cada fila, a partir del cual se hicieron las diluciones seriadas, tomando alícuotas de 100 µL para depositar en la celda contigua. Las diluciones en las celdas se homogenizaron 7 veces usando la pipeta antes de tomar la siguiente alícuota. De esta manera, el

rango de concentración extracto/fracción a evaluar en cada celda fue de 100 a 3.13  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

El inóculo (100  $\mu\text{L}$ ) fue adicionado a cada celda. Todas las placas fueron incubadas durante 5 días a 37° C en una atmósfera con 5% de bióxido de carbono. Pasado el tiempo de incubación, 32  $\mu\text{L}$  de una mezcla de azul de Alamar (Trek Diagnostic) y Tween-80 al 20% (Sigma) en proporción 1.6:1 (v:v) fueron adicionados a una celda de control de crecimiento. Las placas fueron incubadas nuevamente a 37° C durante 24 h. Al observarse un cambio de color entre azul y rosa en la celda de control de crecimiento, se agregaron 32  $\mu\text{L}$  de solución de azul de Alamar en las celdas restantes. El color rosa fue interpretado como crecimiento micobacteriano positivo, mientras que una coloración azul indicó ausencia de crecimiento. La CMI corresponde a la menor concentración del extracto/fracción que inhibe el crecimiento bacteriano, medido como aquel que previene o evita el cambio de color del Alamar azul del azul a cualquier tonalidad de violeta o rosa; en todos los casos los resultados se confirmaron por revisión del crecimiento en cada uno de las microceldas al microscopio Invertido en campo claro y con aumento de 100 $\times$ . Aquellos extractos/fracciones con un valor de CMI  $\leq 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  se consideraron activos, mientras que los compuestos puros se consideran activos si presentan un valor de CMI  $\leq 25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Cos *et al.*, 2006).

#### **6.4. Fraccionamiento biodirigido**

Las fracciones fueron evaluadas usando el método descrito en la sección 6.3. Las fracciones bioactivas fueron seleccionadas para su fraccionamiento en CC. Los criterios de selección fueron los siguientes: actividad biológica (CMI  $\leq 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y el peso de la fracción, dando prioridad a las de mayor cantidad. De las 19 fracciones de ESL1F1 se seleccionó CC1F8 para fraccionamiento (CMI= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). CC1F8 se sometió a CC (3.8 cm de diámetro, 24.5 cm de altura) usando sílica gel (200 g, relación muestra: sílica de 1:200 Bulk Microparticle Media para HPLC, 60 Å, tamiz 230-400 ASTM) y como eluyente una mezcla de Hex: Acetona con un gradiente de polaridad ascendente (1:0, 95:5, 9:1, 8.5:1.5, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 0:1). De este

fraccionamiento se obtuvieron 13 fracciones, las cuales fueron evaluadas contra *M. tuberculosis*.

### **6.5. Fraccionamiento en HPLC-UV**

La fracción CC7F8 se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés, high performance liquid chromatography) con detector ultravioleta-visible (UV). Para remover los pigmentos que pudieran obstruir las columnas o precolumna del HPLC, las muestras se lavaron con cloroformo en un filtro de base de vidrio usando tierra de diatomea rosa (diatomita calcinada, permeabilidad 0.8-1.2, pH 9.0), y se realizaron tres posteriores extracciones con una mezcla Hex-DCM en proporción 1:1, colectando las extracciones para su análisis por HPLC.

La fracción CC7F5 se inyectó directamente sin necesidad del proceso de despigmentación. Se utilizó un equipo HPLC analítico, modelo Alliance 2695, con sistema cuaternario de alta presión, rango de flujo 0.1-10 mL·min<sup>-1</sup> y detector UV-Vis con arreglo de diodos. Como fase móvil se usó una mezcla Hex-DCM usando en las siguientes proporciones [min. 5 (2: 98), min. 10 (5: 95), min. 15 (10: 90), min. 20 (40: 60), min. 25 (40: 60), min. 30 (10: 90), min. 35 (0: 100)].

### **6.6. Búsqueda de compuestos antituberculosos conocidos en las fracciones activa**

#### **6.6.1. Estudio espectroscópico en UPLC-EM**

Se analizaron las fracciones activas mediante espectrometría de masas (EM) para descartar la presencia de moléculas con actividad antimicobacteriana conocidas, usando los datos de masa molecular reportados en la literatura. El objetivo principal fue descartar la presencia de saringosterol y saringosterona, ya que este sistema cuenta con un analizador de cuadrupolo que actúa como un filtro para los iones con respecto a su masa/carga. Las fracciones fueron inyectadas en un equipo de nano-cromatografía líquida UPLC (por su siglas en inglés, ultra performance liquid chromatography) marca Waters, modelo Accquity acoplado a un

espectrómetro de masas (EM) híbrido con una configuración cuadrupolo-tiempo de vuelo Qtof Premier (Marca Waters) con una resolución de 10 000 FWHM, en modo de ionización negativa. La separación capilar se realizó en una columna C18 de fase reversa (modelo Atlantis, Marca Waters, 73  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 15 cm de largo, tamaño de partícula 1.7  $\mu\text{m}$ ) usando como fase móvil una mezcla de DCM:acetoniitrilo. Como estándar interno se utilizó un glucofibrinopéptido con un valor de  $m/z$  referencia de 785.8426. Se buscaron específicamente los valores de  $m/z$  428 para saringosterol y  $m/z$  426 para saringosterona. De la misma forma se rastrearon los patrones de fragmentación de ambas moléculas en el EM comparando con los datos reportados por Ayyad *et al.* 2011. Señales de EM para saringosterol  $m/z$ : 428(12) [M,  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$ ]<sup>+</sup>, 412(6) [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O], 314(40), 273(20), 271(100), 255 (28), 228(22), 213(40), 145(64). Señales de EM para saringosterona  $m/z$ : 426(12) [M,  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2$ ]<sup>+</sup>, 383(21) [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>], 313(30), 271(35), 269(100).

### 6.6.2. Estudio del perfil cromatográfico en capa fina

En la literatura no se menciona el factor de retención (Rf) del saringosterol y saringosterona, pero si se especifican los sistemas utilizados para su separación y visualización en CCF. Por esta razón se evaluó el perfil cromatográfico en capa fina de las fracciones activas usando las condiciones de separación reportadas para éstos esteroides (Wächter *et al.*, 2001; Ayyad *et al.*, 2003). Así mismo, se seleccionó uno de estos sistemas para el fraccionamiento de CC1F8 con la finalidad de aislar el saringosterol o saringosterona, si es que se encontraba presente en la fracción activa.

### 6.6.3. Búsqueda de ácido mirístico en las fracciones activas

Con la finalidad de determinar la presencia del ácido mirístico como responsable de la actividad en las fracciones activas, se comparó el perfil cromatográfico en capa fina de las fracciones activas contra el Rf del ácido mirístico. Como estándar se utilizó ácido mirístico aislado y purificado de *S. horridum* por Muñoz-Ochoa (2010).

#### **6.6.4. Identificación de quinonas**

Para evidenciar la presencia de quinonas, se utilizaron reveladores específicos sobre la CCF de las fracciones activas. Una solución de KOH al 5% p/v en EtOH para quinonas en general, KOH al 10% en MeOH para naftoquinonas y KOH al 10% en EtOH para antraquinonas (Oliveira *et al.*, 2007).

#### **6.7. Elucidación estructural de los compuestos aislados**

Las estructuras químicas propuestas para los compuestos 1 y 2 fueron determinadas mediante interpretación y comparación de datos espectroscópicos experimentales previamente reportados. La fracción insoluble de ESL1F3 se analizó en pastillas de KBr utilizando el equipo de IR con transformada de Fourier (FT) Paragon 500 de Perkin Elmer. El compuesto 2 se analizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) en un espectrómetro Varian Mercury 300. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se obtuvo a 300 MHz y el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN a 75 MHz. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar y en ambos casos se utilizó cloroformo deuterado como disolvente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Actividad biológica contra *M. tuberculosis* H37Rv

El extracto crudo de *S. horridum* (recolecta <06-009-41>), fue ligeramente activo (CMI= 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La actividad se conservó en la fracción orgánica ESL1F1 (CMI= 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), mientras que las fracciones ESL1F2, ESL1F3 y ESL1F4, productos de la extracción y los lavados no presentaron actividad contra *M. tuberculosis*. La actividad biológica se duplicó en el fraccionamiento de la ESL1F1, la mayor actividad se presentó en CC1F2 (74 mg) y CC1F8 (748 mg), ambas con una CMI= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Las fracciones intermedias a ésta, CC1F5, CC1F6 y CC1F7 mostraron ligera actividad (CMI= 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y el resto de las fracciones fueron inactivas (figura 14). Siguiendo como criterio el rendimiento y la bioactividad, se separó la fracción CC1F8 obteniéndose 13 fracciones.

La actividad se duplicó en éste fraccionamiento, detectando una CMI= 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en la fracción CC7F5 (19.4 mg), el resto de las fracciones fueron inactivas, salvo las CC7F4 y CC7F6 que mostraron rastros de actividad con una CMI= 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La cantidad de dicha fracción no fue suficiente para continuar el fraccionamiento en columna, por lo que se reservó solo para los análisis espectroscópicos y como estándar para una futura reobtención de la fracción. Con la experiencia de nuestros resultados se desarrolló un método de despigmentación de muestras que nos permitiera analizar las fracciones en HPLC y un método de separación para este sistema.

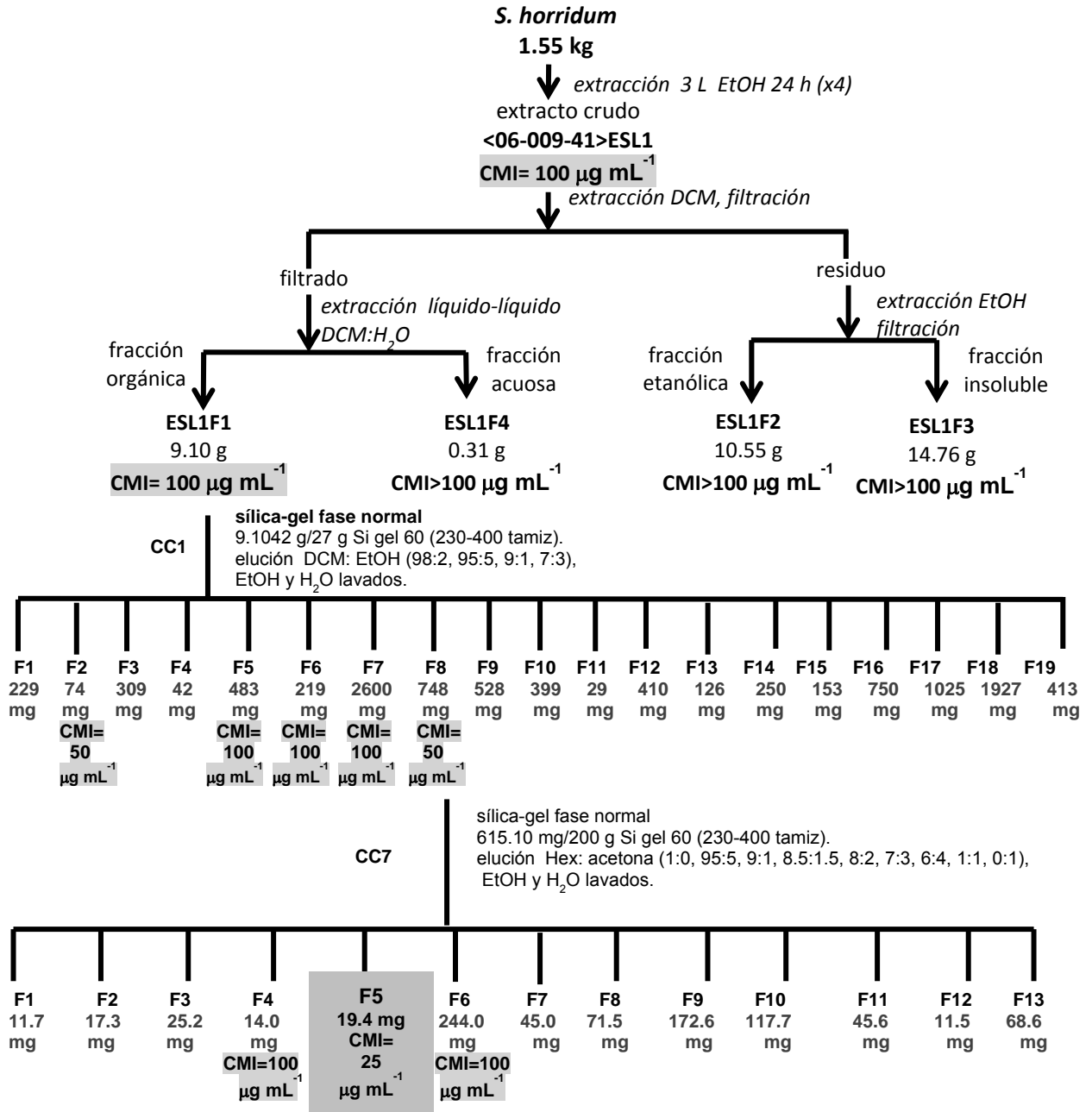


Figura 14. Esquema de fraccionamiento biodirigido de *S. horridum* <06-009>.

## 7.2. Estudio químico de las fracciones activas contra *M. tuberculosis*

Las fracciones activas con una CMI <math>< 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math> (CC1F2, CC1F8, CC7F4, CC7F5 y CC7F6) fueron analizadas mediante espectrometría de masas. El analizador de cuadrupolo del UPLC-EM no detectó saringosterol ni saringosterona en ninguna de las fracciones. Por lo tanto, se descartó el saringosterol como compuesto responsable de la actividad.

La cromatografía en capa fina (CCF) mostró la presencia de compuestos con el mismo índice de retención ( $R_f$ ) en las fracciones activas CC1F2 y CC1F8, indicando que la actividad de las dos fracciones podía provenir del mismo compuesto o una serie de compuestos de la misma naturaleza química (figura 15). Los perfiles cromatográficos obtenidos mediante CCF mostraron que ambas fracciones contenían compuestos que podían ser aislados usando las mismas condiciones de separación reportadas para saringosterol y saringosterona. En base a este resultado, se determinó utilizar este sistema de separación en el fraccionamiento en columna cromatográfica de CC1F8 (sección 6.4). Estos resultados no fueron determinantes para aceptar o rechazar la hipótesis del saringosterol como principio activo.

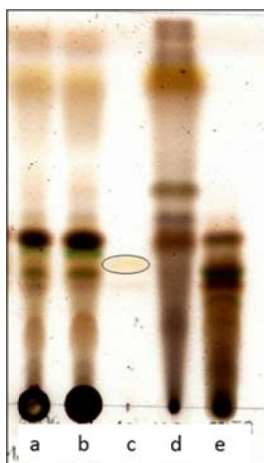


Figura 15. Perfil cromatográfico de las fracciones activas de *S. horridum* <06-009> usando el sistema de separación para saringosterol y saringosterona.



Las fracciones activas obtenidas a partir de CC1F8 (CC7F4, CC7F5 y CC7F6) también se analizaron mediante CCF comparando su perfil cromatográfico con el del ácido mirístico. La CCF mostró que el ácido mirístico también puede ser separado usando el sistema de elusión para saringosterol y saringosterol. No se observaron bandas a la altura del ácido mirístico en la CCF de las fracciones activas CC7F4 y CC7F5. El perfil cromatográfico de la fracción CC7F6 mostró compuestos a la altura del Rf del ácido mirístico, sin embargo, la separación entre los compuestos no es clara, por lo que no se puede determinar con exactitud el Rf de cada compuesto (figura 16).

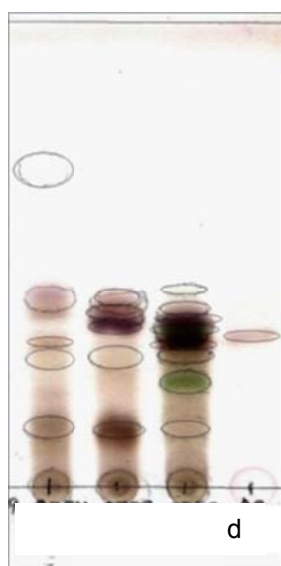


Figura 16. Comparación del perfil cromatográfico del ácido mirístico con las fracciones activas. a) CC7F4, b) CC7F5, c) CC7F6, d) ácido mirístico. Sistema de separación Hex:acetona (8:2). Se utilizó  $H_2SO_4$  al 10% como revelador.

Los reveladores de quinonas no reaccionaron con la CCF de ninguna de las fracciones activas, descartando la hipótesis de estructuras quinólicas como responsables de la actividad antituberculosa.

Mediante el fraccionamiento biodirigido obtuvimos la mayor actividad en la fracción CC7F5 ( $CMI = 25 \mu g \cdot mL^{-1}$ ). Esta fracción (figura 16) está compuesta de una mezcla de compuestos, los cuales se observan presentes en las fracciones con menor actividad CC7F4 y CC7F6 ( $CMI = 100 \mu g \cdot mL^{-1}$ ).

Al desarrollar el método de separación en HPLC-UV para el análisis de las fracciones activas de *S. horridum* se detectó la presencia de gran cantidad de pigmentos en la fracción CC1F8 que obstruían los capilares del equipo de HPLC. Se desarrolló un método de despigmentación de las muestras para su inyección en el equipo. La cromatografía en capa fina (CCF) no mostró diferencias entre el patrón de bandeado de las fracción original y la fracción despigmentada, pero si en la intensidad de las bandas. Se guardó una muestra de ambas fracciones para descartar pérdida de actividad antimicobacteriana. La fracción CC7F5 no requirió ser despigmentada para su inyección en el equipo de HPLC. El cromatograma obtenido en HPLC-UV mostró la presencia de al menos 6 compuestos en la fracción CC7F5 (figura 17) los cuales debían ser purificados y probados contra *M. tuberculosis*. Se determinó no continuar el fraccionamiento considerando las cantidades que se requieren para el bioensayo. El método de separación desarrollado para HPLC puede ser utilizado para la reobtención de ésta fracción.

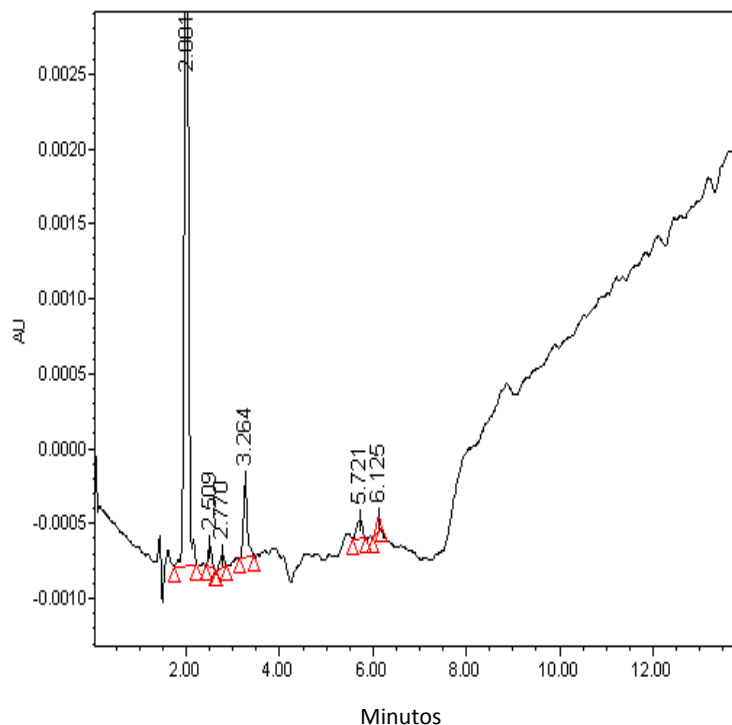


Figura 17. Cromatograma en HPLC-UV de la fracción activa CC7F5.

### 7.3. Compuestos aislados durante el estudio de *S. horridum*

#### 7.3.1. Obtención e identificación de manitol

La fracción insoluble ESL1F3 se obtuvo como resultado del fraccionamiento primario del extracto etanólico de *S. horridum* <06-009>, y fue la fracción más polar, ya que no se disolvió ni en DCM ni en EtOH. El ensayo contra *M. tuberculosis* no mostró actividad, pero aún así se evaluó mediante espectroscopia de IR. El espectro de IR reveló señales propias de un compuesto orgánico. Las principales bandas de absorción se observaron a 3300, 2935, 2366, 1459, 1374, 1255, 1296, 1090, 1024, 931, 831, 714, 625  $\text{cm}^{-1}$ . La ausencia de una señal fuerte en el rango de 2800 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  descarta la presencia de insaturaciones, ésteres, cetonas, estructuras cíclicas y aromáticas. Mediante comparación de resultados usando tablas de referencia para IR, se asignaron las señales más fuertes. La señal en 3300  $\text{cm}^{-1}$  es ancha y profunda, característica de vibraciones del enlace O-H, específicamente polialcoholes. La señal a 2935  $\text{cm}^{-1}$  se asignó a un enlace C-H, 1459 corresponde a una vibración en enlace C-O-H y las señales 1090-1024 a enlaces C-O (figura 18). El espectro de infrarrojo de ESL1F3 se identificó como manitol mediante comparación con el espectro de IR de un compuesto previamente aislado de *S. horridum* mediante cristalización (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2010; figura 19). Se intentó reproducir la cristalización pero no se formaron cristales. En el segundo experimento de extracción, se realizó una extracción líquido-líquido a la fracción etanólica con  $\text{H}_2\text{O}$ , donde el  $\text{H}_2\text{O}$  debía arrastrar las sales restantes. Se realizó el experimento de cristalización en esta fracción acuosa y obtuvimos cristales semejantes a los reportados por Muñoz-Ochoa (2010). Basados en el  $R_f$  y la apariencia de la mancha en la CCF pudimos confirmar que los cristales del compuesto 1 están presentes en la fracción ESL1F3 y también son similares a los cristales de manitol aislados de *S. horridum* por Muñoz-Ochoa (2010).

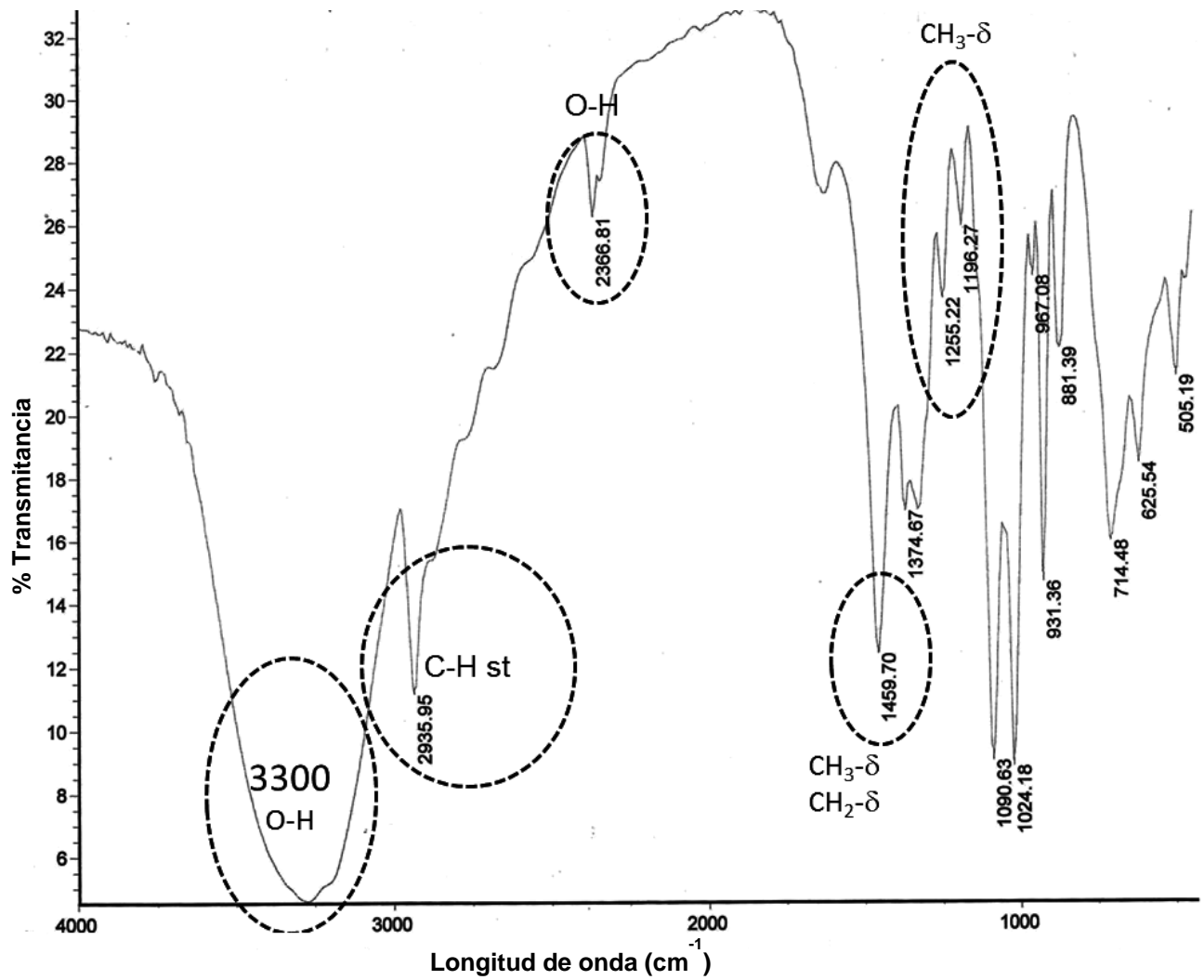


Figura 18. Espectro de infrarrojo de la fracción insoluble ESL1F3 de *S. horridum*.

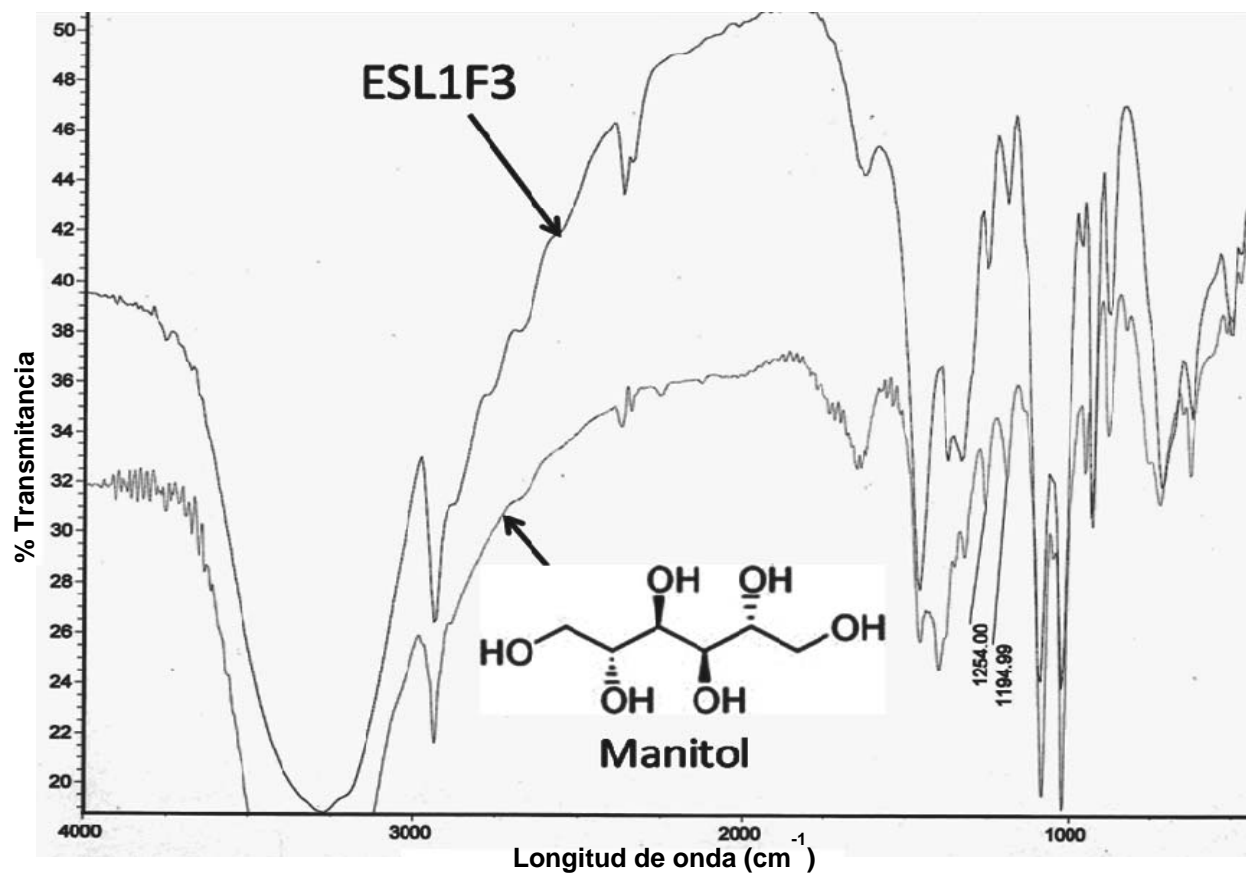


Figura 19. Comparación de espectro de IR de la fracción insoluble de ESL1F3 y el manitol aislado por Muñoz-Ochoa (2010).

### 7.3.2. Elucidación estructural del compuesto 2

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 20) se identificaron señales características de un azúcar [ $\delta$  55.1, 75.8, 74.3, 72.5, 100.9 ppm], la señal de 100.9 ppm pertenece al carbono anomérico, el cual se encuentra más desplazado que el resto de los carbonos al estar menos apantallado. La presencia de las señales que se describen a continuación indica que se trata de un glucósido. Las señales de 65.2, 70.7, y 67.9 ppm fueron interpretadas como los carbonos del glicerol, unido al azúcar por un enlace glucosídico. Las señales en la región de campo alto nos sugieren la presencia de ácidos grasos de cadena larga [ $\delta$  15.3, 24.6, 26.9, 29.0, 31.0, 31.3, 31.5, 31.7, 33.9, 35.8, 36.1 ppm]. Se observan señales muy altas en la región de 20 a 40 ppm que pueden interpretarse como numerosos carbonos secundarios (figura 21). La señal de 131.7 ppm se atribuye a una insaturación en la cadena de carbonos, donde apenas se distingue la presencia de dos señales correspondientes a los dos carbonos que comparten el doble enlace. La señal de 175.8 ppm corresponde al carbono carboxílico de los ácidos grasos.

En el espectro de protón (figura 22) se observan señales entre 2.95 y 4.80 ppm que son consistentes con las señales de un azúcar y glicerol en la estructura de un glucoglicerolípido (figura 23). La integración bajo la curva de las señales nos indica un total de 11 protones, lo cual confirma esta suposición. Las señales restante se pueden observar a campo bajo, en un grupo de señales alrededor de 5.38 ppm. Estas señales corresponden al carbono 2 de la molécula de glicerol y a dos protones de carbonos insaturados del ácido graso. Las señales de 6 protones metílicos en 0.98 ppm confirman la presencia de dos ácidos grasos unidos al glicerol. La señal del protón unido al carbono  $\alpha$  se presenta a 2.40 ppm, y el protón del carbono  $\beta$  a 1.63 ppm, los protones de los carbonos secundarios se ven representados en las señales entre 1.63 y 0.90 ppm. La frecuencia a la que se operó en ambos estudios permitió el enmascaramiento de algunas señales, por lo que no pudimos definir el número exacto de señales claves en la elucidación de la estructura, como el número de insaturaciones y el número exacto de protones en las cadenas de ácidos grasos, posiblemente estén traslapadas en la región de 1.20-1.40 ppm con la señal del disolvente. Se realizó una comparación de los datos espectrales con lo reportado en

la literatura, las señales son coincidentes con el tipo de molécula que sugerimos, pero no se encontró similitudes exactas con las moléculas descritas. En base a los datos espectroscópicos obtenidos para glucoglicerolípidos, se hizo una asignación teórica de las señales de protón y carbón (tabla 5).

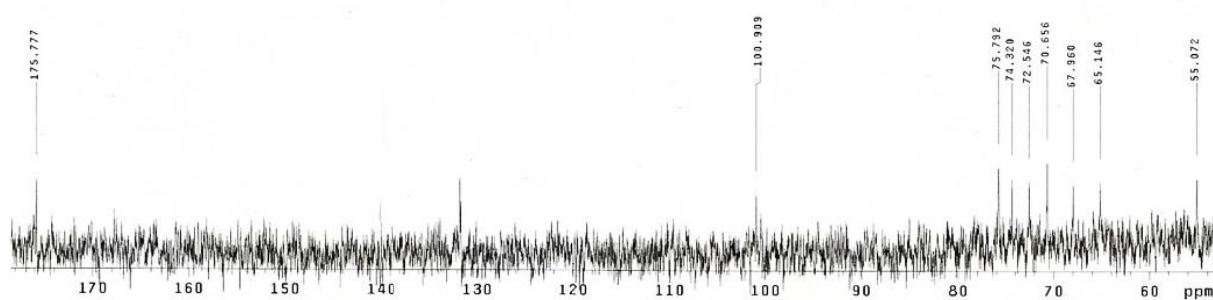


Figura 20. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 2. Rango de 180-50 ppm.

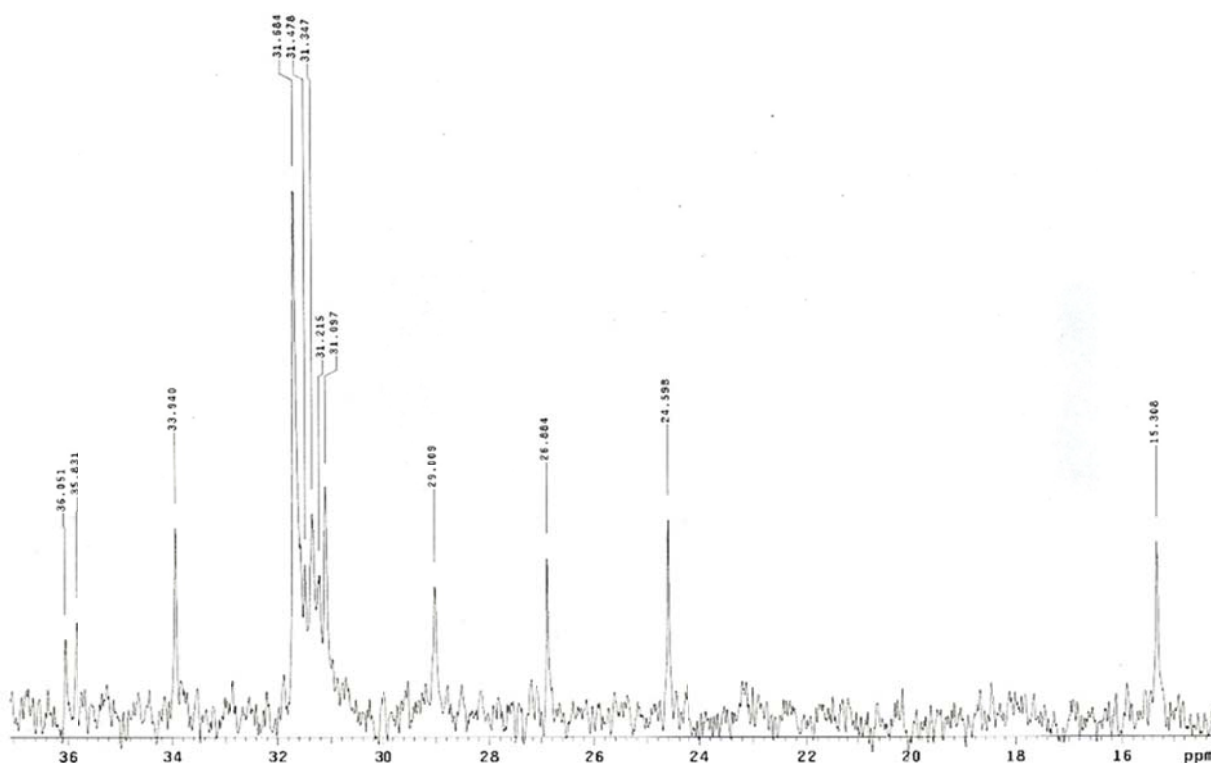


Figura 21. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 2. Rango de 40 - 0 ppm.

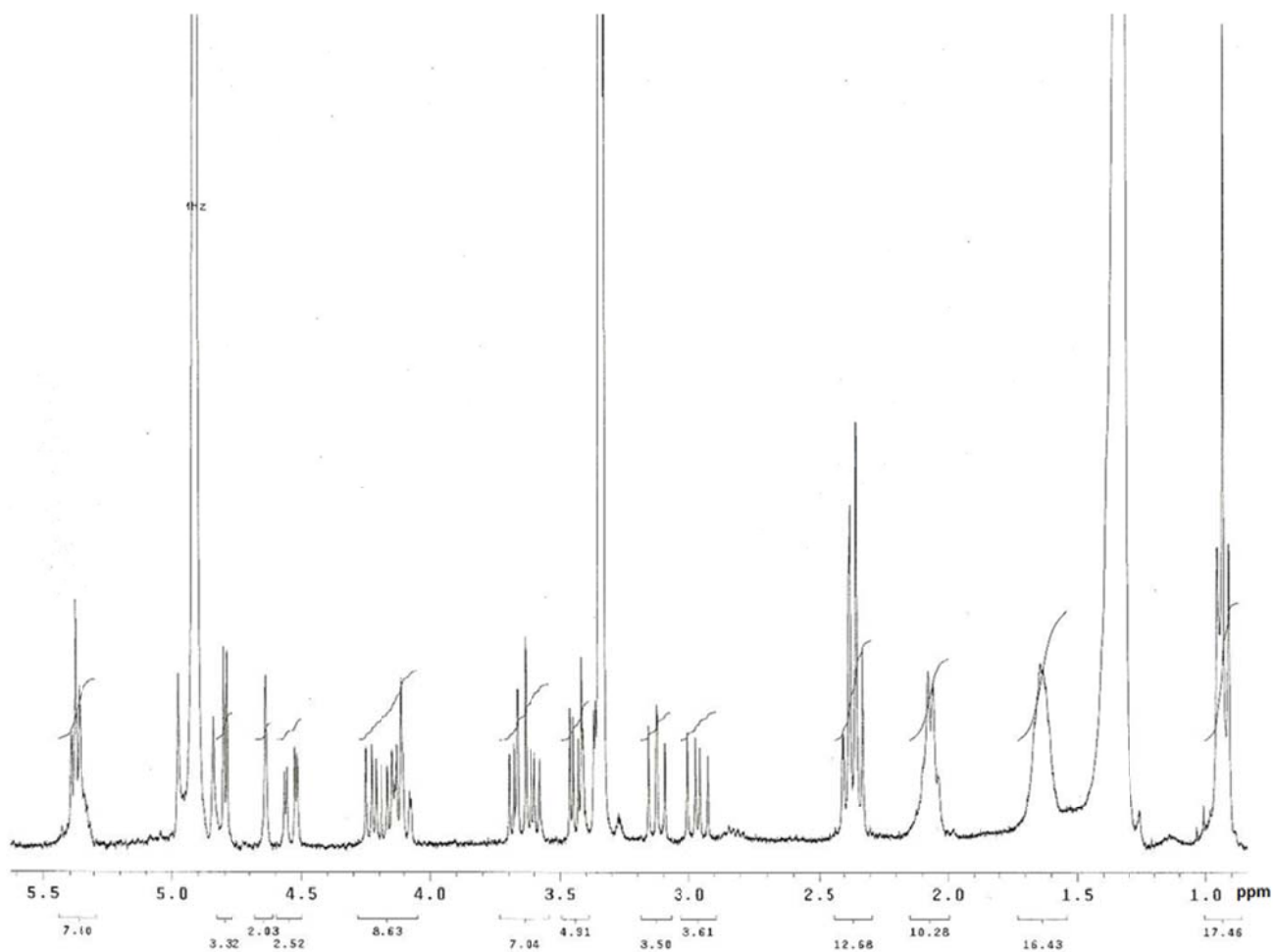


Figura 22. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 2.



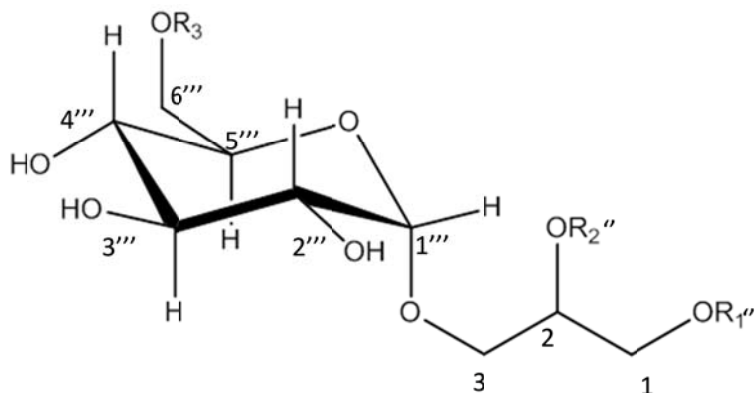


Figura 23. Estructura parcial del compuesto 2. R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>=ácidos grasos; R<sub>3</sub>= grupo sulfonil, amino o H.

Tabla 5. Datos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN del compuesto 2 aislado de *S. horridum*.

Carbono	δ <sub>c</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)
1	65.1	4.20, 4.52
2	70.7	5.38
3	67.9	3.42, 3.66
1'''	100.9	4.62
2'''	72.5	3.12
3'''	74.3	3.42
4'''	*	2.95
5'''	75.8	3.65
6'''	55.1	2.40
1'' de R <sub>1</sub> o R <sub>2</sub>	175.7	---
Insaturación	131.7	1.20-1.40
2'' (C α) de R <sub>1</sub> o R <sub>2</sub>	36.1	2.40
3'' (C β) R <sub>1</sub> o R <sub>2</sub>	35.8	1.63
-(CH <sub>2</sub> )- de R <sub>1</sub> o R <sub>2</sub>	26.9- 36.1	1.63- 0.90
-(CH) <sub>3</sub> de R <sub>1</sub> o R <sub>2</sub>	15.3	0.98

<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN se obtuvieron a 300 y 75 MHz, respectivamente.  
Cloroformo deuterado como disolvente.  
\*La señal de este carbono puede estar enmascarada.

#### 7.4. Naturaleza química de los compuestos antituberculosos en *S. horridum* <06-009>

Las fracciones activas se inyectaron directamente en el UPLC-MS por lo que se obtuvo un espectro de masas de toda la fracción. El espectro se analizaron buscando fragmentos característicos de especies químicas (figura 24).

Se encontró semejanza entre el espectro de masas de la fracción CC7F5 y el perfil de triglicéridos realizado por EM en una microalga marina (Danielewicz *et al.*, 2011). En el espectro se observan tres principales grupos de señales, fragmentos de 100 a 500  $m/z$ , de 600 a 700  $m/z$  y de 1000 a 1300  $m/z$ . En un patrón de fragmentación de triglicéridos, el pico correspondiente a los ácidos grasos es más abundante que el ion molecular. Se propone que las señales a 347, 305, 303, 301, 239, 229  $m/z$  pertenecen a ácidos grasos, los picos de 484, 541, 631 y 632  $m/z$  a fragmentos de tipo diacilglicerol y finalmente, las señales 841 y 889  $m/z$  a triglicéridos. En los patrones de fragmentación se distingue un pico base de 74  $m/z$ , el cual es característico de ácidos grasos saturados. En un glucolípido de un alga roja, los picos de 301 y 149  $m/z$  corresponden al fragmento de un ácido graso insaturado de 20 carbonos y su fragmento de 10 carbonos (Al-Fadhli *et al.*, 2006). Los picos a  $m/z$  1055, 1131 y 1204, poseen una diferencia en peso de 74, lo que sugiere se trate de una estructura lipídica de mucho mayor peso molecular que un triglicérido. No se encontraron señales pertenecientes a ácidos grasos con actividad antimicrobiana como el ácido oleico, linoleico, mirístico, palmítico, láurico, cáprico, palmitoléico, 3-nitropropiónico, esteárico y esclerópico (Saravanakumar *et al.*, 2008).

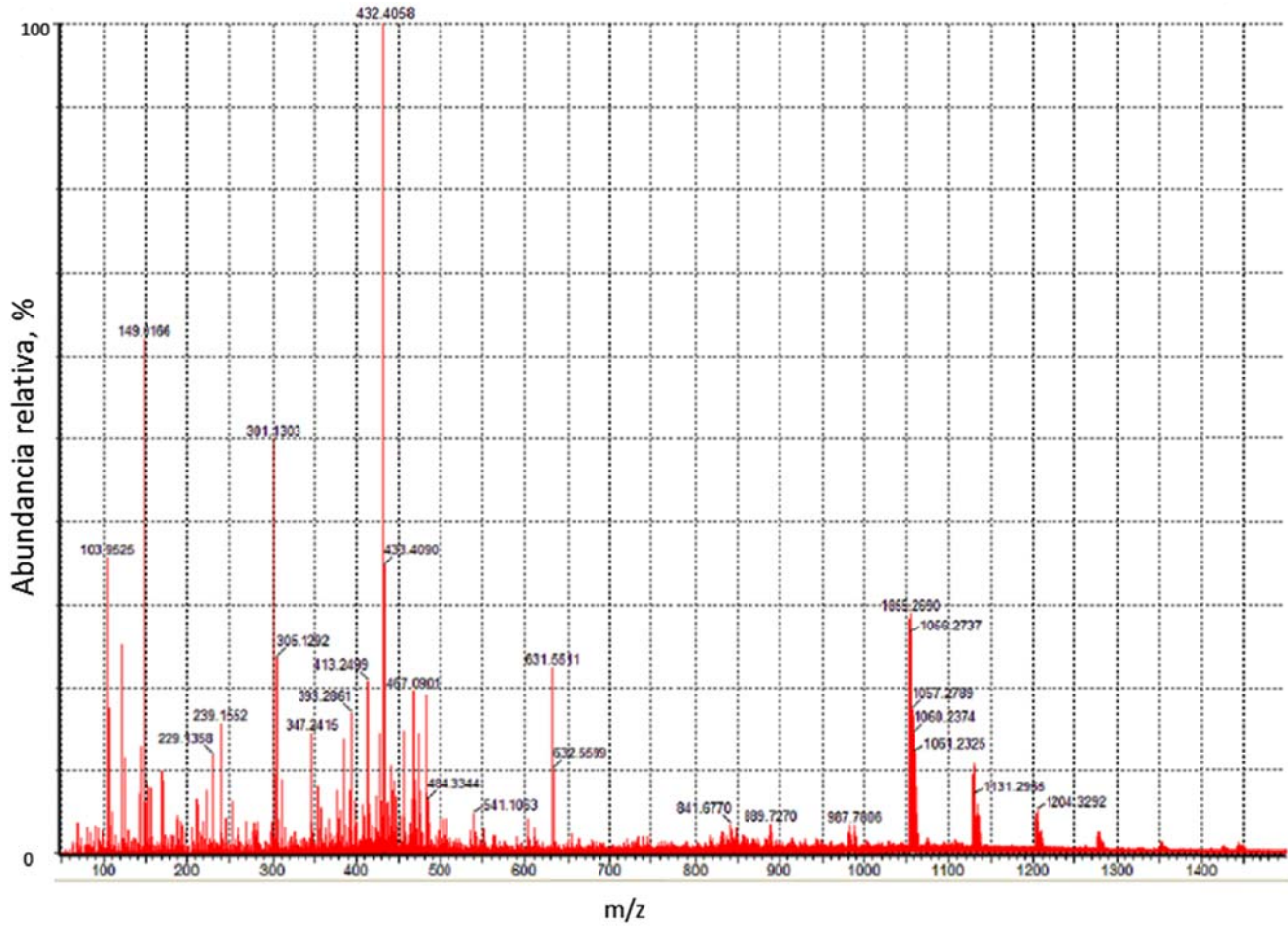


Figura 24. Espectro de masas de la fracción activa CC7F5.

## 8. DISCUSIÓN

La potente actividad reportada contra *M. tuberculosis* en un extracto crudo etanólico de *S. horridum* (CMI= 6.25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Muñoz-Ochoa, 2010) no pudo ser atribuida a un compuesto específico, sino que el autor sugirió un efecto sinérgico entre los compuestos presentes en el extracto, ya que ninguno de las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo conservó la actividad. Este proyecto surgió de la necesidad de determinar que compuesto o compuestos eran responsables de la actividad antimicobacteriana de *S. horridum*. Se analizó una nueva muestra del alga esperando encontrar la misma actividad. A pesar de que nuestra muestra no fue tan activa como la de Muñoz-Ochoa (2010), se detectó actividad antimicobacteriana en el extracto crudo (CMI= 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por lo que se implementó un sistema distinto de fraccionamiento para dicho estudio. La actividad se conservó e incrementó durante el fraccionamiento, pero la cantidad de compuestos en el extracto no fue suficiente para su purificación y evaluación antituberculosa. Sin embargo, fue posible analizar la naturaleza química de los compuestos presentes en las fracciones activas.

Esta investigación confirmó los resultados descritos en el trabajo de Muñoz-Ochoa (2010) con respecto al contenido y obtención de manitol y durante el fraccionamiento del alga, se aisló un compuesto de tipo glucoglicerolipídico.

### 8.1. Actividad antimicobacteriana de *S. horridum*

Se sabe que las algas pueden presentar variación en su actividad biológica, la cual pueden ser inducida por la variación entre las diferentes partes de la misma planta, por su estado reproductivo, por la variación entre dos plantas diferentes de la misma población, por la variación entre hábitats o por una variación temporal (Castro-Reyes, 1997; Amsler, 2008). Estos factores pudieron influir en la actividad de la muestra de *S. horridum* que analizamos. Sin embargo, según el criterio de Tosun *et al.* (2004), el cual considera activos los extractos de plantas que pueden inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* a una CMI < 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y Gu *et al.* (2004), quien considera activa una muestra con una CMI  $\leq$  128  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  el estudio del extracto

crudo de *S. horridum* <06-009-41> con una CMI= 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  fue igualmente prometedora.

La búsqueda de un grupo de compuestos puede ser más productiva que buscar un solo principio activo. El efecto de “adición” o “sinergia” en los extractos crudos o fracciones frecuentemente causa pérdida de actividad durante el fraccionamiento biodirigido e impide la identificación o caracterización de fracciones relevantes que pueden ser analizadas posteriormente (Cos *et al.*, 2006). Por ésta razón, paralelo al fraccionamiento biodirigido, analizamos todas las fracciones que resultaron activas buscando estructuras químicas con antecedentes de actividad antimicrobiana y antimicobacteriana en el género de *Sargassum*. Esta estrategia nos permitió determinar que la actividad antimicobacteriana de *S. horridum* se debe a la presencia de ácidos grasos.

En el experimento reportado por Wächter *et al.* (2001), la actividad antimicobacteriana del extracto crudo de *L. nigrescens* fue de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Mediante fraccionamiento biodirigido aislaron saringosterol. El valor de la CMI del saringosterol contra *M. tuberculosis* es uno de los más bajos reportados en productos naturales de plantas (CMI= 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), y este fitoesterol ha sido aislado principalmente en algas cafés (Wächter *et al.*, 2001; Copp, 2003; Hongmanee, 2009). Aunque los esteroides juegan un papel importante en la estructura de las membranas celulares, también pueden ser especie-específicas, lo que les da la característica de metabolitos secundario (Amsler, 2008). El saringosterol se ha reportado como un artefacto, producto de la oxidación del fucosterol, a su vez el fucosterol es un esteroide característico de las algas pardas (Patterson, 1971). Si el saringosterol hubiese estado presente en nuestro extracto, su alta actividad hubiera sido notoria durante el fraccionamiento, ya que se utilizó el mismo sistema de separación que el reportado por Wächter *et al.* (2001). No se detectó saringosterol en ninguna de las fracciones activas, lo cual nos indica que éste esteroide no se encuentra presente en *S. horridum*, ya que de ser así, su actividad hubiera sido fácilmente detectada como lo fue en el caso de *L. nigrescens*.

Los compuestos de estructura quinólica (quinonas, antraquinonas y naftoquinonas) han sido reportadas como agentes antimicobacterianos (Copp & Pearce, 2007), y muchos compuestos antimicrobianos de esta naturaleza han sido aislados de algas del género *Sargassum*. Aunque los agentes antimicobacterianos deben ser muy específicos para *M. tuberculosis*, consideramos como hipótesis alternativa que estas estructuras podían ser las responsables de la actividad en *S. horridum*. Los reveladores químicos no detectaron este tipo de compuestos en las fracciones activas rechazando esta hipótesis.

El EM indicó la presencia de ácidos grasos en la fracción CC7F5. Estos resultados son consistentes con los reportes de actividad antimicobacteriana de ácidos grasos (Kondo & Kanai, 1977; Saito *et al.*, 1984; Carballeira, 2008). Los ácidos grasos son el principal componente de los aceites de plantas terrestres y así mismo, de algas marinas (Carballeira, 2008). La actividad antimicrobiana de ácidos grasos ha sido muy estudiada (Zheng *et al.*, 2005). Rosell & Srivastava (1987) condujeron un estudio en nueve especies de algas cafés, de diversos géneros, y atribuyeron la actividad antimicrobiana contra bacterias gram (+) y gram (-) a su contenido de ácidos grasos. A pesar de haber extraído las muestras con disolventes de diversa polaridad, todos los extractos poseían como componentes mayoritarios, ácidos grasos de 14 y 20 carbonos, mono y poliinsaturados. Los principales ácidos grasos fueron el ácido mirístico, palmítico, oleico, araquidónico y eicosapentaenoico, estos constituyeron del 70 al 80% del contenido de ácidos grasos. El contenido total de ácidos grasos presentes en estas algas representó del 1 al 2% de su peso seco. Los análisis de los extractos demostraron una alta proporción de ácidos grasos insaturados, en forma libre y como parte de monoglicérido, diglicéridos y triglicéridos, consistente con los resultados obtenidos en nuestro estudio. En un estudio más reciente se evaluó la actividad antimicobacteriana en el alga roja *Polysiphonia virgata*. Este condujo al aislamiento de una mezcla de ácidos grasos de cadena larga. Ácido oleico (CMI= 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), linoléico (CMI= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), láurico (CMI= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y mirístico (CMI= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fueron los compuestos más activos contra *M. tuberculosis*. El ácido láurico, el linoléico y el mirístico fueron activos contra las cepas multifármaco resistentes de *M. tuberculosis* con una CMI= 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en los tres

ácidos grasos. El ácido palmítico y esteárico fueron inactivos (Saravanakumar *et al.*, 2008). El ácido palmítico, oleico y linoléico fueron los componentes bioactivos principales contra *M. aurum* y *M. smegmatis* (Seidel & Taylor, 2004). Stravry *et al.* (2004) reportaron que el principio activo contra *Mycobacterium fortuitum* en el extracto hexánico de la planta *Humulus lupulus* (Cannabaceae) era una mezcla de ácidos grasos. Esta fracción estaba compuesta de ácido palmítico, esteárico, oleico y pequeñas cantidades de ácido lignocérico, araquidónico, behénico y linoleico. Los ácidos grasos saturados resultaron inactivos, mientras que los insaturados, oleico y linoléico mostraron CMI entre 4 y 16  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El ácido 3-nitropropiónico (figura 25a) aislado de hongos endofíticos mostró una fuerte actividad contra *M. tuberculosis* (CMI= 0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). El mecanismo de acción de este ácido consiste en inhibir la isocitrato liasa, una enzima indispensable en el catabolismo de ácidos grasos y virulencia de *M. tuberculosis* (Chomcheon *et al.*, 2005). Del extracto hexánico de las hojas del árbol *Scleropyrum wallichianum*, se aisló el ácido graso insaturado esclerofírico (CMI= 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Suksamrarn *et al.*, 2005; figura 25b). Se ha propuesto que el mecanismo de acción de los ácidos grasos insaturados es la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos, especialmente de la enoil-ACP reductasa (inhA) de *M. tuberculosis*. Los ácidos 2-hexadecinoico (figura 25c), 2-octadecinoico y 2-nonadecinoico, fueron sintetizados durante un estudio y mostraron CMI entre 20 y 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *M. tuberculosis*. Estos ácidos 2-alquinoicos inhiben la InhA. También son metabolizados en 3-cetoácidos que bloquean la biosíntesis de ácidos grasos y en ácidos 3-alquinoicos que inhiben la  $\beta$ -oxidación en micobacterias. Esto las hace específicas para micobacterias, y no presentan toxicidad para el hospedero (Carballeira, 2008).

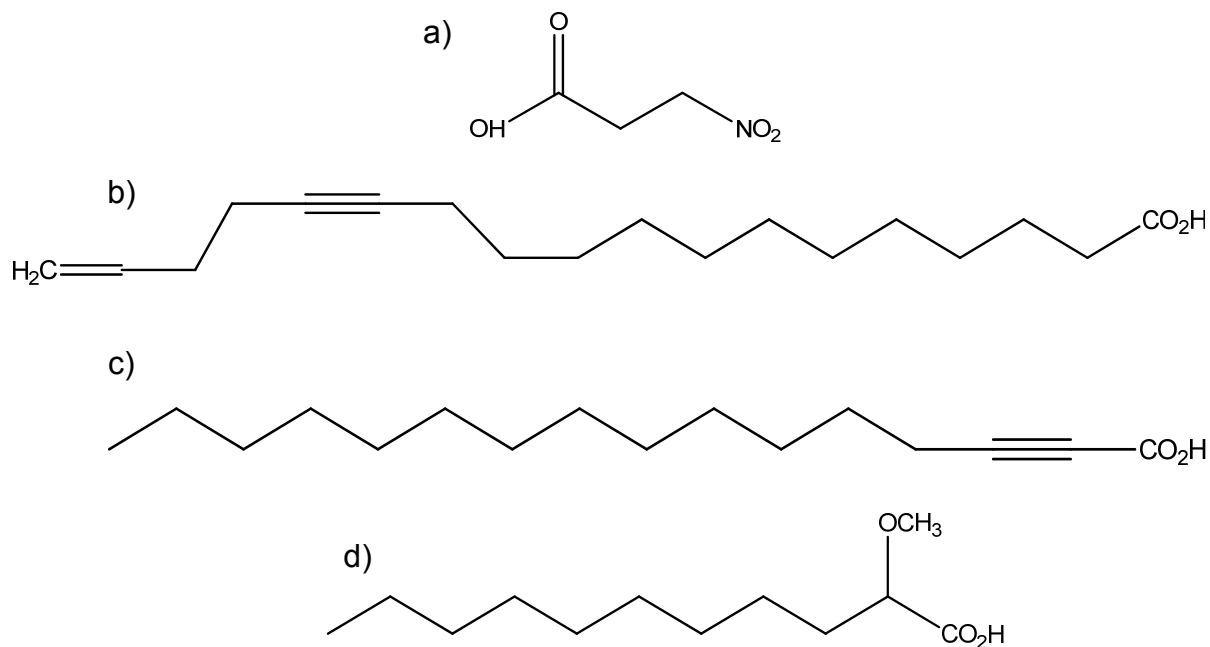


Figura 25. Ácidos grasos antimicobacterianos. a) Ácido 3-nitropropiónico, b) ácido esclerofrírico, c) ácido 2-hexadecinoico, d) ácido 2-metoxidecanoico.

Kondo & Kanai (1977) condujeron un estudio con ácidos grasos saturados de 2 a 20 carbonos, el ácido mirístico, el láurico y el cáprico, mostraron fuerte actividad antimicobacteriana mientras que otros ácidos grasos saturados fueron inactivos. Ácidos grasos insaturados de 16 a 20 carbonos, también fueron activos contra micobacterias, el mecanismo que se propuso fue la disrupción de la membrana celular bacteriana resultante del cambio en la permeabilidad de la misma (Saito *et al.*, 1984). La literatura más reciente indica que los ácidos grasos saturados son inactivos contra *M. tuberculosis* (excepto los de 10 y 12 carbonos), mientras que la actividad de los ácidos grasos insaturados depende del grado de insaturación, longitud de la cadena y la especie de micobacteria.

Era de esperar que los ácidos grasos bioactivos en CC7F5 correspondieran al ácido mirístico, oleico, linoleico o láurico, reportados previamente en algas, su ausencia indica la presencia de estructuras de ácidos grasos diferentes a los



antimicobacterianos ya reportados. Podemos esperar estructuras comunes de ácidos grasos o estructuras más complejas, este tipo de resultados puede aportar información valiosa para la síntesis de agentes antimicobacterianos. Tal fue el caso del alga *S. sagamianum*, la cual fue estudiada por la actividad inhibitoria de la enzima COX-2 observada en su extracto crudo (Chang *et al.*, 2008). A partir de una fracción activa, purificaron y caracterizaron un monoglicérido. Para determinar el principio activo, evaluaron el monoglicérido, su azúcar y el ácido graso por separado. Sintetizaron moléculas semejantes y relacionaron la actividad biológica con las características estructurales de sus esqueletos químicos. Aunque los ácidos grasos son ubicuos en la naturaleza, los organismos marinos han sido fuente de algunas de las más interesantes variedades estructurales como es el caso de los ácidos grasos  $\alpha$ -metoxilados (figura 25 d; Carballeira, 2008).

En el estudio realizado por Muñoz-Ochoa (2010), el autor sugiere que la actividad de  $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *M. tuberculosis* fue producto de un efecto sinérgico, debido a que no se detectó actividad en el fraccionamiento inmediato. El método de extracción utilizado por Muñoz-Ochoa (2010) con mezclas de disolventes en gradiente ascendente de polaridad, tuvo como objetivo obtener grupos de compuestos, pero un experimento similar realizado por Rosell & Srivastava (1987), detectó la presencia de ácidos grasos en todos los extractos, lo que puede explicar una reducción en la proporción de compuestos en cada uno de los extractos de *S. horridum*. En un estudio antimicobacteriano de flavonas y chalconas, la mezcla de los compuestos en diferentes proporciones (0:10, 2:8, 7:3, 1:1, 3:7 y 8:2) podía reducir la CMI de los compuestos puros de 250 y  $62 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , hasta  $7.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Rogério- Pavan *et al.*, 2009). El objetivo del método de extracción se utilizó durante este estudio, mediante EtOH al 100% y su posterior extracción con DCM, no fue segmentar el contenido del extracto, sino recuperar la mayor cantidad de compuestos orgánicos. Esto concentró el contenido de ácidos grasos junto con el resto de los compuestos en el extracto. Se realizó la extracción de una segunda muestra de *S. horridum* iniciando con disolventes de baja polaridad e incrementando la polaridad en la extracción (figura 11, sección 6.2), pero los extractos y fracciones de este experimento aún no han sido evaluados contra *M. tuberculosis*.

## 8.2. Contenido de manitol

Con respecto a la obtención de manitol, sabemos que éste es un azúcar producido durante la fotosíntesis, y es un metabolito muy común en algas cafés (Zubia *et al.*, 2008). Las algas lo utilizan como material de reserva y lo toman del tejido maduro para proveerse de energía y esqueletos carbónicos para el crecimiento de sus meristemas. Posee propiedades hidratantes y antioxidantes que son explotadas en la industria cosmética y farmacológica (Iwamoto & Shiraiwa, 2005). Aunque los costos de extracción son mayores a los costos de producción por síntesis química, las tendencias en el consumo de productos químicos hacen de las algas una fuente atractiva de explotación (Zubia *et al.*, 2008). Un estudio en *S. sinicola* en la Bahía de La Paz reportó concentraciones de manitol de 2.9 a 8.1% en peso seco, lo cual representa una tercera parte del contenido promedio de manitol reportado en especies del género *Laminaria* (Rodríguez-Montesinos *et al.*, 2008). Lo anterior es consistente con nuestras observaciones ya que en el espectro de IR realizado a la fracción insoluble ESL1F3 no se distinguen señales diferentes a las correspondientes al espectro de manitol. Esto nos sugiere que al menos, la cantidad de manitol es significativamente mayor que cualquier otra molécula orgánica presente en la fracción ESL1F3. Es indiscutible que esta fracción contiene una mezcla de compuestos orgánicos sumamente polares y compuestos inorgánicos, cuya concentración nos impidió cristalizar la molécula de manitol en la muestra de *S. horridum* <06-009-41>. Sin embargo, en el segundo experimento la extracción mediante distintos disolventes usando un gradiente de polaridad ascendente permitió separar un mayor contenido de compuestos menos polares. De esta manera la concentración de manitol en la fracción polar aumentó con respecto a los compuestos minoritarios permitiendo el proceso de cristalización. Aunque el proceso de obtención de manitol en *Padina mexicana* reportada por Muñoz-Ochoa (2010) es distinto, ambos fueron aislados de las fracciones más polares después del fraccionamiento de una extracción etanólica. Estos resultados destacan la reproducibilidad de los métodos y la consistencia de los resultados presentados. No se profundizó más para la confirmación de la estructura por no ser el tema principal de este estudio.

### 8.3. Aislamiento de un glucoglicerolípido

En cuanto a la elucidación del compuesto 2, todavía se requieren más estudios para confirmar la naturaleza del azúcar y la estructura de los ácidos grasos, sin embargo los estudios de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN nos permiten proponer con seguridad la naturaleza glucoglicerolípídica del compuesto. Se realizó un trabajo de comparación de los datos espectroscópicos con la literatura disponible y no se encontró una estructura con señales idénticas a las que obtuvimos, incluso entre glucoglicerolípidos de algas marinas. Sin embargo, para comparar las señales de RMN es necesario que los estudios se hayan realizado utilizando el mismo disolvente, ya que éste puede afectar el desplazamiento de las señales observadas. La mayor semejanza se encontró con 1-O-palmitoil-2-O-oleoil-3-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)-glicerol y el 1-O-miristoil-2-O-oleoil-3-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)-glicerol aislados en el alga café *Sargassum fulvellum* (Wu *et al.*, 2009). Sin embargo las señales de los carbonos secundarios  $-(\text{CH}_2)_n-$  de los ácidos grasos en  $\text{CCl}_4$  se encuentran ligeramente desplazadas hacia campo bajo (28.3-31.0 ppm) en comparación con los ácidos grasos de éstos dos glucolípidos (28.3-28.9 ppm; 28.4-29.1 ppm). El disolvente utilizado por Wu *et al.* (2009) fue DMSO deuterado.

Otros dos glucolípidos, el (2S)-1-O-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoil)-2-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoil)-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-*sn*-glicerol y (2S)-1-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoil)-2-O-(6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenoil)-3-O- $\beta$ -D-galacto-piranosil-*sn*-glicerol, aislados de *S. thunbergii* (Kim *et al.*, 2007), presentan señales similares en sus ácidos grasos, con señales entre 30.7 y 30.1 ppm, desplazados por el desapantallamiento de los núcleos que provocan las múltiples instauraciones de sus ácidos grasos. Este estudio se realizó usando cloroformo deuterado.

Al analizar los datos espectroscópicos de diferentes glucoglicerolípidos (tabla 6), obtenidos con distintos disolventes, se observa cierta relación entre las señales y los grupos químicos relacionados. Cuando el desplazamiento del carbono anomérico del azúcar (C-1) es igual o menor a 100 ppm, aproximadamente, se observa que el azúcar es glucosa, y cuando las señales son mayores de 103 ppm, se trata de

galactosa (Choi *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2000; Son *et al.*, 2001; Al-Fhadlhi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2009; Cantillo-Ciau *et al.*, 2010). Cuando la señales de los protones metilenos del carbono 6 (C-6) en el azúcar se encuentran desplazados entre sí, y la señal del C-6 se desplaza hasta valores de 54 a 55 ppm, un grupo sulfonil o un grupo amino ocupa el lugar del grupo hidroxilo del azúcar (de Souza *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009 Cantillo-Ciau *et al.*, 2010).

**Tabla 6. Comparación de los desplazamientos químicos característicos de algunos azúcares en glucoglicerolípidos.**

Organismo	C-1, $\delta_C$ Ppm	C-1, $\delta_H$ ppm	C-6, $\delta_C$ ppm	C-6, $\delta_H$ ppm	Glucona	Autor
<i>Sargassum. thumborgii</i> (alga café)	105.4	4.22	62.5	3.76, 3.71	galactosa	Kim <i>et al.</i> , 2009.
<i>Cyanobacterium Oscillatoria</i> sp. (microalga)	105.4	4.42	62.5	3.73, 3.75	galactosa	Son <i>et al.</i> , 2000.
<i>Cyanobacterium Oscillatoria</i> sp. (microalga)	105.4	4.23	62.5	3.73 (2H)	galactosa	Son <i>et al.</i> , 2001.
<i>Chondria armata</i> (alga roja)	103.0	4.17	62.2	4.23, 4.39	galactosa	Al-Fadhli <i>et al.</i> , 2006.
<i>Phyllorhiza punctata</i> (medusa)	103.4	4.09	62.1	3.76(2H)	galactosa	de Souza <i>et al.</i> , 2007.
<i>Oscillatoria</i> sp. (microalga)	100.2	4.97	63.1	3.66 (2H)	glucosa	Choi <i>et al.</i> , 1999.
<i>Phyllorhiza punctata</i> (medusa)	99.4	4.68	55.06	3.05, 2.69	glucosa, grupo sulfonil	de Souza <i>et al.</i> , 2007.
<i>Lobophora variegata</i> (alga café)	98.3	4.57	54.5	2.90, 2.54	glucosa, grupo sulfonil	Cantillo-Ciau <i>et al.</i> , 2010
<i>Ishige okamurae</i> (alga café)	98.3	4.57	54.7	2.56, 2.88	glucosa, grupo amino	Zou <i>et al.</i> , 2009
<i>S. fulvellum</i> (alga café)	98.3	4.56	54.9	2.58, 2.57	glucosa	Wu <i>et al.</i> , 2009

En base a estas observaciones, podemos proponer que el compuesto 2 es un glucoglicerolípidos, y que puede tener un grupo sulfonil o amino en el C-6 de la

molécula de glucosa. Los protones de los grupos metilo nos sugieren la presencia de dos ácidos grasos unidos al glicerol y al menos uno de estos ácidos se encuentra insaturado. Para confirmar la naturaleza del azúcar se requiere de un estudio RMN de dos dimensiones (HMBC y HSQC) que nos permita relacionar los protones con los carbonos correspondientes. Mediante un estudio de EM también podríamos determinar la estructura analizando los patrones de fragmentación.

No es extraño encontrar este tipo de moléculas, ya que son el mayor componente lipídico de las membranas fotosintéticas de plantas, algas y diversas bacterias (Kim *et al.*, 2007). Hasta el momento su actividad biológica ha sido poco investigada (Wu *et al.*, 2009). Entre los reportes se tiene conocimiento de actividad antitumoral en un monogalactosildiacilglicerol aislado de un alga verde y la inhibición de la ADN-polimerasa y la transcriptasa reversa del virus de VIH por parte de un sulfoquinovosildiacilglicerol aislado de un alga marina (Loya *et al.*, 1998). Estructuras de glucosildiacilglicerol han sido reportadas con actividad fibrinolítica (Wu *et al.*, 2009) y antitumoral (Li *et al.*, 2003). La estructura de sus carbohidratos y la presencia de considerables cantidades de ácidos grasos polinsaturados son los responsables de la actividad biológica de glucoglicerolípidos (Li *et al.*, 2004).

Se ha reportado que el ácido palmítico suele ser el principal ácido graso en sulfoglucolípidos de algas marinas (Al-Fadhli *et al.*, 2006). También se tiene conocimiento que los ácidos grasos eicosapentaenoico y araquidónico se encuentran presentes en las algas como el componente lipídico de galactosildiacilgliceroles (Al-Fadhli *et al.*, 2006). En la actualidad, análogos de glucoglicerolípidos han cobrado importancia en tratamientos quimiopreventivos debido a sus propiedades antitumorales (Al-Fadhli *et al.*, 2006). El número de carbonos de los ácidos grasos (grupos acilo), su posición, y la naturaleza del azúcar, influyen en la actividad de estas moléculas. Se ha reportado que los galactosilgliceroles son más potentes que sus correspondiente glucosilgliceroles, aún teniendo las mismas características estructurales. No se ha demostrado que la configuración del C-1 del azúcar afecte la actividad biológica de estas estructuras (Al-Fadhli *et al.*, 2006).

El compuesto 2 no mostró actividad contra *M. tuberculosis*, lo cual era de esperarse, debido a la naturaleza polar que le confiere el azúcar, y a pesar de su contenido de ácidos grasos. Sin embargo, considerando los antecedentes de actividad biológica en otros glucoglicerolípidos, el estudio de su actividad biológica es prometedor.

## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Todo lo anterior, nos permite afirmar que la actividad antimicobacteriana observada en el extracto crudo de *S. horridum* <06-009> se debe a la presencia de ácidos grasos y que éstos ácidos grasos pueden tener estructuras no convencionales, por lo que es necesario realizar un estudio de lípidos en el alga *S. horridum*. Ahora que se conoce la naturaleza química de los compuestos activos, se puede optimizar el proceso de extracción y analizar las fracciones, ya sea por comparación con un estándar comercial o mediante técnicas de HPLC. Identificando los ácidos grasos en el alga, pueden adquirirse de forma comercial y evaluar su actividad antimicobacteriana. Si se trata de estructuras novedosas, pueden sintetizarse y analizar la relación actividad estructura.

Se considera que el contenido de ácidos grasos en nuestro extracto crudo es diferente del contenido lipídico del extracto reportado por Muñoz-Ochoa (2010) lo que se vio reflejado en la actividad antimicobacteriana de las fracciones obtenidas. Esto puede atribuirse a la variabilidad estacional en los componentes químicos del alga, las condiciones ambientales (físicas y biológicas) que pudieran afectar en ese momento al alga y las diferencias entre los métodos de fraccionamiento utilizados en ambos estudios. La actividad antimicobacteriana de la recolecta <06-009-41> de *S. horridum*, no pertenece al fitoesterol saringosterol ni a quinonas antibacterianas. Para posteriores estudios antimicobacterianos en algas, proponemos un método de dereplicación orientado a la búsqueda de ácidos grasos, ya que éstos forman parte del metabolismo primario del alga y es muy probable que se encuentren presentes en todos los extractos. Se desarrolló un método de despigmentación en las fracciones de *S. horridum* para su análisis, dos métodos de separación en HPLC, uno mediante HPLC-UV y otro en fase reversa en UPLC-EM. Estos métodos pueden ser utilizados en una posterior reobtención de la fracción activa y como método de dereplicación.

El estudio de *S. horridum* condujo al aislamiento del compuesto 2. Las señales de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN muestran un compuesto de tipo glucoglicerolípidos. Hasta el momento no se encontraron coincidencias exactas en los

datos espectroscópicos de otros glucolípidos. Considerando los antecedentes de actividad biológica de otros glucoglicerolípidos se propone concluir la determinación de su estructura y evaluar el potencial farmacológico de esta molécula, para lo cual se requiere reobtención del compuesto.

La detección y purificación de manitol en nuestro estudio es consistente con lo reportado por Muñoz-Ochoa (2010) y Rodríguez-Montesinos *et al.* (2008), que *S. horridum* posee cantidades considerables de manitol y que su obtención y purificación es reproducible.



## 10. LITERATURA CITADA

- Al-Fadhli, A., S. Wahidulla & L. D'Souza. 2006. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. *Glycobiology*, 16(10): 902-915.
- Amsler, Ch. 2008. *Algal ecology chemical*. Springer. Berlin Heidelberg. 313 p.
- Arunkumar, K., N. Selvapalam & R. Rengasamy. 2005. The antibacterial compound sulphoglycerolipid 1- 0 palmitoyl- 3- 0 (6'-sulpho- $\alpha$ -quinovopyranosyl)-glycerol from *Sargassum wightii* Greville (Phaeophyceae). *Bot. Mar.*, 48: 441-445.
- Ayyad, S. E., S. Basai, A. Badria, S. Ezmirly, W. Alarif & F. Badria. 2011. Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum* sp. *Pharmacognosy Res.*, 3(3): 160-165.
- Ayyad, S. E., S. Z. Sowellim, M. S. El-Hosini & A. Abo-Atia. 2003. The structural determination of a new steroidal metabolite from the brown alga *Sargassum asperifolium*. *Z. Naturforsch C.*, 58 (5-6): 333-336.
- Bakkestuen A. K., L. L. Gundersen, D. Petersen, B. T. Utenova & A. Vik. 2005. Synthesis and antimycobacterial activity of agelasine E and analogs. *Org. Biomol. Chem.*, 3(6): 1025-1033
- Bhadury, P. & P. C. Wright. 2004. Exploitation of marine algae : biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*, 219: 561-578.
- Brennan, P. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83: 91-97.
- Cantillo-Ciau, Z., R. Moo-Puc, L. Quijano & Y. Freile-Pelegrín. 2010. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. *Mar. Drugs*, 8(4): 1292-304.

- Carballeira, N. M. 2008. Progress in Lipid Research New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Prog. Lipid Res.*, 47: 50-61.
- Carballeira, N. M., H. Cruz, C. D. Kwong, B. Wan & S. Franzblau. 2004. 2-Methoxylated fatty acids in marine sponges: defense mechanism against mycobacteria?. *Lipids*, 39: 675-680.
- Castellanos-Joya, M. 2008. Tuberculosis en México. *Epidemiologia* 25(13): 29.
- 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.
- Castro-Reyes, M. A. 1997. *Actividad antibacteriana de Sargassum sinicola (Sargassaceae, Phaeophyta) y Laurencia johnstonii (Rhodomelaceae, Rhodophyta) de Bahía de La Paz, B.C.S., México*. Tesis de Maestría CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 72 p.
- Chakroborty, A. 2011. Drug-resistant tuberculosis: an insurmountable epidemic?. *Inflammopharmacol.*, 19: 131-137.
- Chang, H. W., K. H. Jang, D. Lee, H. R. Kang, T. Y. Kim, B. H. Lee, B. W. Choi, S. Kim & J. Shin. 2008. Monoglycerides from the brown alga *Sargassum sagamianum*: Isolation, synthesis, and biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18(12): 3589-3592.
- Choi, J. S., D. I. Lee, D. K. Lee, D.S. Kim, H. Choi & B. W. Son. 1999. 2-O- ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl) glycerol, a new glycerol glycoside from the marine blue-green alga *Oscillatoria* sp. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 20(10): 1121-1122.
- Chomcheon, P., S. Wiyakrutta, N. Sriubolmas, N. Ngamrojanavanich, D. Isarangkul & P. Kittakoop. 2005. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? *J. Nat. Prod.*, 68: 1103-1105.

- Coll, P. 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 21(6): 299-308.
- Copp, B. R. 2003. Antimycobacterial natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 20(6): 535-557.
- Copp, B. R., & A. N. Pearce. 2007. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.*, 24(2): 278-297.
- Cos, P., A. J. Vlietinck, D. V. Berghe & L. Maes. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *J. ethnopharmacol.*, 106(3): 290-302.
- Danielewicz, M. A., L. A. Anderson, A. K. Franz & A. Franz. 2011. Triacylglycerol Profiling of Marine Microalgae by Mass Spectrometry. *J. Lipid Res.* 52(11): 2101-2108.
- Davis, R.A., G. C. Mangalindan, Z. P. Bojo, R. R. Antemano, N. O. Rodríguez, G.P. Concepción, S.C. Samson, D. de Guzman, L. J. Cruz, D. Tasdemir, M. K. Harper, X. Feng, G. T. Carter & C. M. Ireland. 2004. Microcionamides A and B, bioactive peptides from the philippine sponge *Clathria* (Thalysias) *abietina*. *J. Org. Chem.*, 69(12): 4170-4176.
- de Souza, L. M., M. Lacomini, P. A. J. Gorin, R. S. Sari, M. A. Haddad & G. L. Sasaki. 2007. Glyco- and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. *Chem. Phys. Lipids*, 145(2): 85-96.
- Encarnacion-Dimayuga, R., M. R. Ramirez & J. Luna-Herrera. , J. 2003. Aerothionin, a bromotyrosine derivative with antimycobacterial activity from the marine sponge *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia). *Pharm. Biol.*, 41(5): 384-387.
- Faulkner, D. J. 1984. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Nat. Prod. Rep.*, (1): 251-280

- Gautam, R., A. Saklani & S. M. Jachak. 2007. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J. Ethnopharmacol.*, 110: 200-234.
- Gu, J. Q., Y. Wang, S. G. Franzblau, G. Montenegro, D. Yang, B. & B. N. Timmermann, B. N. 2004. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta. Med.*, 70(6): 509-514.
- Guiry M. D. & G. M. Guiry. 2011. AlgaBase. World-wide electronic publications, National university of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 05 December 2011.
- Gupta, S., G. R. Dwivedi, M. P. Darokar & S. K. Srivastava. 2012. Antimycobacterial activity of fractions and isolated compounds from *Vetiveria zizanioides*. *Med. Chem. Res.*, 21(7): 1283-1289.
- 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.
- Hongmanee, P. 2009. The data on MIC determination of *Mycobacterium tuberculosis* against different compounds. *Siriraj. Med. J.*, 61(1): 56-59.
- Iwamoto, K. & Y. Shiraiwa. 2005. Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Mar. Biotech.*, 7: 407-415.
- Iwashima, M., J. Mori, X. Ting, T. Matsunaga, K. Hayashi, D. Shinoda, H. Saito, U. Sankawa & T. Hayashi. 2005. Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(2): 374-377.
- Kim, Y. H., E. H. Kim, C. Lee, M. H. Kim & J. R. Rho. 2007. Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Lipids*, 42(4): 395-399.

- Kondo E. & K. Kanai. 1977. The relationship between the chemical structure of fatty acids and their mycobactericidal activity. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 30(4): 171-178.
- König, G. M., A. D. Wright & S. G. Franzblau. 2000. Assessment of antimycobacterial activity of a series of mainly marine derived natural products. *Planta Med.*, 66: 337-342.
- Kubo, I., T. Matsumoto & N. Ichikawa. 1985. Absolute configuration of crinitol. An acyclic diterpene insect growth inhibitor from the brown algae *Sargassum tortile*. *Chem. Lett.*, (2): 249-252.
- Li, C. J., Y. X. Li & H. S. Guan. 2003. Progress in study on the bioactivities of glycolipids. *Chinese J. Marin. Drug.* 22: 47-52.
- Li, I. A., A. M. Popov, N. M. Sanina, E. Y. Kostetskiĭ, O. D. Novikova, A. V. Reunov, V. P. Nagorskaia, O. Y. Portniagina, V. A. Khomenko & V. L. Shnyrov. 2004. Physicochemical and immune properties of glycolipids from *Laminaria japonica* within immunostimulating complexes (ISCs). *Biol. Bull.*, 31(3): 299-304.
- Loya, S., V. Reshef, E. Mizrahi, C. Silberstein, Y. C. S. Rachamim & A. Hizi. 1998. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: Contribution of different moieties to their high potency. *J. Nat. Prod.*, 61: 891-895.
- Lozano, R. C., 1991. ¿Qué tan secundarios son los metabolitos secundarios? *Hidrobiológica*, 1(2): 45-57.
- Magallanes, C., C. Córdova & R. Orozco. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. peru. biol.*, 10(2): 125-132.
- McClure, W. R. & C. L. Cech. 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 253: 8949-8956.

- Molina-Salinas, G. M., M.C. Ramos-Guerra, J. Vargas-Villarreal, B. D. Mata-Cárdenas, P. Becerril-Montes & S. Said-Fernández. 2006. Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Med. Res.*, 37(1): 45-49.
- Muñoz-Ochoa, M. 2010. *Potencial farmacológico de algas marinas de Baja California Sur, México*. Tesis de Doctorado CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 82 p.
- Muñoz-Ochoa, M., J. I. Murillo-Álvarez, L. A. Zermeño-Cervantes, S. Martínez-Díaz & R. Rodríguez-Riosmena. 2010. Screening of algae from Baja California Sur, Mexico as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 14(9): 739-747.
- Musser, J. M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetics insights. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 496-514.
- Nakayama, M., Y. Fufuoka, H. Nozaki, A. Matsuo & S. Hayashi. 1980. Structure of (+)-kjellmanianone, a highly oxygenated cyclopentenone from the marine alga, *Sargassum kjellmanianum*. *Chem. Lett.*, 0: 1243-1246.
- Nozaki, H., S. Ohira, D. Takaoka, N. Senda & M. Nakayama. 1995. Structure of sargassumketone, a novel highly oxygenated ketone from *Sargassum kjellmanianum*. *Chem. Lett.*, 0: 331.
- Numata, A., S. Kanbara, C. Takahashi, R. Fujiki, M. Yoneda, E. Fujita & Y. Nabeshima. 1991. Cytotoxic activity of marine algae and a cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. *Chem. Pharm. Bull.*, 39(8): 2129-2131.
- Okunade, A. L., M. P. F. Elvin-Lewis & W. H. Lewis. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*, 65: 1017-1032.
- Oliveira, M. D. E. C., G. Negri, A. Salatino & M. R. Braga. 2007. Detection of anthraquinones and identification of 1,4-naphthohydroquinone in cell suspension

- cultures of *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae). *Brasil. Bot.*, 30(1): 167-172.
- Patterson, G. W. 1971. The Distribution of Sterols in Algae. *Lipids*, 6(2): 120-127.
- 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.
- Pauli, G. F., R. J. Case, T. Inui, Y. Wang, S. Cho, N. H. Fischer & S. G. Franzblau. 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Sciences*, 78: 485 - 494.
- Pesando, D. 1990. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. *Introduction to Applied Phycology*, SPB Academic Publishing, The Hague, 683 p.
- Rodríguez, I. I. & A. D. Rodríguez. 2003. Homopseudopteroxazole, a new antimycobacterial diterpene alkaloid from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Nat. Prod.*, 66: 855-857.
- Rodríguez-Montesinos, Y. E., D.L. Arvizu-Higuera & G. Hernández-Carmona. 2008. Seasonal variation on size and chemical constituents of *Sargassum sinicola* Setchell et Gardner from Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mex. *Phycol. Res.*, 56(1): 33-38.
- Rogério-Pavan, F., C. Q. Fujimura-Leite, R. Gomes-Coelho, I. Duarte-Coutinho, N. Kika-Honda, C. A. Lima-Cardoso, W. Vilegas, S. R. de Andrade-Leite, D. Nakamura Sato. 2009. EVALUATION OF ANTI-*Mycobacterium tuberculosis* ACTIVITY OF *Campomanesia adamantium* (MYRTACEAE). *Quim. Nova.*, 32(5): 1222-1226.
- Rosell, K.G. & L. M. Srivastava. 1987. Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. *Hydrobiologia*, 0: 471-475.

- Saito, H., H. Tomioka & T. Yoneyama. 1984. Growth of group IV mycobacteria on medium containing various saturated and unsaturated fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 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(4): 254-260.
- Sastry, V. M. V. S. & G. R. K. Rao. 1995. Dioctyl phthalate and antibacterial compound from the marine brown alga *Sargassum wightii*. *J. Appl. Phycol.*, 7: 185-186.
- Secretaría de Salud, México. 2012. Casos nuevos de enfermedades de notificación inmediata hasta la semana 1 del 2012. *Epidemiología*, 29(1): 6.
- Secretaría de Salud, México. 2012. Casos nuevos de enfermedades de notificación inmediata hasta la semana 5 del 2012. *Epidemiología*, 29(5): 4.
- Secretaría de Salud, México. 2012. Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas del Aparato Respiratorio hasta la semana epidemiológica 52 del 2011. *Epidemiología*, 29(1): 17.
- Segawa, M. & H. Shirahama. 1987. New plastoquinones of red alga *Sargassum sagamianum* var. *yezoense*. *Chem. Lett.*, 0: 1365-1366.
- Seidel V. & Taylor P. W. 2004: *In vitro* activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 23: 613-619.
- Setchell, W. A. & N. L. Gardner. 1924. The marine algae: expedition of the California Academy of 4<sup>th</sup> series 12: 695-947.
- Shin, S. Y., V. K. Bajpai, H. R. Kim & S. C. Kang. 2007. Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *L. W. T.*, 40: 1515-1519.



- Son, B. W., J. C. Kim & H. D. Choi. 2001. A new diacylgalactolipid containing 4Z-16:1 from the marine *Cyanobacterium Oscillatoria* sp. *Lipids*, 36(4): 427-429.
- Son, B. W., J. C. Kim, S. M. Lee, Y. J. Cho, J. S., Choi, J. S., H. D. Choi & J. C. Song. 2000. New diacylgalactolipids from the marine cyanophycean microalga *Oscillatoria* sp. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 21(11): 1138-1140.
- Stavri, M., R. Schneider, G. O'Donnell, D. Lechner, F. Bucar & S. Gibbons. 2004. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. *Phytother. Res.*, 18: 774-776.
- Suksamrarn, A., M. Buaprom, S. Udtip, N. Nuntawong, R. Haritakun & S. Kanokmedhakul. 2005. Antimycobacterial and antiplasmodial unsaturated carboxylic acid from the twigs of *Scleropyrum wallichianum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 53(10): 1327-1329.
- Telenti, A., W. J. Philipp, S. Sreevatsan, C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser & W. R. Jr. Jacobs. 1997. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.*, 3(5): 567-570.
- Tosun, F., Ç. A. Kızılay, B. Sener, M. Vural & P. Palittapongarnpim. 2004. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J. Ethnopharmacol.*, 95(2): 273-275.
- Wächter, G. A., S. G. Franzblau, G. Montenegro, J. J. Hoffmann, W. M. Maiese & B. N. Timmermann. 2001. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth by saringosterol from *Lessonia nigrescens*. *J. Nat. Prod.*, 64(11): 1463-1464.
- WHO Report. 2011. *Global Tuberculosis Control*. 246 p.
- WHO, 2012. Fact Sheet N-104, Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>

- Wu, W., K. Hasumi, H. Peng, X. Hu, X. Wang & B. Bao. 2009. Fibrinolytic compounds isolated from a brown alga, *Sargassum fulvellum*. *Mar. Drugs*, 7(2): 85-94.
- Zertuche-González, J. A., L. A. Galindo-Bect, I. Pacheco-Ruíz & A. Galvez-Telles. 2006. Time-Space Characterization of Commercial Seaweed Species from the Gulf of California using a Geographical Information System. *J. Appl. Phycol.*, 18: 543-545.
- Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young & S. Cole. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358: 591-593.
- Zheng, C. J., J.-S. Yoo, T.-G. Lee, H.-Y. Cho, Y.-H. Kim & W.-G. Kim. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, 579: 5157-5162.
- Zimhony, O., J. S. Cox, J. T. Welch, C. Vilcheze & W. R. Jr. Jacobs. 2000. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.*, 6: 1043-1047.
- Zou, Y., Y. Li, M. M. Kim, S. H. Lee & S. K. Kim. 2009. Ishigoside, a new glyceroglycolipid isolated from the brown alga *Ishige okamurae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 14(1): 20-26.
- Zubia, M., C. Payri & E. Deslandes. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *J. Appl. Phycol.*, 20(6): 1033-1043.