



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE
BAJA CALIFORNIA**



Facultad de Ciencias Marinas

Influencia de la variación estacional sobre la composición química y actividad biológica de extractos del alga parda *Eisenia arborea*

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO**

PRESENTA

MARCOS ANDRÉS DUARTE GARIBAY

DIRECTORA

M.C. AMARA THAYDE SÁNCHEZ NAVA

Ensenada, Baja California, México 2024



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
CAMPUS ENSENADA**



**"INFLUENCIA DE LA VARIACIÓN ESTACIONAL SOBRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DEL ALGA PARDA *Eisenia arborea*"**

TESIS

**PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OCEANÓLOGO
PRESENTA:**

**Marcos Andrés Duarte Garibay
353770**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

**M.C. Amara Thayde Sánchez Nava
DIRECTOR**

**Dra. Mónica Torres Beltrán
SECRETARIA**

**Dra. Cristina Landa Cansigno
SINODAL**

"Por la Realización Plena del Ser"

C.c.p.- Archivo
C.c.p.- Minutario

Resumen

La intensidad de producción en la acuicultura debido a la creciente demanda ha llevado a afrontar desafíos que afectan la producción como el estrés oxidativo y las infecciones por patógenos (como las bacterias del género *Vibrio*). Una solución ante estos desafíos son los productos naturales marinos, principalmente los provenientes de algas pardas ya que algunos presentan actividad antioxidante y antimicrobiana. Estos productos naturales están sujetos a la ecología química del organismo, puesto que se han realizado estudios donde la composición química del alga, así como las bioactividades de los extractos, varían en respuesta a las condiciones ambientales. Un ejemplo de esto, son las algas del género *Eisenia*, donde se han reportado estas variaciones con respecto a la temperatura principalmente. En este trabajo se determinó la influencia de la variación estacional en la composición química de láminas de *Eisenia arborea* de la Bahía de Todos Santos (BTS), Baja California (BC), así como en el potencial antibacteriano (antibiogramas contra *V. harveyi*) y antioxidante (ensayos DPPH y FRAP) de extractos elaborados con tres solventes de diferente polaridad. Se identificaron diferencias en la composición química en relación con la estación para los valores de humedad, cenizas y carbohidratos, con mayor porcentaje de humedad y cenizas en invierno en comparación al verano, y mayor en verano en comparación al invierno en el caso de los carbohidratos. Con respecto a las bioactividades, los extractos de MeOH y AcOEt presentaron tanto actividad antibacteriana como antioxidante, donde los de AcOEt fueron los de mayor bioactividad, a la vez que su contenido de fenoles totales fue mayor. Se identificó que tanto la actividad antibacteriana como la antioxidante (FRAP) fue mayor en la temporada de invierno en comparación a verano. El extracto de invierno de AcOEt fue el que presentó mayor actividad antibacteriana (17 mm de halo de inhibición) y antioxidante ($EC_{50} = 83 \mu\text{g/ml}$ en DPPH y $341.03 \mu\text{MTE/g}$ en FRAP). En este extracto se determinó la presencia de compuestos fenólicos y ácidos grasos, posibles responsables de la actividad antioxidante. Estos resultados sugieren que la ecología química de *E. arborea* de la BTS influye significativamente en la composición química de las láminas, así como en las actividades biológicas de los extractos. Gracias a estos resultados, se reconoce el potencial antimicrobiano y antioxidante de *E. arborea* para su uso en la industria acuícola.

Palabras clave: ecología química, algas pardas, antimicrobiano, antioxidante

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California por brindarme un ambiente colaborativo, un desarrollo profesional y experiencias de vida.

A la M. en C. Amara Thayde Sanchez Nava por todo el apoyo que me proporcionó para la realización de este trabajo, desde los conocimientos necesarios, hasta las oportunidades para investigar más y que esto fuera lo que es hoy.

A la Dra. Mónica Torres Beltrán por su apoyo en diferentes ámbitos de este proyecto, por las pláticas inspiradoras, creativas y con visión a más investigaciones y más preguntas a resolver.

A la Dra. Cristina Landa Cansigno por su guía y apoyo en temas que aún eran un poco desconocidos para mí, por facilitarme poder aprender cosas relacionadas a este trabajo, tanto antes de participar en el comité como durante.

Al Laboratorio de Nutrición Acuícola de la Facultad de Ciencias Marinas, especialmente a L.B.A.Samantha Victoria Cota por su apoyo en la determinación química proximal.

Al Laboratorio de Botánica Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por brindar el espacio físico así como el material donde se llevaron a cabo algunos ensayos, especialmente a la Oc. Karla Loeza por su guía y apoyo en la determinación de contenido de proteínas por el método Lowry.

Al Laboratorio de Agroquímica y Productos Naturales por su apoyo en la determinación del contenido de fenoles totales.

Al Laboratorio 2-6 de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM (IQ), especialmente al Dr. Leovigildo Quijano por su apoyo y conocimientos en materia de química de productos naturales.

Al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC-IQ) por su apoyo en análisis y determinaciones de RMN, principalmente a la M. en C. Mayra León Santiago y el M. en C. Everardo Tapia Mendoza. También el agradecimiento a Mayra León por su apoyo en el análisis de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

A MexCal por su apoyo, indicaciones y seguridad en los muestreos que me dieron la oportunidad de realizar.

A mi madre Laura, que me enseñó a luchar por mis sueños y no rendirme y por darme el soporte que necesité a lo largo de la carrera.

A mi padre Hector, que me otorgó las enseñanzas necesarias para afrontar la vida y todos los obstáculos que esta puede poner.

A la Dra. Karina Lugo por sus consejos y su impulso para desarrollarme como profesional y como persona.

A mis compañeras de laboratorio Andrea Zamora, Natalye Manriquez e Itzel Carrillo por darme guía y resolver dudas que surgían, así como su compañía para hacer ameno el tiempo.

A mi tío Felipe de Jesús Contreras G. por su apoyo incondicional, sus consejos y su confianza en mí.

A todos mis amigos que formaron parte de la familia que yo elegí, principalmente a Alejandra Reyes, Andrés Romero y José Pablo Morelos con quienes tengo recuerdos inolvidables y me han dado la confianza para expresarme como soy.

A mis amigos de intercambio Aggeliki Psycha, Mihaela Nedic y Vicente del Río por su compañía, fugaz pero llena de felicidad, que me inspiró a seguir buscando viajar.

Dedicatoria

A mis padres, y a mi abuela, por su amor, porque sin ellos, no sería lo que soy hoy, y no sería lo que seré mañana.

A todas las personas que se interesan en el mar y en la ciencia.

A aquellos que siempre buscan más.

Tabla de Contenido

Resumen	3
Agradecimientos	4
Dedicatoria	6
Índice de figuras	9
1. Introducción	11
1.1. Antecedentes	13
1.1.1. Productos Naturales de Algas Pardas	13
1.1.2. Generalidades de <i>Eisenia arborea</i> y Composición Química	19
1.2. Justificación	22
2. Hipótesis	24
3. Objetivos	24
General	24
Particulares	24
4. Área de Estudio - Bahía Todos Santos	25
5. Metodología	26
5.1. Recolecta de ejemplares y determinación taxonómica	26
5.2. Preparación y secado (liofilizado)	27
5.3. Determinación de composición química proximal	28
5.4. Extracción por percolación	28
5.5. Cromatografía en capa fina (CCF)	29
5.6. Pruebas Biológicas	30
5.6.1. Prueba Antibacteriana (Antibiogramas)	30
5.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante	31
6. Contenido de Fenoles Totales	34
6.1. Pre-fraccionamiento y caracterización química	35
6.2. Prueba antioxidante con fracciones	36
6.3. Temperatura Superficial y Radiación	37
6.4. Análisis Estadístico	37
7. Resultados	38
7.1. Composición química de <i>E. arborea</i>	38
7.2. Rendimiento de Extractos Crudos	40
7.3. Cromatografía en Capa Fina	40
7.4. Actividad Antibacteriana	42
7.5. Actividad Antioxidante	44
7.6. Contenido de Fenoles Totales	46
7.7. Pre-fraccionamiento	47
7.7.1. Actividad Antioxidante de Fracciones	49
7.8. Temperatura superficial y radiación	50
8. Discusión	54
8.1. Proximales y estacionalidad	54

8.2. Rendimiento	57
8.3. Actividad Antibacteriana	58
8.4. Actividad Antioxidante	59
8.5. Contenido de Fenoles	61
8.6. Pre-fraccionamiento y Actividad Antioxidante de Fracciones	62
9. Conclusiones	64
10. Recomendaciones	64
11. Referencias Bibliográficas	66
12. Anexos	73

Índice de figuras

Figura 1. Esteroles reportados en <i>Ecklonia cava</i> , familia Lessoniaceae (autoría propia, estructuras recopiladas de Li <i>et al.</i> , 2009).	16
Figura 2. Florotaninos reportados en <i>Ecklonia cava</i> y algas del género <i>Eisenia</i> (modificado de Hafez-Ghoran & Kijjoo, 2021, Kang <i>et al.</i> , 2005, Li <i>et al.</i> , 2009, Shibata <i>et al.</i> , 2008 y Sugiura <i>et al.</i> , 2006).....	17
Figura 3. Taxonomía de <i>Eisenia arborea</i> Areschoug (Modificado de AlgaeBase, 2024).	19
Figura 4. a) Morfología del talo de <i>Eisenia arborea</i> (modificado de Abbott & Hollenberg, 1976). b) <i>E. arborea</i> en Campo Kennedy (autoría propia).....	20
Figura 5. Mapa de distribución de <i>Eisenia arborea</i> (autoría propia con el software Octave 9.2; datos recopilados de este trabajo y OBIS, 2024).	21
Figura 6. Localización del punto de recolecta en Bahía Todos Santos, México (Recuperada de Google Earth, 2024).	26
Figura 7. Organismos de <i>Eisenia arborea</i> en Campo Kennedy (autoría propia).	27
Figura 8. Diagrama de flujo de elaboración de extractos de alga seca.....	29
Figura 9. Diagrama de flujo de cromatografía (ejemplo con fase normal).	30
Figura 10. Diagrama de flujo de prueba de actividad antibacteriana por método de difusión en placa con sensidiscos.	31
Figura 11. Diagrama de flujo de ensayo de secuestro del radical DPPH (cribado).	32
Figura 12. Diagrama de flujo de ensayo de secuestro del radical DPPH (EC ₅₀).	33
Figura 13. Diagrama de flujo de ensayo de FRAP.	34
Figura 14. CCF de extracto AcOEt-Invierno (revelado con sulfato cérico).	35
Figura 15. Contenido de proteínas por método.	39
Figura 16. CCF de extractos de CH ₂ Cl ₂ (A) normal (B) bajo luz UV 365 nm (C) bajo luz UV 254 nm (Ver= verano; Oto= otoño; Inv= invierno). Foto sin revelador de sulfato cérico.	41
Figura 17. CCF de extractos de AcOEt (A) normal (B) bajo luz UV 365 nm (C) bajo luz UV 254 nm (Ver= verano; Oto= otoño; Inv= invierno). Foto sin revelador de sulfato cérico.	41
Figura 18. CCF de extractos de MeOH (A) normal (B) bajo luz UV 365 nm (C) bajo luz UV 254 nm (Ver= verano; Oto= otoño; Inv= invierno). Foto sin revelador de sulfato cérico.	42

Figura 19. Antibiógramas con bacteria <i>Vibrio harveyi</i> (A) Blanco de diclorometano (B) Extracto de AcOEt de otoño (C) Control de Florfenicol.	43
Figura 20. Actividad antioxidante FRAP de extractos de <i>E. arborea</i> . Letras diferentes indican diferencia de medianas entre estaciones ($p<0.05$).	45
Figura 21. Actividad FRAP de extractos de acuerdo al solvente. Letras diferentes indican diferencia de medianas estaciones ($p<0.05$).	46
Figura 22. CCF de fracción 2 y filtrados (A) fracción 2 en sistema CH_2Cl_2 :AcOEt 8:2 (B) fracciones 2h y 2s en mismo sistema (C) fracciones en sistema CH_2Cl_2 :AcOEt 1:1 (todos revelados con sulfato cérico).	48
Figura 23. Eckol presente en fracción 2s, interpretación de resultados de RMN. Números en negro son desplazamientos químicos (J) en acetona- d_6 , números en rojo son los reportados en DMSO- d_6 (Okada et al. 2004).	48
Figura 24. Compuestos presentes en la fracción 2h con base en GC-MS. N.I.= No identificados.	49
Figura 26. (A) Temperatura e (B) índice UV en los días considerados para verano 2023 de este trabajo.	51
Figura 27. (A) Temperatura e (B) índice UV en los días considerados para otoño 2023 de este trabajo.	52
Figura 28. (A) Temperatura e (B) índice UV en los días considerados para invierno 2024 de este trabajo.	53

1. Introducción

En la actualidad existe una creciente demanda mundial de alimentos acuáticos, por lo que una solución para satisfacer esta demanda de forma sostenible es la acuicultura que consiste en el cultivo de organismos acuáticos, ya sea en agua dulce o salada (FAO, 2024). De hecho, en el año 2022 la producción en acuicultura (de animales) superó por primera vez a la pesca de captura (94.4 millones de toneladas y 91 millones de toneladas, respectivamente), lo que destaca la importancia de la acuicultura en años futuros (FAO, 2024).

Un desafío a afrontar en la acuicultura es el estrés oxidativo, causado principalmente por un exceso de los radicales libres o especies reactivas al oxígeno (SRO), estos radicales libres tienen, al menos, un electrón no apareado, son en extremo reactivos y capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, lo que puede provocar un daño a nivel celular o de tejido, causando alteraciones funcionales, enfermedades graves y una mayor susceptibilidad a diferentes situaciones de estrés y organismos patógenos (Huerta-Jiménez *et al.*, 2005; Perán-Alarcos, 2020).

Otro desafío que enfrenta la acuicultura es la inocuidad, principalmente el control de patógenos. Entre estos, destacan las bacterias del género *Vibrio* (familia Vibrionaceae), organismos gram negativos oportunistas que son abundantes en ambientes acuáticos tanto de agua dulce como de agua salada. Principalmente ocurren en mayor abundancia cuando hay una gran densidad de organismos, como suele ocurrir en cultivos de acuicultura (Thompson *et al.*, 2004). Estos microorganismos causan mortalidad principalmente en estados larvales y juveniles, así como pueden afectar el desarrollo y crecimiento de peces y camarones, principalmente (Thompson *et al.*, 2004).

En específico, *Vibrio harveyi* es una bacteria que afecta tanto a peces como organismos invertebrados (principalmente camarones), causando diferentes enfermedades como gastroenteritis y úlceras en la piel (peces), o enfermedad de cola blanca y necrosis hepatopancreática (camarones), lo que representa un gran problema para cultivos a nivel global (Zhang *et al.*, 2020).

Está documentado que desde la antigüedad se hace uso de diferentes plantas y hierbas con propósitos medicinales debido a que presentan una actividad biológica

(Sáenz-Campos, 2004). Debido a esto, se han aislado e identificado compuestos químicos o sustancias que producen dichos organismos, denominados “productos naturales” y se pueden extraer tanto de organismos como plantas, hasta microorganismos como bacterias (Sáenz-Campos, 2004). Los productos naturales son metabolitos secundarios o moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en el metabolismo primario (fotosíntesis o asimilación de nutrientes por ejemplo) pero pueden tener funciones ecológicas específicas (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009). Algunas de estas funciones pueden ser una adaptación a condiciones desfavorables que generan un estrés en el organismo o defensa ante depredadores o frente a patógenos, por mencionar algunos casos (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009). En muchos casos estos metabolitos secundarios presentan actividades biológicas (bioactividad) i.e. antiinflamatorios y antioxidantes, que pueden ser utilizadas en otras aplicaciones de los mismos ya sea en la cosmética, agricultura, la industria de polímeros, alimentaria y principalmente en la farmacéutica (Khan, 2018).

Esta interacción del organismo con su entorno (factores bióticos y abióticos) por medio de sustancias químicas se le denomina ecología química. La ecología química estudia a nivel ecológico y biológico, cómo funcionan las interacciones químicas de una comunidad y gracias a esto, entender el funcionamiento de los metabolitos secundarios y las posibles aplicaciones biotecnológicas que puedan tener (Cortez, 2013). Como éstos se producen en respuesta a los diferentes factores ambientales, el organismo puede variar su producción según la temperatura o disponibilidad de nutrientes (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009; Kennedy-Costa *et al.*, 2022.); por esta razón, organismos de la misma especie pero diferente zona pueden producir metabolitos diferentes (Cortez, 2013).

Una reciente fuente de productos naturales que presentan alguna bioactividad son los organismos marinos. A estos productos también se les conoce como “Productos Naturales Marinos” (PNM) y son ampliamente diversos debido a la biodiversidad que se puede encontrar en los mares, tanto a nivel microscópico como bacterias y hongos, como a nivel macroscópico como peces y macroalgas (Jiménez, 2018). En particular, las macroalgas marinas son organismos eucariotas multicelulares que tienen grandes tasas fotosintéticas por lo que son considerados como grandes productores de biomasa en el ambiente marino, y a diferencia de las plantas terrestres, no cuentan con flores, sistema vascular ni raíces (Salehi *et al.*,

2019). Se clasifican en 3 grupos/filos con base a sus pigmentos: algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas pardas (Phaeophyta). Se consumen principalmente en el mercado asiático porque son fuente de vitaminas, carbohidratos y minerales, además se ha reportado que también cuentan con compuestos bioactivos como fenoles, ácidos grasos y pigmentos que funcionan como antioxidantes y antidiabéticos, principalmente (Park *et al.*, 2023; Salehi *et al.*, 2019).

En cuanto a las algas pardas, estas cuentan con una gran diversidad de compuestos con mayor bioactividad en comparación a algunas plantas terrestres, algas verdes y algas rojas (Park *et al.*, 2023). De este grupo se han reportado bioactividades de metabolitos primarios como pigmentos, ácidos grasos o polisacáridos como el fucoïdan y los alginatos (función estructural en el organismo, se han reportado actividades antiinflamatoria, reparadora de tejidos y como agente gelificante) o el laminarin (función de almacenamiento de glucosa, se han estudiado actividades antitumorales y anticoagulantes en su forma sulfatada) principalmente (Salehi *et al.*, 2019). Con respecto a los metabolitos secundarios, estos organismos cuentan con el pigmento fucoxantina y compuestos fenólicos (función de protección ante radiación UV) que han reportado actividad antioxidante, antitumoral, antimicrobiana y antialérgica (Gisbert *et al.*, 2023; Lovstad-Holdt y Kraan, 2011).

Como se mencionó anteriormente, la producción de los PNM puede variar dependiendo de las características del ambiente incluyendo la temperatura del agua, salinidad, radiación solar, nutrientes y los movimientos físicos del agua como las corrientes y las mareas, que influyen en la composición química de las algas pardas, es decir, el porcentaje de carbohidratos, lípidos y proteínas (Konstantin *et al.*, 2023). Al igual que la composición química, la producción de metabolitos secundarios también se verá afectada por dichos factores, así como los factores bióticos como organismos epífitos o pastoreo (Praiboon *et al.*, 2018).

1.1. Antecedentes

1.1.1. Productos Naturales de Algas Pardas

Existe un creciente interés en la química de productos naturales de algas pardas ya sea para una extracción directa del organismo, o para determinar la estructura del compuesto con bioactividad y realizar la síntesis por otros medios,

principalmente para el área de la industria de la salud. Como son organismos ricos en nutrientes, se han utilizado mucho en la industria alimenticia, donde las algas pardas son las más consumidas de los 3 grupos (66.5%) a nivel mundial (Park *et al.*, 2023). Debido a esto, se han realizado estudios para determinar los beneficios tanto nutricionales como bioactivos que pueden presentar los diferentes grupos de compuestos en algas pardas (Tabla I).

Tabla I. Recopilación breve de compuestos estudiados de algas pardas con respecto a su grupo y sus beneficios/bioactividades reportadas.

Grupo de Compuestos	Compuestos Estudiados	Datos/Bioactividades	Referencia
Cenizas	Macrominerales y elementos traza	40% de peso seco en algas del género <i>Undaria</i> (mayor en comparación a vegetales terrestres)	(Lovstad-Holdt y Kraan, 2011)
Carbohidratos	Ácido algínico/alginato	Efecto antihipertensivo	(Ajanth <i>et al.</i> , 2019)
	Fucoidan	Antioxidante, antitumoral y antiviral	
	Laminarin	Anticoagulante y estimulante del sistema inmune	
Proteínas	Laminina	Efecto hipertensivo	(Lovstad-Holdt y Kraan, 2011)
Lípidos	Fucoesterol	Reducir la concentración del colesterol en el organismo (se encuentra principalmente en <i>Laminaria</i> y <i>Undaria</i>)	(Nur <i>et al.</i> , 2021)
Pigmentos	Fucoxantina	Reducción en las células de cáncer de próstata	(Lovstad-Holdt y Kraan, 2011)
Metabolitos secundarios (polifenoles)	Fucol	Antioxidante	(Zubia <i>et al.</i> , 2009)
	Eckol	Antioxidante, antimicrobiano y antiinflamatorio	(Manandhar <i>et al.</i> , 2019)

En varios estudios se ha reportado que el rendimiento de cada grupo de compuestos presentes en algas puede variar mucho entre géneros y especies, así como también varía con respecto a la estación de recolecta (Lovstad-Holdt y Kraan,

2011). Las variaciones químicas de las algas traen en consecuencia variaciones en la bioactividad de los productos naturales (Park *et al.*, 2023).

La respuesta metabólica de las algas puede variar según la especie y el tipo de ambiente en el que se encuentre, por ejemplo, las adaptaciones de un alga en un ambiente frío y seco son diferentes a las que tiene en un ambiente tropical donde aparte de la temperatura, la lluvia toma mayor importancia por el aporte de nutrientes de origen terrestre y una variación en la salinidad (Praiboon *et al.*, 2017). Sobre la estación de recolecta, los principales factores ecológicos que se han estudiado son: la temperatura, la radiación solar, la disponibilidad de nutrientes, y el efecto de las mareas y la velocidad de las corrientes (Konstantin *et al.*, 2023). Se ha reportado que la temperatura afecta al crecimiento y desarrollo de las algas, siendo que la concentración de lípidos y proteínas aumenta en relación a un incremento en la temperatura, aunque también hay evidencia de que en temperaturas frías hay mayor síntesis de proteínas (debido a una mayor cantidad de nutrientes) (Praiboon *et al.*, 2017). La radiación solar por su parte, influye en la biosíntesis de lípidos y pigmentos, por lo que se ha desarrollado la capacidad de producir fotoprotectores (entre ellos, los polifenoles, en algas pardas se les denomina florotaninos) (Serviere-Zaragoza *et al.*, 2014). La disponibilidad de nutrientes puede inhibir o estimular la síntesis de lípidos (Konstantin *et al.*, 2023). Finalmente el efecto de la marea y la velocidad de corrientes pueden exponer a las algas a la atmósfera (algas en el intermareal) donde se encuentran en zonas de mayor irradiancia por lo que responden produciendo fotoprotectores (Konstantin *et al.*, 2023). La fuerza del movimiento del agua por las corrientes, estimula la síntesis de polisacáridos como los alginatos para obtener mayor elasticidad y resistir dichos movimientos (Konstantin *et al.*, 2023).

Se han realizado diversos estudios de composición química de algas con especies del Orden (Laminariales). Un caso de estudio es el enfocado en investigar la variación estacional de la composición química de *Laminaria digitata*, *L. hyperborea*, *Saccharina latissima* y *Alaria esculenta* en las costas de Escocia para identificar mejores temporadas de recolecta. El trabajo realizado por Schiener *et al.* (2015) reporta que los mayores contenidos de ceniza y de proteínas se encontraron en invierno, el de carbohidratos en otoño y el de polifenoles en verano. A su vez, los autores reportaron que hay una correlación negativa de valores máximos de carbohidratos, con valores reducidos de proteínas, cenizas y polifenoles (Schiener *et*

al., 2015). Otro estudio donde se trabajó con las algas *L. digitata* y *S. latissima* recolectadas en las Islas Solovetsky, Rusia, reportaron que el contenido de cenizas es menor entre finales de verano e inicios de otoño mientras que el contenido de polifenoles no siguió una tendencia general aunque en *L. digitata* la estación con menor contenido fue en otoño (Konstantin *et al.*, 2023).

Dentro de la familia Lessoniaceae, un estudio realizado por Li *et al.* (2009) describió los componentes químicos y efecto antioxidante del alga *Ecklonia cava* recolectada en la Isla Jeju de Corea. El trabajo reportó la presencia de 3 esteroides (fucosterol, colesterol y ergosterol) y 7 florotaninos (7-floroeckol, 6,6'-bieckol, floroglucinol, eckol, fucodifloroetol G, florofucofuroeckol A y dieckol). De los cuales todos los florotaninos presentaron actividad antioxidante contra los radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), hidroxilo y peroxilo. Los valores más altos los presentaron el 6,6'-bieckol, el dieckol y el fucodifloroetol (Fig. 1 y Fig. 2; Li *et al.*, 2009). Otro estudio analizó el compuesto Eckol obtenido de *Ecklonia cava* de la Isla Jeju de Corea en su interacción con células con estrés oxidativo inducido (secuestro del radical DPPH, de hidroxilo, efecto en catalasa y en proteína kinasa extracelular de señal-regulada). Los autores identificaron que el eckol aparte de funcionar como antioxidante directo por secuestro de radicales, ayuda a proteger a las células como un estimulante de la actividad antioxidante celular (Kang *et al.*, 2005).

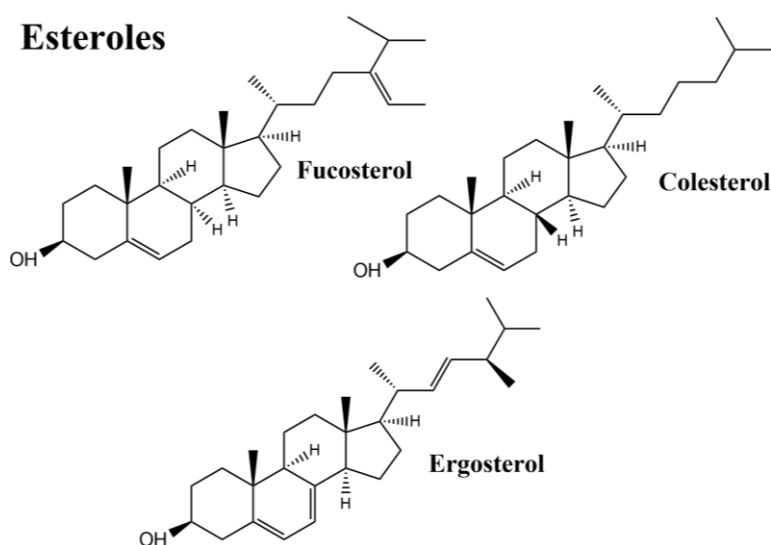


Figura 1. Esteroides reportados en *Ecklonia cava*, familia Lessoniaceae (autoría propia, estructuras recopiladas de Li *et al.*, 2009).

Polifenoles

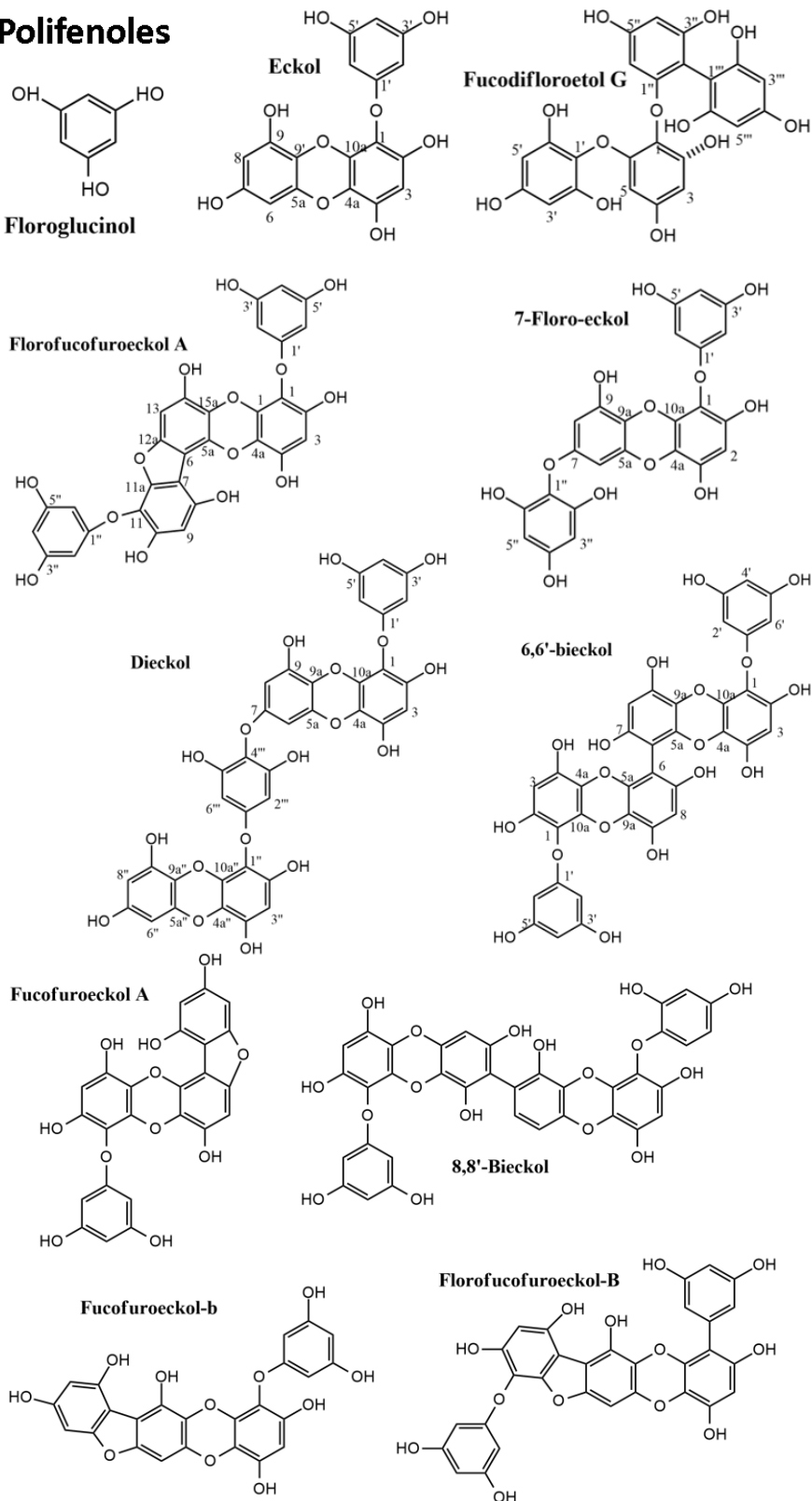


Figura 2. Florotaninos reportados en *Ecklonia cava* y algas del género *Eisenia* (modificado de Hafez-Ghoran & Kijjoa, 2021, Kang et al., 2005, Li et al., 2009, Shibata et al., 2008 y Sugiura et al., 2006).

Con respecto a algas del género *Eisenia*, se han realizado estudios de diferentes localidades sobre actividades antioxidantes que presentan los extractos (obtenidos por diferentes métodos), así como otras bioactividades como la antihistamínica (Tabla II).

Tabla II. Actividades biológicas reportadas para florotaninos aislados del género *Eisenia*.

Especie y Origen	Método de Extracción	Ensayo de Bioactividad	Principales Resultados	Referencia
<i>E. bicyclis</i> de Japón	Extracción de florotaninos con el método de Folch	Secuestro de radical anión superóxido	EC ₅₀ con valores de 6.5-8.4 µM	(Shibata <i>et al.</i> , 2008)
		Secuestro de radical DPPH	EC ₅₀ con valores de 12-26 µM	
<i>E. arborea</i> de BCS, México	Extracción por maceración con etanol	Secuestro de radical DPPH	EC ₅₀ con valor de 55 (láminas en noviembre)	(Landa-Cansigno <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. arborea</i> de BCS, México	Extracción secuencial por maceración con tres solventes y fraccionamiento del etanol:agua (1:1)	Secuestro de radical DPPH	Fracción 2 con valor de EC ₅₀ de 0.07 mg/ml	(Tenorio-Rodríguez <i>et al.</i> , 2019)
		Reducción de hierro (FRAP)	Fracción 2 con valor de 42.3 mM eq FESO ₄ /g	
<i>E. arborea</i> de BC, México	Extracción por maceración en metanol y fraccionamiento	Secuestro de radical DPPH	Fracción de n-butanol con valor de inhibición de 81.3%; eckol con valor de 76.8%*	(Shin <i>et al.</i> , 2021)
<i>E. bicyclis</i> de Corea del Sur	Obtención de Fucofuroeckol-b de fracción de AcOEt del extracto etanólico	Actividad inhibitoria de β-secretasa (relacionada con enfermedad de Alzheimer)	EC ₅₀ con valor de 16.1 µM	(Lee & Byun, 2018)
<i>Eisenia</i> sp.de Japón**	Obtención de Florofucofuroeckol-B de extracto de hexano	Actividad inhibitoria de liberación de histamina (relacionada con alergias)	EC ₅₀ con valor de 7.8 µM	(Sugiura <i>et al.</i> , 2006)

* Se utilizó 100 µg/ml de extracto/compuesto para las pruebas.

Muchos de los estudios que se han realizado en especies de *Eisenia* se han enfocado en los compuestos florotaninos, entre los cuales se han logrado aislar e

identificar 9 compuestos presentes en el género *Eisenia* (Fig. 2), como el floroglucinol, eckol, florofucofuroeckol A, dieckol y 7-floroeckol (Shibata *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2021), fucofuroeckol A y fucofuroeckol-b, florofucofuroeckol-B y el 8,8'-bieckol (Fig. 2; Hafez-Ghoran & Kijjoa, 2021, Shibata *et al.*, 2008 y Sugiura *et al.*, 2006).

Otras evaluaciones de bioactividad en la especie *E. arborea* ha sido la antimicrobiana. Se han reportado estudios de la actividad antiviral de extractos de *E. arborea* recolectada de Punta China, Baja California, contra virus del sarampión. El estudio reportó la actividad por ensayo de reducción de sincicio en células vero y se reportó un EC₅₀ de 2.6 µg/ml de extracto rico en polifenoles y 0.275 µg/ml de extracto rico en polisacáridos sulfatados (Morán-Santibañez *et al.*, 2016; Morán-Santibañez *et al.*, 2018). Además se ha reportado la actividad anti necrosis hepatopancreática aguda, enfermedad presente en camarones causada por *Vibrio parahaemolyticus*. La evaluación se realizó con extractos de *E. arborea* recolectada en Baja California Sur; se calculó la concentración mínima bactericida (CMB) con el método de dilución de caldo con la bacteria *V. parahaemolyticus*, donde el extracto crudo reportó una CMB de 3500 µg/ml, y una fracción con 5.23mg/g de eckol y 1.67 mg/g de dieckol reportó una CMB de 350 µg/ml, mejorando la efectividad considerablemente (González-Colunga *et al.*, 2019).

1.1.2. Generalidades de *Eisenia arborea* y Composición Química

En la Península de Baja California (BC), México, se puede encontrar el alga parda *Eisenia arborea* Areschoug (sinonimia de *Ecklonia arborea* de acuerdo a AlgaeBase, 2024). *E. arborea* pertenece al filo Ochrophyta al ser un alga parda, y se encuentra en el orden de los Laminariales, por eso se puede apreciar su similitud con otros géneros como *Laminaria* (Fig. 3; AlgaeBase, 2024).

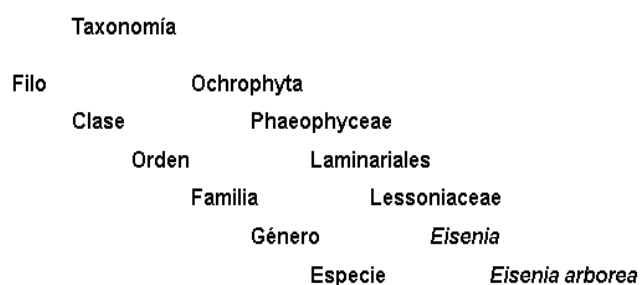


Figura 3. Taxonomía de *Eisenia arborea* Areschoug (Modificado de AlgaeBase, 2024).

Su forma se compone de una estructura de fijación (crampón) debido a que se encuentra en hábitat rocoso, y un talo que se bifurca en un estipe con varias láminas suaves y resbaladizas que pueden alcanzar hasta 1.5 metros de altura (Fig. 4), con los bordes de las láminas en forma de sierra, rasgo que la caracteriza de otras especies (SIMoN, 2024). La especie en su forma joven es diferente en apariencia con un estipe corto y una lámina larga y ancha al final (10-15 cm) que al crecer se transforma en la bifurcación (SIMoN, 2024).

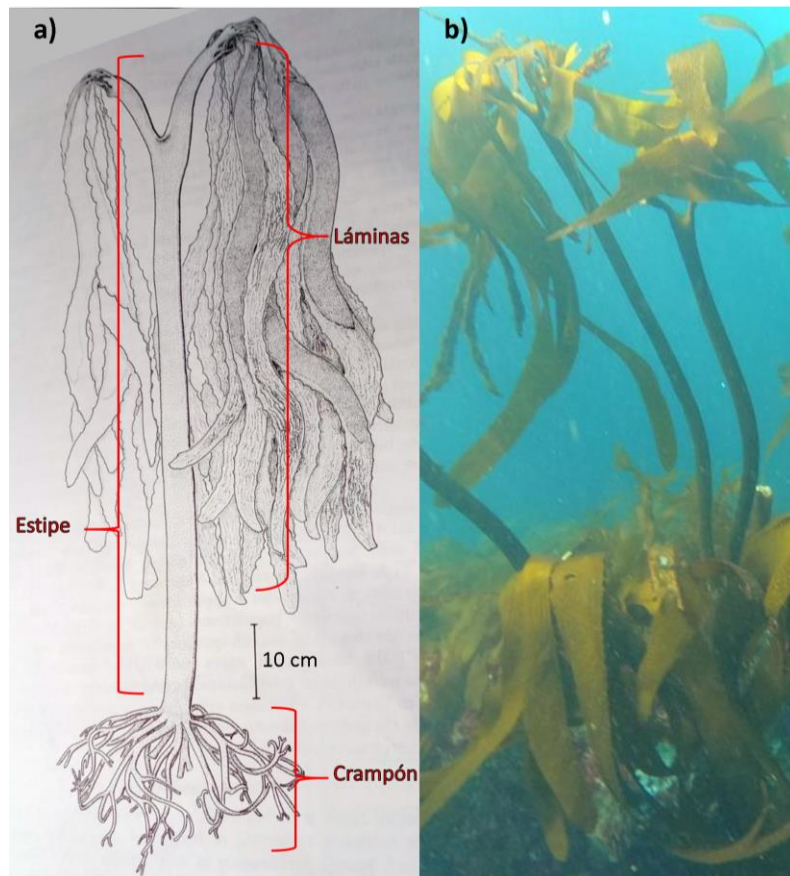


Figura 4. a) Morfología del talo de *Eisenia arborea* (modificado de Abbott & Hollenberg, 1976). b) *E. arborea* en Campo Kennedy (autoría propia).

Esta especie perenne se encuentra a una profundidad de 0 a 20 metros, en el submareal (aunque también se puede encontrar en el intermareal medio-bajo), por lo que está expuesta a la energía del oleaje y las mareas (SIMoN, 2024). Los mantos que puede formar *E. arborea* son importantes ecológicamente, ya que su estructura funciona como un hábitat para otros organismos, por lo que son una pieza clave para el ecosistema (Parada-Sánchez, 2005). Su ciclo de vida se caracteriza por tener alternancia de generaciones heteromórfica, una fase diploide macroscópica (esporofito) y una haploide microscópica (gametofito), donde el esporofito es el que

desarrolla el tejido reproductivo denominado “soros”, estructura que se presenta principalmente en las épocas de otoño-invierno (Parada-Sánchez, 2005).

E. arborea es un organismo fotoautótrofo por lo que obtiene su energía por fotosíntesis, a su vez que compite con otras especies como *Macrocystis pyrifera* (misma familia) por espacio y nutrientes (SIMoN, 2024). Además, contribuyen al flujo energético del ecosistema al ser consumidas por varias especies de crustáceos y moluscos. Su distribución abarca desde las costas de Baja California Sur (BCS), México, hasta las costas sur de Alaska, EUA (Fig. 5); existen algunos reportes de *E. arborea* en las costas de Japón (AlgaeBase, 2024; WoRMS, 2024).

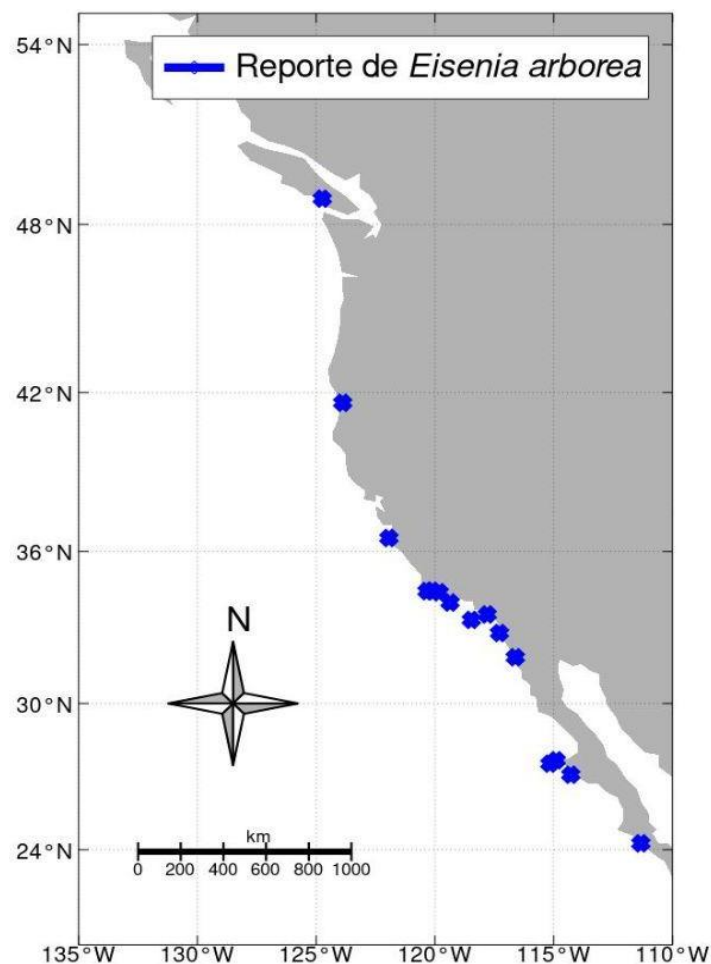


Figura 5. Mapa de distribución de *Eisenia arborea* (autoría propia con el software Octave 9.2; datos recopilados de este trabajo y OBIS, 2024).

Se han realizado algunos estudios con extractos de *E. arborea*, donde se presentan polifenoles, así como se reportan actividades antioxidantes y

antiinflamatorias, entre otras (Tenorio-Rodríguez *et al.*, 2019). Con respecto a su composición química, hay estudios que reportan cómo la variación ambiental afecta en los porcentajes de cada tipo de compuestos, además de que se pueden observar variaciones con respecto a la localidad de recolecta (Arvizu *et al.*, 2007; Hernández-Carmona *et al.*, 2009; Landa-Cansigno, 2015; Tabla III).

Tabla III. Variación de composición química de *E. arborea* reportada en distintas estaciones y localidades.

Grupo de Compuestos	Variación estacional del porcentaje	Localidad
Humedad	Mayor en noviembre (17.7%), menor en marzo (10.4%)	Bahía Magdalena, BCS ^b
Proteínas	Mayor en mayo y diciembre (11.6%), menor en marzo (5.5%)	Bahía Asunción, BCS ^a
	Mayor en mayo (12.5% en láminas)	Bahía Magdalena, BCS ^c
Cenizas	Mayor en marzo (29.3%), menor en septiembre (19.2%)	Bahía Asunción, BCS ^a
	Promedio de 31.8% (en láminas)	Bahía Magdalena, BCS ^b
	Mayor en enero (33.72% en láminas)	Bahía Magdalena, BCS ^c
Lípidos	Promedio de 0.60%, solo disminuyó en mayo y junio a 0.45%.	Bahía Asunción, BCS ^a
	Mayor en enero (0.25% en láminas)	Bahía Magdalena, BCS ^c
Carbohidratos	Mayor en septiembre (54.30%), menor en diciembre (43.32%)	Bahía Asunción, BCS ^a
	Mayor en julio (55% en láminas)	Bahía Magdalena, BCS ^c
	Promedio de 22.9% de alginatos	Bahía Magdalena, BCS ^b

a= (Hernández-Carmona *et al.*, 2009).

b= (Arvizu *et al.*, 2007).

c= (Landa-Cansigno, 2015).

1.2. Justificación

En la actualidad, el estrés oxidativo representa un problema para la salud acuícola y humana, ya que provoca enfermedades como gastroenteritis y necrosis

hepatopancreática en camarones (Beltrán-Velarde, 2011; Perán-Alarcos, 2020; Zhang *et al.*, 2020), y otras como enfermedades cancerígenas o degenerativas como el Alzheimer (Coronado *et al.*, 2015) en humanos. Por estos motivos, encontrar compuestos con propiedad antioxidante y/o antibacteriano puede facilitar el desarrollo de tratamientos de uso directo en cultivos acuícolas, así como aquellos que pueden favorecer a investigaciones en salud humana.

Las algas marinas resultan en una fuente de bioactivos con aplicación antioxidante. No obstante, las diferencias que pueden existir entre los ecosistemas, provocan que la composición química varíe tal como se ha observado en otros estudios (Hernández-Carmona *et al.*, 2009; Landa-Cansigno, 2015). Ligado a esto, se conoce que la variación estacional puede influir en la composición química así como en la bioactividad que presenta un organismo (Lovstad-Holdt y Kraan, 2011; Landa-Cansigno, 2015). Es por ello, que para proponer el aprovechamiento de las algas, se recomienda analizar la composición química en un punto geográfico específico, así como estudiar la influencia estacional en su composición química. Particularmente se han reportado compuestos bioactivos de *E. arborea*, principalmente en estudios realizados con algas de localidades en Baja California Sur. Sin embargo, no hay estudios que se enfoquen en la composición química y bioactividad de algas de la Bahía de Todos Santos, Baja California.

Se conoce que el alga *E. arborea* sintetiza compuestos con actividad antioxidante (principalmente actividad de secuestro del radical DPPH) y actividad antimicrobiana (incluso contra otra especie de *Vibrio*). Recientemente se han realizado estudios para identificar sitios aptos para una maricultura comercial a escala piloto y con las condiciones necesarias para su cultivo (Altamirano-Gómez, 2017; Zertuche-González *et al.*, 2022). Esto abre la oportunidad para una obtención de PNM de *Eisenia arborea* de forma sustentable en el tiempo. Por lo cual, este estudio describirá por primera vez la composición química y la variación estacional en un sitio específico, que permitan sentar bases para la elección de épocas de cosecha y del efecto de los factores bióticos en la síntesis de bioactivos.

2. Hipótesis

H1: Los cambios estacionales provocan diferencias en la composición química de las láminas de *E. arborea*, lo cual influye a su vez en la actividad antimicrobiana y antioxidante.

H2: Los compuestos con actividades antioxidante y antimicrobiana variarán con respecto a la polaridad del solvente con el que se realizó cada extracto.

3. Objetivos

General

- Identificar cambios en la composición química, la actividad antimicrobiana y la actividad antioxidante de los extractos del alga parda *Eisenia arborea* asociados a la variación estacional en Campo Kennedy, Bahía de Todos Santos, Baja California.

Particulares

- ❖ Identificar si existe variación estacional de la composición química de las láminas de *E. arborea* determinando la composición química proximal (humedad, ceniza, lípidos, proteínas y carbohidratos por métodos convencionales) en las estaciones de verano, otoño e invierno.
- ❖ Identificar con qué solvente y en qué estación se obtiene un mejor rendimiento realizando extractos con solventes de diferente polaridad para cada estación.
- ❖ Determinar la influencia de la variación estacional y de la polaridad del solvente en la actividad antimicrobiana de los extractos por medio de la técnica de Kirby-Bauer.
- ❖ Determinar la influencia estacional y de la polaridad del solvente en la actividad antioxidante de los extractos por medio de los ensayos de secuestro del radical DPPH y reducción de hierro (FRAP).
- ❖ Determinar la variación de contenido de polifenoles totales con respecto a la estación y al solvente utilizado de los extractos con actividad antioxidante, por medio de la técnica Folin-Ciocalteu.
- ❖ Identificar los posibles metabolitos responsables del secuestro de DPPH por medio de un pre-fraccionamiento del extracto con mayor actividad antioxidante.

4. Área de Estudio - Bahía Todos Santos

Sobre la costa occidental de la Península de Baja California, México, se encuentra la Bahía de Todos Santos (BTS), ubicada en las coordenadas latitud 31°51' Norte 116°37' Oeste, en el municipio de Ensenada, Baja California (SEMAR, 2024). Esta bahía abarca una superficie aproximada de 180 km², delimitada al norte con Punta San Miguel, y al sur con Punta Banda. El clima que se presenta en la región es seco mediterráneo con escasa precipitación; con respecto a la temperatura, el rango se encuentra entre 12-18°C con las mayores temperaturas en verano (20-30°C) y las más bajas en invierno (5°C; SEMAR, 2024).

Las características fisicoquímicas de la BTS están influenciadas por diferentes fenómenos: el sistema de la Corriente de California (CC), donde la CC tiene un flujo del norte al Ecuador frente a las costas oeste de EUA y noroeste de México (Espinosa-Carreón *et al.*, 2001); a su vez, existe la presencia de surgencias, principalmente en primavera, las cuales ocurren por el esfuerzo del viento en la superficie del agua hacia mar adentro, lo que causa que aguas subsuperficiales, frías y ricas en nutrientes, afloren a la superficie (González-Yajimovich *et al.*, 2015).

Estudios de variables fisicoquímicas en la BTS reportan una columna de agua mezclada en enero y más estructurada en los demás meses, donde septiembre y octubre fueron los meses con una termoclina más definida en comparación a los demás meses (Espinosa-Carreón *et al.*, 2001). Con respecto a valores a 25 m de profundidad, la temperatura del agua se ha reportado con intervalos de 11 a 17°C, con las temperaturas más bajas reportadas en marzo y junio y las más altas en enero y septiembre. Los valores de salinidad reportados para distintos meses es de 33.65 en junio con 33.42 en enero y 33.35 en septiembre-octubre, y se relaciona con el agua transportada del subártico por la CC; mientras que en los meses de marzo y junio los valores de alta salinidad y baja temperatura se relacionan con surgencias (Espinosa-Carreón *et al.*, 2001). Sobre nutrientes (se reportan nitritos, nitratos y fosfatos), los mayores valores se han registrado en marzo y junio mientras que los más bajos se han registrado en enero y septiembre, en relación con los eventos de surgencia para los valores altos y los más bajos con la presencia de aguas con baja salinidad aportadas por la CC (Espinosa-Carreón *et al.*, 2001).

En aspectos biológicos, existe competencia por espacio y luz con *M. pyrifera* y otras algas invasoras como *Sargassum horneri*, *Undaria pinnatifida* y *Sargassum muticum* (Beas-Luna *et al.*, 2019). Con respecto al pastoreo, existe una alta diversidad de organismos herbívoros entre los cuales se encuentran caracoles de mar (*Tegula sp.* o *Lithopoma sp.*) y los erizos de mar. Estos últimos se alimentan principalmente de las láminas de macroalgas que se hayan desprendido, aunque en ausencia de estas, son capaces de remover el talo y consumirla por completo, lo que puede afectar en gran medida en poblaciones de macroalgas (Beas-Luna *et al.*, 2019).

Se reporta la presencia y distribución de *E. arborea* en la BTS. Las zonas identificadas con dicha presencia son Arbolitos, Campo Kennedy, Punta Banda e Islas de Todos Santos (Aguilar-Rosas *et al.*, 2010). La localidad Campo Kennedy reportó la presencia del alga en la mayoría de los meses del año (Fig. 6).



Figura 6. Localización del punto de recolecta en Bahía Todos Santos, México (Recuperada de Google Earth, 2024).

5. Metodología

5.1. Recolecta de ejemplares y determinación taxonómica

Se realizaron tres recolectas de láminas de *E. arborea* en la localidad Campo Kennedy mediante la técnica de buceo libre, durante las estaciones de verano (agosto

2023), otoño (septiembre 2023) e invierno (enero 2024). Los ejemplares se encontraban a profundidades de 2 m- 15 m de profundidad (Fig.

La profundidad de las recolectas de lámina de *Eisenia arborea* en Campo Kennedy fue menor a los 15 metros de profundidad (Fig. 7) y las láminas se desprendieron mediante cortes con navaja.



Figura 7. Organismos de *Eisenia arborea* en Campo Kennedy (autoría propia).

El material biológico fue transportado al Laboratorio de Nanobiotecnología en la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la UABC, donde se lavó con agua dulce para remover epífitos y exceso de sales. Después, se les removió el exceso de agua y se cortaron en pequeños trozos para facilitar su manejo y se guardaron en bolsas ziploc.

En campo se anotaron las principales características del entorno de la localidad Campo Kennedy. Por medio de fotografías en campo y del material biológico, se realizó su determinación taxonómica siguiendo la Guía de Macroalgas de California de Abbott y Hollenberg (1976) y el cotejo de la especie por el Dr. Jorge López Calderón.

5.2. Preparación y secado (liofilizado)

En laboratorio se obtuvo el peso total en húmedo del alga recolectada y después se congeló a -20 °C. Una vez congelado se secó con un liofilizador (LABCONCO FreeZone 2.5) a temperatura de -52 °C y presión reducida durante un periodo de 2-3 días.

Una vez seco, el material se pulverizó con un procesador de alimentos y se pesó nuevamente para calcular el porcentaje de agua que contenía el alga con la siguiente fórmula:

$$\%Agua = 100 - \frac{PesoSeco(g)*100}{PesoHúmedo(g)} \quad (1)$$

5.3. Determinación de composición química proximal

Para la determinación química proximal se utilizó 1 g de biomasa seca y molida de cada muestreo. De acuerdo con los protocolos de la AOAC (1995) se determinaron los porcentajes de humedad, cenizas y proteínas; para lípidos se utilizó el protocolo de Folch *et al.* 1957. Los análisis se hicieron por triplicado. Brevemente, la humedad fue determinada por diferencia de peso a 105 °C por 6 h; las cenizas fueron determinadas por diferencia de peso después de incineración a 550 °C por 5 h; los lípidos fueron extraídos por el Método Folch modificado, que consiste en 3 fases principales, la extracción con mezcla de solventes diclorometano:metanol 2:1, luego la purificación/separación con cloruro de potasio, y finalmente el concentrado del extracto para determinar el peso la concentración de lípidos; y las proteínas fueron determinadas por el método Kjeldahl que consta de tres etapas, digestión con ácido bórico, destilación y titulación con ácido clorhídrico que determinará la cantidad de proteína presente en la muestra y por el método modificado de Lowry que consiste en la reacción del cobre reducido con el tartrato de potasio y los grupos amino de las proteínas presentes en la muestra. Se realizaron dos métodos debido a las diferencias que tienen; el método Kjeldahl determina proteínas en base al nitrógeno orgánico, y el método Lowry las determina con base en oxidación de aminoácidos de proteínas (Romero, 1997).

5.4. Extracción por percolación

Para la generación de extractos químicos de *E. arborea*, se realizó una extracción por percolación secuencial con un gradiente ascendente de polaridad mediante el uso de diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). En una columna con filtro en la parte inferior y sulfato de sodio anhidro para retener agua, se colocaron 200 g de alga pulverizada y se fueron añadiendo 1100 ml

de cada solvente siguiendo el orden de polaridad ascendente ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{AcOEt} \rightarrow \text{MeOH}$) (Fig. 8).

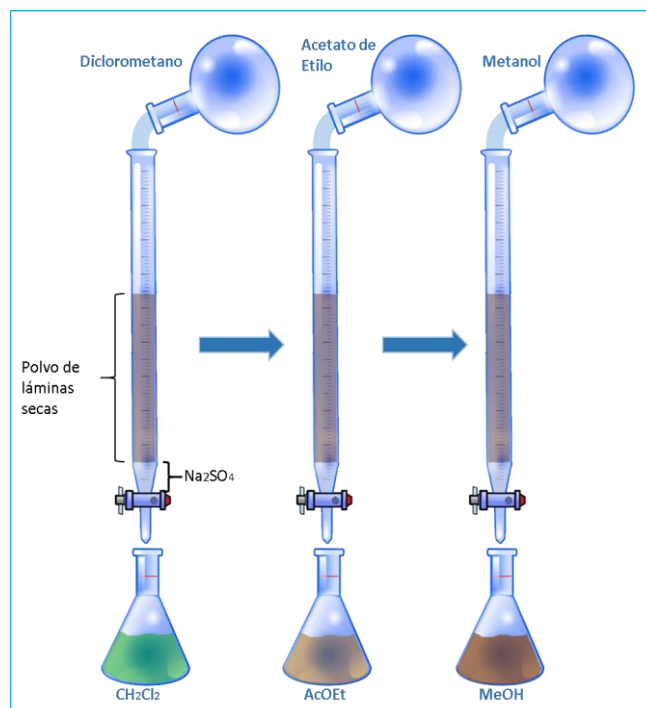


Figura 8. Diagrama de flujo de elaboración de extractos de alga seca.

Para separar el solvente del extracto y concentrar los extractos crudos, se utilizó un rotaevaporador (Heidolph Collegiate WBeco). Además, en el caso de los extractos de metanol, se pusieron a evaporar en estufa a 40°C para terminar el proceso de concentrado. Posteriormente se pesó cada extracto para determinar el rendimiento con base al peso seco con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Peso Extracto}(g) * 100}{200g} \quad (2)$$

5.5. Cromatografía en capa fina (CCF)

Para determinar el tipo de polaridad de los compuestos presentes en cada extracto, así como el sistema más eficiente para la separación de dichos, se realizaron CCF (Fig. 9) de:

-Sílica Gel Mesh 60 (Merck KGaA) para los extractos obtenidos con CH_2Cl_2 y AcOEt. Se utilizó hexano, acetona, diclorometano y ácido fórmico como eluyentes.

-Sílica Gel Fase Reversa Mesh 60 (Merck KGaA) para los extractos de MeOH. Se utilizó metanol, agua y diclorometano como eluyentes.

Posteriormente, las placas de CCF se observaron bajo luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) para identificar posibles señales. Después se utilizó el revelador sulfato cérico (IV) aplicándolo por toda la placa y posteriormente se colocó la placa en una plancha de calentamiento hasta que el color amarillo característico desapareció.



Figura 9. Diagrama de flujo de cromatografía (ejemplo con fase normal).

5.6. Pruebas Biológicas

5.6.1. Prueba Antibacteriana (Antibiogramas)

Para evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos obtenidos de *E. arborea* se realizaron antibiogramas con el método de difusión en placa con sensidisos, modificado de la técnica de Kirby-Bauer (Bernal & Guzman, 1984). La cepa bacteriana que se utilizó fue *Vibrio harveyi* a una concentración de 0.5 Macfarland (1×10^8 UFC/ml; UFC = Unidades Formadoras de Colonias) en medio de cultivo Mueller-Hinton con 2% de NaCl.

Para la prueba antimicrobiana de cada extracto se utilizó una concentración de 0.1 mg/μl en el respectivo solvente. Se coloca el sensidisco en una placa de cultivo con *V. harveyi* de 15 hr de incubación previa, a cada sensidisco se le aplicaron 10 μl del extracto (equivalente a una dosis de 1 mg; Othman *et al.*, 2011) (Fig. 10). Como blanco se usó el solvente con el que se preparó cada extracto. El control positivo utilizado fue el antibiótico Florfenicol el cual se evaluó en una placa con un solo sensidisco debido a su fuerte actividad bactericida. Las placas se incubaron en

oscuridad a 27.7 °C. Se realizó una lectura a las 24 horas para observar si se formó un halo de inhibición y en caso de estar presente medirlo. El análisis se realizó por triplicado.

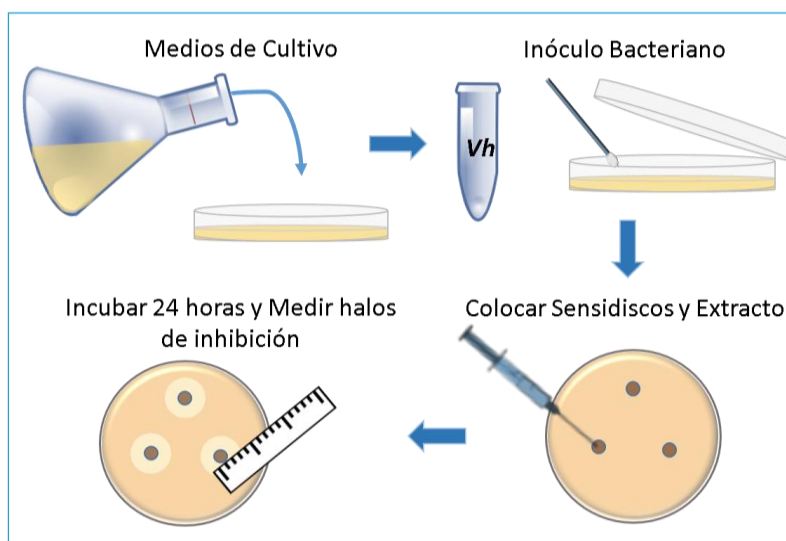


Figura 10. Diagrama de flujo de prueba de actividad antibacteriana por método de difusión en placa con sensidiscos.

La magnitud de los halos de inhibición obtenidos se registraron en mm, la respuesta bacteriana se categorizó con respecto al tamaño del halo de acuerdo a los intervalos que se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV: Clasificación de respuesta bacteriana por antibiogramas.

Respuesta Bacteriana		
Resistente	Intermedio	Susceptible
< 10 mm	11-15 mm	> 15 mm

5.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante

Para realizar las pruebas de actividad antioxidante se utilizaron dos métodos, el ensayo de secuestro del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) descrito por Molyneux (2004) y Morreuw *et al.* (2021); y el ensayo poder antioxidante de reducción de hierro (FRAP) descrito por Urrea-Victoria *et al.* (2016).

Ensayo por secuestro de radical libre DPPH: Se prepararon los extractos a una concentración de 10 mg/ml (utilizando DMSO para los extractos de CH₂Cl₂ y AcOEt, y metanol para los de MeOH) como solución stock. Posteriormente las

muestras se diluyeron a una concentración de prueba de 1 mg/ml para ser evaluadas en el ensayo. La solución de DPPH (Sigma-Aldrich) se preparó a una concentración de 25 mg/l con etanol previamente refrigerado a -20°C. El ensayo se realizó por cuadruplicado.

De la solución stock se realizó una dilución de 1 mg/ml y de esta dilución se aplicaron 20 µl y 180 µl de la solución de DPPH en un pocillo de una microplaca de 96 pozos por cuadruplicado. Como blanco se utilizó el solvente respectivo para cada extracto (dimetilsulfóxido o DMSO y MeOH) y como control positivo, Trolox (Sigma) a la concentración de 0.5 µg/ml. Se incubó por media hora en oscuridad y pasado el tiempo, se realizó una lectura en espectrofotómetro a 515 nm (Fig. 11).

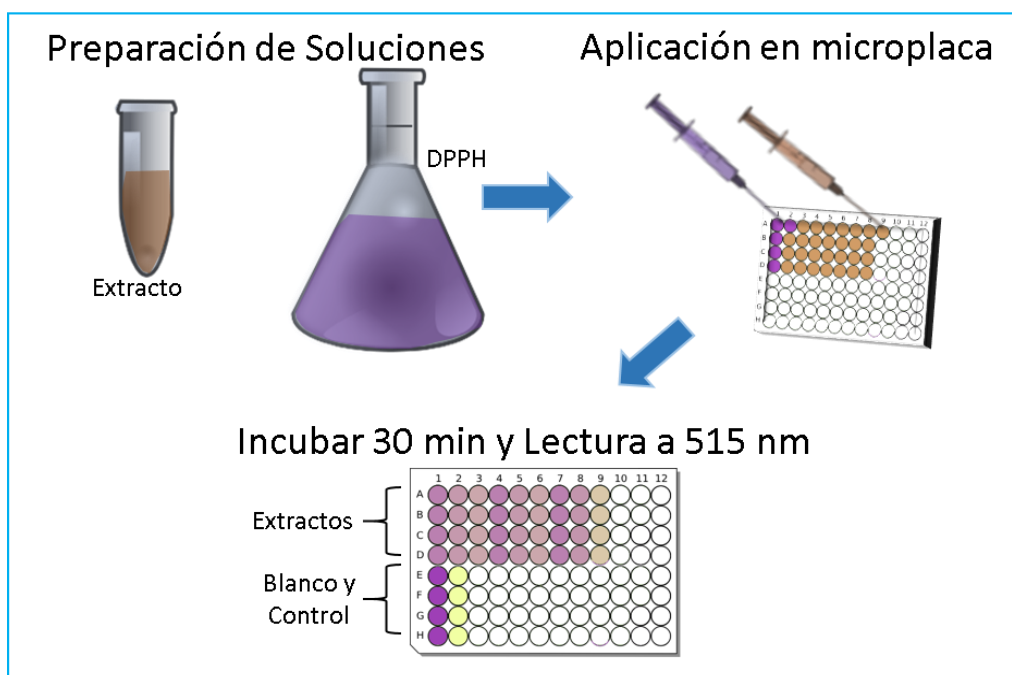


Figura 11. Diagrama de flujo de ensayo de secuestro del radical DPPH (cribado).

El porcentaje de reducción de DPPH se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\%Reducción = \frac{AB - AM}{AM} * 100$$

Donde AB= Absorbancia del blanco; AM= Absorbancia de la muestra.

Para las muestras que presentaron una inhibición del DPPH mayor al 50%, se determinó la concentración efectiva media (EC₅₀), que es la concentración mínima requerida para alcanzar el 50% de inhibición del DPPH. Para esto, de las muestras

seleccionadas se realizaron una serie de diluciones de al menos seis puntos [0.01-0.5 mg/ml] y cada dilución se evaluó por cuadruplicado tal como se describió arriba. Posteriormente con los datos se realizaron curvas de dosis-efecto, con las que se calculó la regresión lineal (R^2) y la ecuación de la recta ($y=m+bx$). En la figura 12 se presenta un diagrama que ilustra este procedimiento.

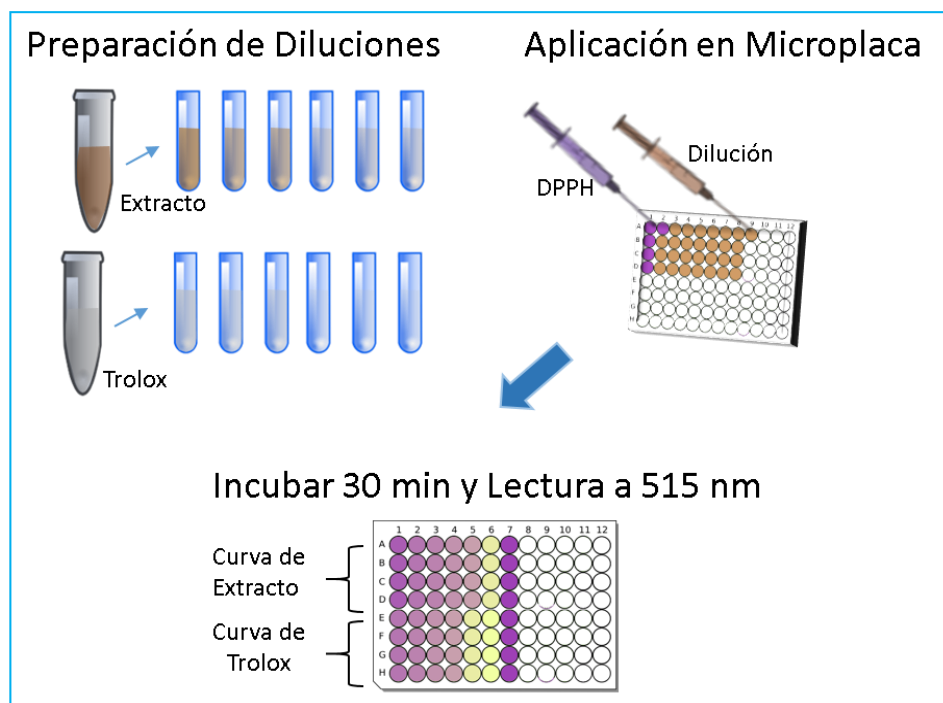


Figura 12. Diagrama de flujo de ensayo de secuestro del radical DPPH (EC₅₀).

Ensayo por FRAP: Se prepararon los extractos a una concentración inicial de 3 mg/ml (utilizando DMSO para los extractos de CH₂Cl₂ y AcOEt, y metanol para los de MeOH) como solución stock. De la solución stock se realizaron tres diluciones de 1 mg/ml, 0.5 mg/ml y 0.5 mg/ml, las cuales se evaluaron en el ensayo por cuadruplicado.

El reactivo FRAP se preparó con 50 ml de buffer Acetato de Sodio 0.03 M pH 3.6 (ajustado con ácido acético glacial), 5ml de 2,4,6-tripiridil-s-triazina 10 mM(TPTZ) preparado con HCl 40 mM y 5 ml de FeCl₃ 20 mM. La solución se mantuvo en oscuridad y se utilizó únicamente el día del ensayo.

El ensayo consistió en agregar 20 µl de muestra, 15 µl de agua destilada y 265 µl de solución del reactivo FRAP en un pocillo de una microplaca de 96 pozos. Se incubó por 30 min. a 37°C en oscuridad y posteriormente se realizó una lectura en espectrofotómetro a 595 nm (Fig. 13). Como blanco se utilizó el solvente que se utilizó

para suspender cada extracto (DMSO y MeOH). Como control positivo se utilizó una curva de calibración de Trolox en una serie de seis diluciones [0.5-6 µg/ml]. Los resultados se reportaron en valor equivalente de Trolox (uMTE) con base en la ecuación de la recta de la curva.

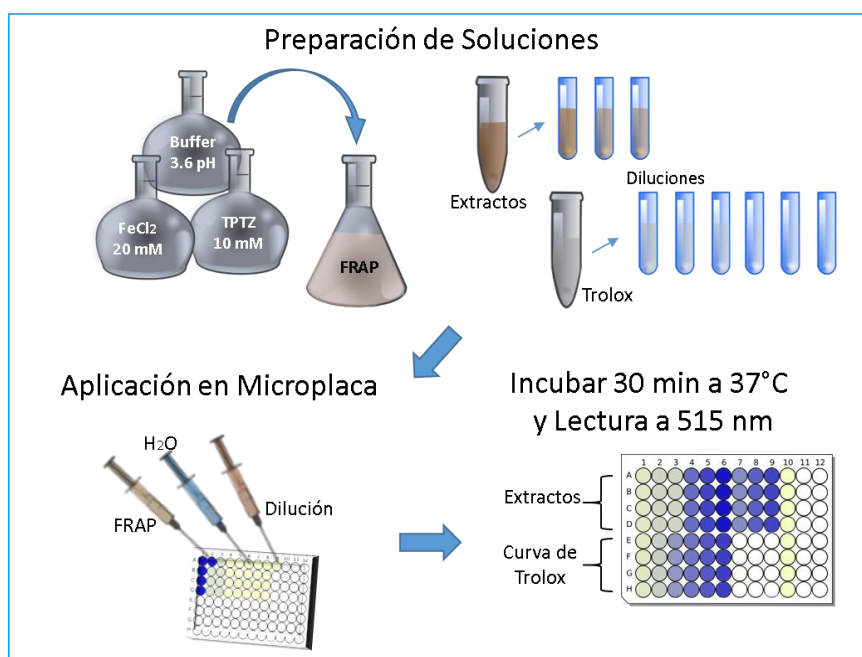


Figura 13. Diagrama de flujo de ensayo de FRAP.

6. Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales (TPC) se determinó con el método modificado de Folin y Ciocalteu (Vasco *et al.*, 2008) solo a los extractos que presentaron actividad antioxidante. El ensayo se realizó por nueve réplicas. Se prepararon los extractos a una concentración inicial de 1 mg/ml en metanol.

El ensayo consistió en agregar 1.5 ml de agua destilada, 0.05 ml de muestra y 0.25 ml de reactivo Folin (Sigma) a un tubo de ensayo. Se dejó reposar por 3 minutos y se le adicionó 1 ml de carbonato de sodio al 7% para posteriormente dejar agitando moderadamente y en reposo bajo oscuridad por 2 h. Una vez pasado el tiempo, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro. Como control positivo se utilizó una curva de ácido gálico en una serie de seis diluciones [50-500 µg/ml]. Los resultados se reportaron en equivalentes de ácido gálico (GAE) con base en la ecuación de la recta de la curva.

6.1. Pre-fraccionamiento y caracterización química

Las pruebas de actividad antimicrobiana y antioxidante permitieron la selección del extracto que presentó mayor actividad biológica en ambas pruebas, antioxidante y antibacteriano (halo de inhibición >15 mm, EC_{50} de DPPH <100 $\mu\text{g/ml}$ y FRAP >330 $\mu\text{MTE/g}$), que corresponde al extracto de acetato de etilo para la temporada de invierno (AcOEt-invierno), para su posterior pre-fraccionamiento. Para el pre-fraccionamiento se identificó otro sistema para el pre-fraccionamiento con el fin de utilizar menos ácido fórmico, el cual fue Mx:Diclorometano 8:2 donde Mx=Acetato de etilo:Metanol:Agua 200:16:7 (Fig. 14).



Figura 14. CCF de extracto AcOEt-Invierno (revelado con sulfato cérico).

El pre-fraccionamiento se realizó por medio de cromatografía en columna con 1 g de extracto en 60 g de sílica mesh 60. Las mezclas de solventes utilizadas se muestran en la Tabla V. Cada fracción se concentró y pesó para obtener su rendimiento con la fórmula (2).

Tabla V. Mezclas de solventes utilizadas para el pre-fraccionamiento.

Orden	Mezcla de Solventes	Cantidad (ml)	No. de fracciones
1	Mezcla A*:CH ₂ Cl ₂ 8:2	500	1-7
2	CH ₂ Cl ₂ :Acetona:Ácido Fórmico 7:2:1	250	8-12
3	CH ₂ Cl ₂ :Acetona:Ácido Fórmico 5:4:1	250	13-17
4	CH ₂ Cl ₂ :Acetona:Ácido Fórmico 7:2:1	250	18 y 19
5	Acetona	200	20-22
6	Metanol	200	23

*Mezcla A= AcOEt:MeOH:H₂O 200:16:7.

Además, para comenzar con el proceso de identificación de los compuestos presentes en el extracto se realizó una prueba de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de un campo magnético de 400 MHz (de protón ¹H) a la fracción 2s en un Bruker Avance. Se adicionaron 10 mg de la muestra a un tubo de 5mm para RMN con acetona deuterada (d₆). El proceso para la identificación de compuestos se hizo comparando el espectro obtenido con lo reportado en Okada *et al.* 2004.

Se realizó una Cromatografía de Gases (Agilent Technologies 5890B) acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent 5977A) (GC-MS). La identificación se realizó comparando los espectros obtenidos con la base de datos NIST 14. Solo se reportaron los que tuvieron una similitud mayor a 90%.

6.2. Prueba antioxidante con fracciones

De manera similar a lo descrito anteriormente para las pruebas de actividad antioxidante, con las fracciones obtenidas del extracto AcOEt-invierno, se realizó un cribado con la prueba antioxidante DPPH y determinar la actividad de las fracciones en 3 diluciones: 0.5, 0.1 y 0.05 mg/ml (Fig. 12).

6.3. Temperatura Superficial y Radiación

Los valores de temperatura superficial del mar nocturna satelital (NSST) se obtuvieron del Sistema de Información y Análisis Marino Costero (SIMAR; Cerdeira-Estrada *et al.*, 2024), con resolución diaria de 1 km.

Los valores de radiación (índice UV) se obtuvieron del proyecto POWER de la NASA Langley Research Center, financiado a través del programa NASA Earth Science/Applied Science (NASA LaRC, 2024), con resolución de 1° de latitud por 1° de longitud.

6.4. Análisis Estadístico

Para evaluar estadísticamente los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana y antioxidante, primero se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y homocedasticidad de Levene (ANEXO I). Debido a que los datos no presentaron una distribución normal, se realizaron las pruebas U de Mann-Whitney (dos grupos) y la prueba de Kruskal-Wallis (más de dos grupos) para comparar los resultados de los extractos y los constituyentes químicos entre solventes y estación de recolecta (ANEXO II). Posteriormente se realizó la prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni y Holm para identificar las muestras significativamente distintas (más de dos grupos) (ANEXO II). A su vez, se hizo una prueba de correlación de los constituyentes químicos y bioactividades de extractos, con la temperatura y radiación por Spearman (Flores-Ruiz *et al.*, 2017), así como una prueba de correlación entre el TPC y las pruebas de actividad antioxidante (ANEXO III). Los análisis se hicieron con 95% de confianza. Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el Software R (R Core Team, 2020) en la plataforma de R Studio V. 2024.04.2 (RStudio Team, 2020).

7. Resultados

7.1. Composición química de *E. arborea*

El porcentaje de agua de las muestras mostró que en verano se presentó un 80.63% de agua, en otoño un 81.68% y en invierno un 83.95%. De acuerdo con los resultados del análisis proximal (Tabla VI), en verano se presentaron los mayores porcentajes de carbohidratos, lípidos y proteínas por el método Kjeldahl y los menores de humedad, cenizas y proteínas por el método Lowry; en otoño los porcentajes de carbohidratos, lípidos y proteínas por el método Kjeldahl disminuyeron y los de humedad, cenizas y proteínas por el método Lowry aumentaron; y en invierno se observó que se mantuvo esta tendencia de variación de la composición química. Respecto a la composición porcentual de los componentes químicos evaluados, los carbohidratos representaron el mayor porcentaje de la composición de las muestras (mayor a 39%) mientras que los lípidos representaron el menor porcentaje (1.74-2.415%).

Con respecto a las pruebas estadísticas, se observó una diferencia significativa en relación a la estación solo para los valores de humedad, cenizas y carbohidratos. En los tres casos, la diferencia significativa solo se observó entre las estaciones de Verano-Invierno, con mayor porcentaje de humedad y cenizas en invierno en comparación al verano, y mayor porcentaje en verano en comparación al invierno en el caso de los carbohidratos (Tabla VI).

Tabla VI. Composición química proximal en las láminas de *E. arborea* de verano 2023-
invierno 2024.

	Proteínas (Kjeldahl)	Proteínas (Lowry)	Lípidos	Humedad	Cenizas	Carbohidratos
Verano	10.515 ±0.305	4.39 ±0.57	2.415 ±0.065	7.875 ±0.025 _b	16.80 ±0.20 _b	58.005 ±0.765 _b
Otoño	9.77 ±0.0.46	4.92 ±0.36	2.275 ±0.135	10.48 ±0.08 _{ab}	24.455 ±0.125 _{ab}	48.10 ±0.91 _{ab}
Invierno	8.075 ±0.045	8.805 ±0.385	1.74 ±0.04	10.925 ±0.035 _a	30.71 ±0.100 _a	39.745 ±0.525 _a

Se reporta la mediana de los porcentajes ± el IQR. Letras diferentes dentro de cada grupo de compuestos indican diferencia de medianas ($p < 0.05$).

Con respecto al contenido de proteínas, se obtuvo un mayor contenido de proteínas por el método Kjeldahl que por el método Lowry en todas las estaciones (Tabla IV), siendo significativa la diferencia entre éstos métodos (Fig. 15). No se observó diferencias significativas entre estaciones del año para para ningún método de cuantificación.

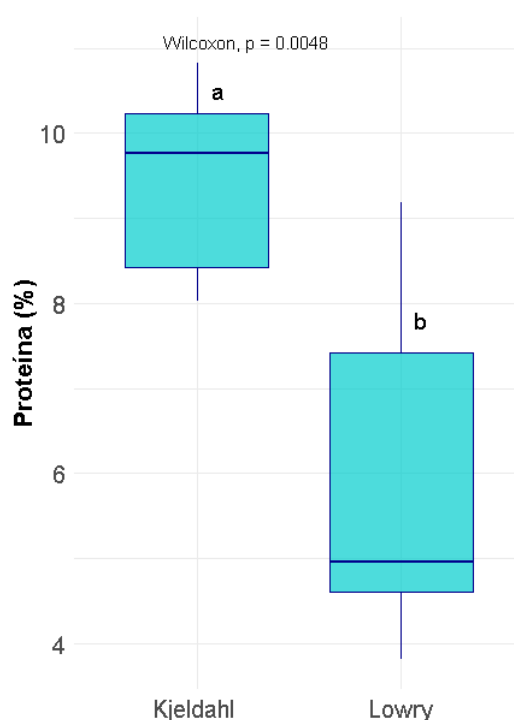


Figura 15. Contenido de proteínas por método.

7.2. Rendimiento de Extractos Crudos

Se observó que los extractos con mayor rendimiento fueron los obtenidos con MeOH (de 8.05-9.62%) mientras que los de menor rendimiento fueron los de AcOEt (0.45-0.71%). Los rendimientos de extractos de CH₂Cl₂ y AcOEt presentaron un comportamiento similar con respecto a las estaciones, donde los mayores rendimientos se obtuvieron en verano y los menores en otoño, mientras que en el caso de los de MeOH, los rendimientos fueron aumentando de verano a invierno (Tabla VII).

Tabla VII. Rendimiento de los extractos crudos (%) de *E. arborea* para las estaciones de verano 2023- invierno 2024.

Estación/ Solvente	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	MeOH
Verano	0.748	0.706	8.053
Otoño	0.630	0.454	9.384
Invierno	0.746	0.638	9.617

7.3. Cromatografía en Capa Fina

El sistema de separación de compuestos que se identificó para extractos de CH₂Cl₂ fue el de Hexano:Acetona 7:3 en fase normal (Fig. 16). En este sistema se lograron separar principalmente los compuestos menos polares.

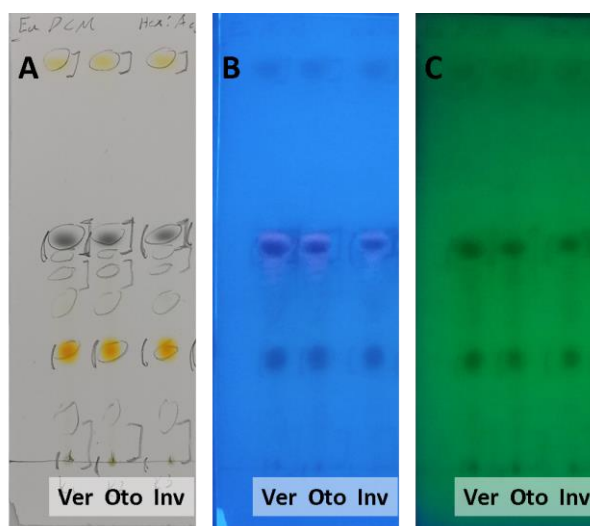


Figura 16. CCF de extractos de CH_2Cl_2 (A) normal (B) bajo luz UV 365 nm (C) bajo luz UV 254 nm (Ver= verano; Oto= otoño; Inv= invierno). Foto sin revelador de sulfato cérico.

Para extractos de AcOEt el mejor sistema que se identificó fue el de Diclorometano:Acetona:Ácido Fórmico 5:4:1 en fase normal, separando compuestos de polaridad intermedia. En este caso, hay compuestos que se revelaron bajo UV 254 nm que no se aprecian con claridad normalmente ni bajo UV 365 nm, a la vez que se observan otros compuestos en el extracto de invierno (Fig. 17).

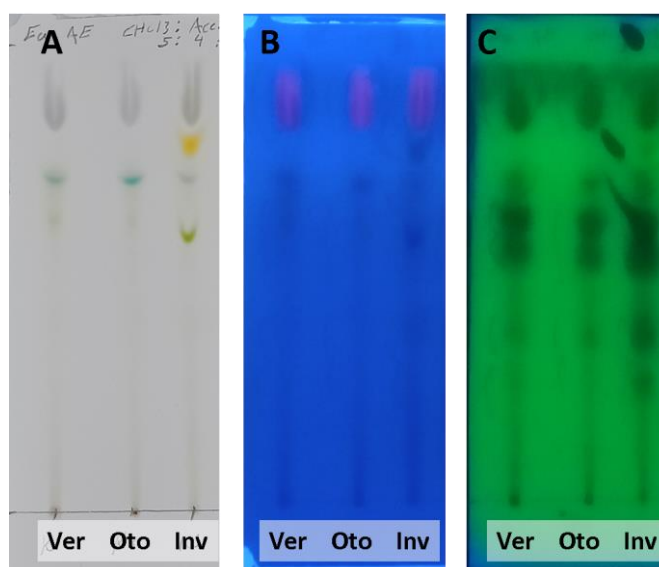


Figura 17. CCF de extractos de AcOEt (A) normal (B) bajo luz UV 365 nm (C) bajo luz UV 254 nm (Ver= verano; Oto= otoño; Inv= invierno). Foto sin revelador de sulfato cérico.

Para extractos de MeOH el mejor sistema para separar los compuestos más polares fue Metanol:Agua:Diclorometano 8.5:0.5:1 en fase reversa. En este caso, bajo luz UV 254 nm en la parte menos polar se observan compuestos con luz rosa intensa que no se observan bajo luz UV 365 nm, principalmente en el extracto de invierno. Bajo luz UV 365 nm se observan compuestos en la parte más polar que no se aprecian bajo luz UV 254 nm, principalmente en los extractos de verano y otoño.

En este caso, en cada luz UV se observó algo diferente: bajo luz UV 254 se observan compuestos y en el caso del extracto de invierno, fue ligeramente diferente a los demás (luz más intensa y parte menos polar más concentrada (Fig. 18).

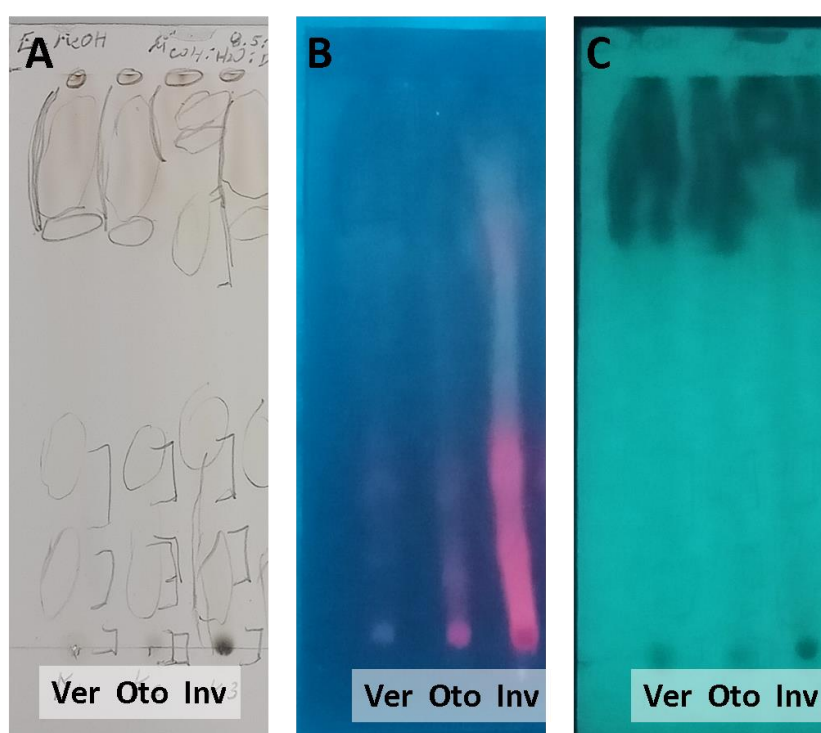


Figura 18. CCF de extractos de MeOH (A) normal (B) bajo luz UV 365 nm (C) bajo luz UV 254 nm (Ver= verano; Oto= otoño; Inv= invierno). Foto sin revelador de sulfato cérico.

7.4. Actividad Antibacteriana

Con respecto a los antibiogramas, se observó que los extractos de AcOEt presentaron mayor halo de inhibición que los extractos de MeOH en todas las estaciones. Los extractos de AcOEt de todas las estaciones presentaron mayores halos de inhibición, al igual que el extracto de invierno de MeOH (Tabla VIII), por lo

que se consideró que *V. harveyi* presentó una respuesta sensible a dichos extractos (>15 mm; Fig. 19).

Tabla VIII. Halos de inhibición (mm) presentados a las 24 horas para cada extracto utilizando 0.1 mg/μl.

Estación/Solvente	AcOEt ^{ab}	MeOH ^{bc}
Verano	15 ±0.5 _b	12 ±0.5 _b
Otoño	16 ±0.0 _{ab}	14 ±0.5 _{ab}
Invierno	17 ±0.5 _a	16 ±0.5 _a
Blanco ^c	7	7
Control Florfenicol ^a	40	

Se reporta la mediana de los porcentajes ± el IQR. Letras diferentes indican diferencia de medianas (superíndice para diferencia entre solventes, subíndice para diferencia entre estaciones para cada solvente; $p < 0.05$).

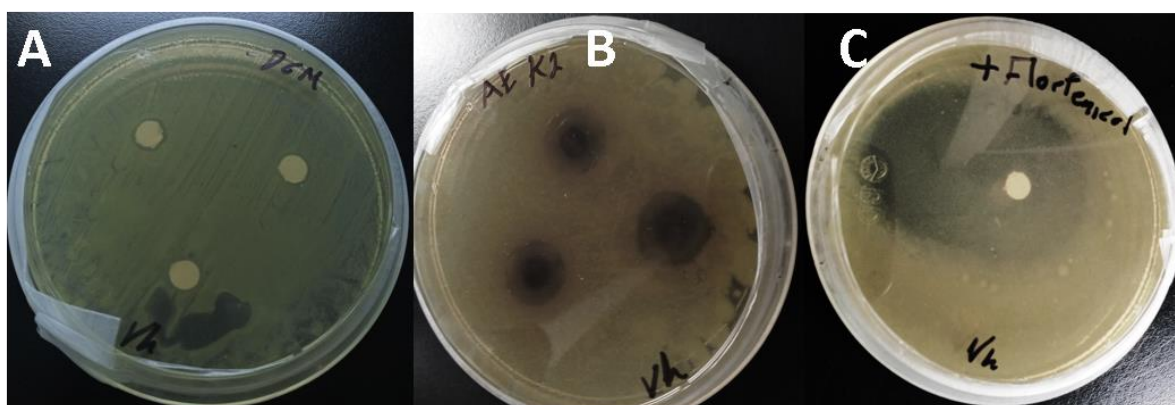


Figura 19. Antibiógramas con bacteria *Vibrio harveyi* (A) Blanco de diclorometano (B) Extracto de AcOEt de otoño (C) Control de Florfenicol.

Con base al análisis de las diferencias entre solventes, se obtuvo que los extractos de AcOEt tuvieron significativamente mayor actividad que el blanco, mientras que los extractos de MeOH tuvieron menor actividad que el florfenicol. Como prueba también se identificó la diferencia significativa entre el florfenicol y los blancos utilizados, donde el florfenicol tuvo mayor actividad que los blancos. Referente a las

diferencias entre estaciones, tanto los extractos de AcOEt, como los de MeOH, tuvieron mayor actividad en la estación de invierno que en la estación de verano, siendo significativa esta diferencia.

7.5. Actividad Antioxidante

Del cribado del secuestro de radical DPPH de los extractos en concentración 1 mg/ml, los extractos de AcOEt y MeOH presentaron porcentajes de reducción mayores al 50% (promedio y error estándar de $72.97 \pm 3.746\%$ para AcOEt y $80.19 \pm 0.77\%$ para MeOH), mientras que los de CH_2Cl_2 no presentaron actividad. Por lo tanto, el EC_{50} solo se calculó para los extractos de AcOEt y MeOH. Conforme los valores obtenidos del EC_{50} , de los extractos de AcOEt la mayor actividad se observó en los de otoño e invierno, mientras que en los extractos de MeOH, el que presentó mayor actividad fue el de invierno (Tabla IX). Solo se presentó diferencia significativa entre los extractos de MeOH (menor actividad) y el control Trolox.

Tabla IX. Resultados del ensayo antioxidante DPPH EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) de extractos de *E. arborea*.

Estación/Solvente	AcOEt ^{ab}	MeOH ^b
-------------------	---------------------	-------------------

Letras diferentes indican diferencia de medianas entre solventes ($p < 0.05$).

Para el caso de FRAP, los extractos de AcOEt presentaron mayor actividad que los de MeOH, en ambos el comportamiento fue similar, con los valores más bajos en verano ($270.39 \mu\text{MTE/g}$ de AcOEt y $105.31 \mu\text{MTE/g}$ de MeOH) y mostrando un incremento hacia el invierno ($341.03 \mu\text{MTE/g}$ y $182.83 \mu\text{MTE/g}$, respectivamente) (Fig. 20).

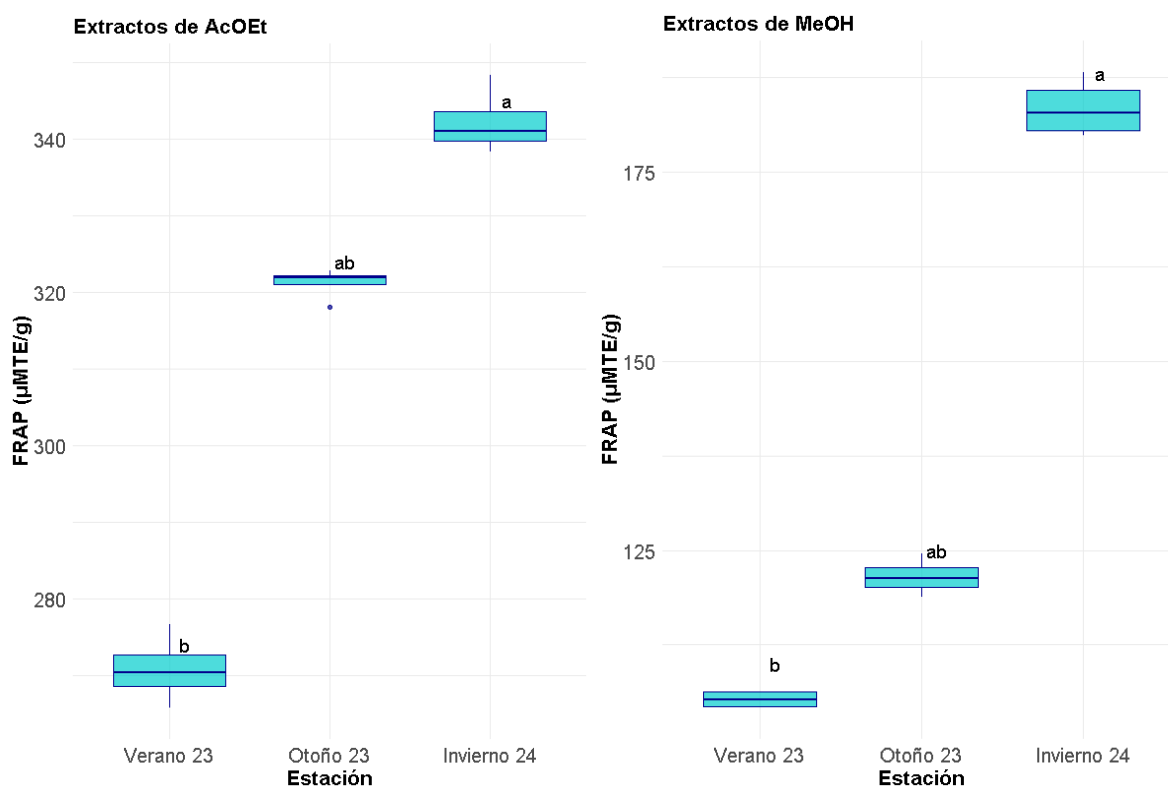


Figura 20. Actividad antioxidante FRAP de extractos de *E. arborea*. Letras diferentes indican diferencia de medianas entre estaciones ($p < 0.05$).

Referente a las diferencias entre estaciones, en FRAP se reportó diferencia significativa para extractos de AcOEt y MeOH, con mayor actividad en invierno que en verano (Fig. 20). Los extractos de AcOEt presentaron significativamente mayor actividad que los de MeOH (Fig. 21).

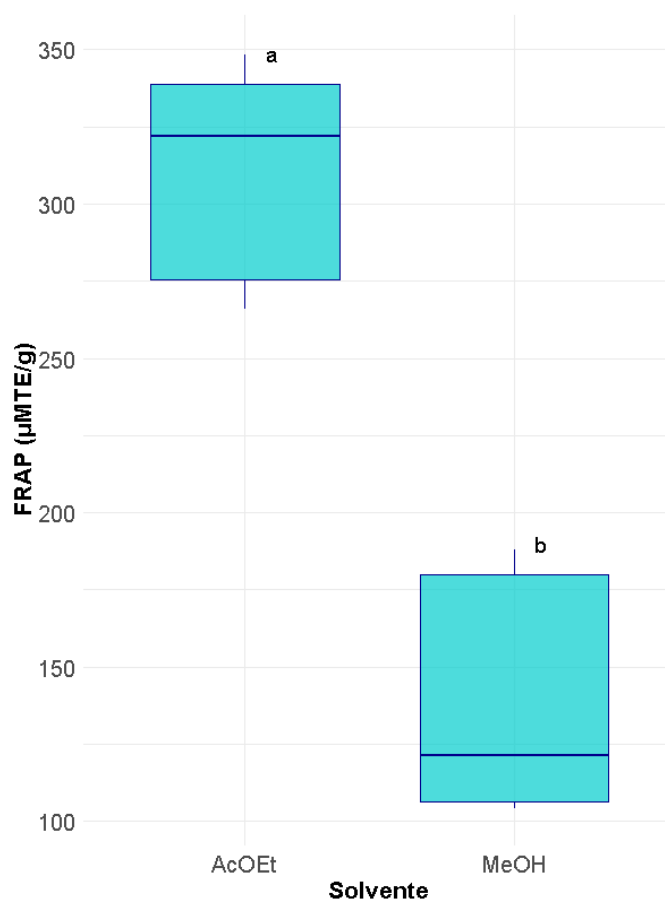


Figura 21. Actividad FRAP de extractos de acuerdo al solvente. Letras diferentes indican diferencia de medianas estaciones ($p < 0.05$).

7.6. Contenido de Fenoles Totales

Para los valores de TPC de los extractos obtenidos, se puede observar que los de AcOEt presentaron mayor contenido de fenoles en comparación a los de MeOH. Con respecto al comportamiento, tanto los extractos de AcOEt como los de MeOH presentaron valores mínimos de TPC en otoño y mayores en verano e invierno (Tabla X).

Tabla X. TPC de extractos de *E. arborea*.

FRAP	AcOEt ^a	MeOH ^b
Verano	29.9780 ±1.1515	15.2280 ±0.3295 _{ab}
Otoño	26.4565 ±1.1325	7.9477 ±0.1970 _b
Invierno	29.7735 ±0.4053	16.8568 ±0.1667 _a

Se reporta la mediana de los porcentajes ± el IQR. Letras diferentes indican diferencia de medianas (superíndice para diferencia entre solventes, subíndice para diferencia entre estaciones para cada solvente; $p < 0.05$).

Con respecto a las diferencias entre solventes, se presentó significativamente mayor TPC en los extractos de AcOEt que en los de MeOH (Tabla X). Referente a las estaciones, solo se presentó diferencia significativa en los extractos de MeOH con mayor TPC en invierno que en otoño (Tabla X). Además, no se encontró correlación entre TPC y actividades antioxidantes ($p > 0.05$).

7.7. Pre-fraccionamiento

Del proceso de pre-fraccionamiento se obtuvieron 23 fracciones con distinto rendimiento, donde las fracciones 2 y 3 fueron las de mayor rendimiento (42.25% y 11.94%, respectivamente) y el resto se mantuvieron debajo del 10% (ANEXO IV).

Con base en su valor de mayor rendimiento, la fracción 2 se corrió en una CCF (sistema CH₂Cl₂:AcOEt 8:2). Al observar una separación de compuestos, se filtró la fracción 2 con hexano de donde se obtuvieron las fracciones 2s (sólido que quedó en el filtro, 31.2% de rendimiento con respecto al total fraccionado) y 2h (parte que se fue con el hexano, 11% de rendimiento con respecto al total fraccionado). Posteriormente, se dejaron correr nuevas cromatografías y se observó la separación de compuestos poco polares en la fracción 2h y más polares en la 2s (Fig. 22).

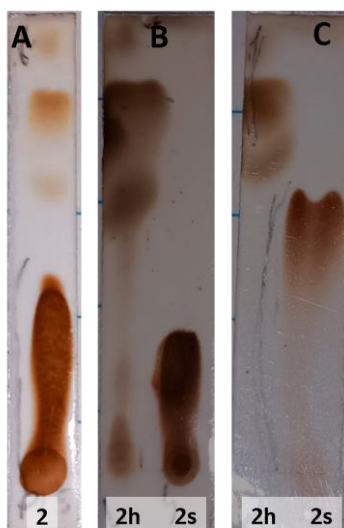


Figura 22. CCF de fracción 2 y filtrados (A) fracción 2 en sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ 8:2 (B) fracciones 2h y 2s en mismo sistema (C) fracciones en sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ 1:1 (todos revelados con sulfato cérico).

En los resultados de RMN de la fracción 2s, se identificó la presencia del compuesto eckol (Fig. 23).

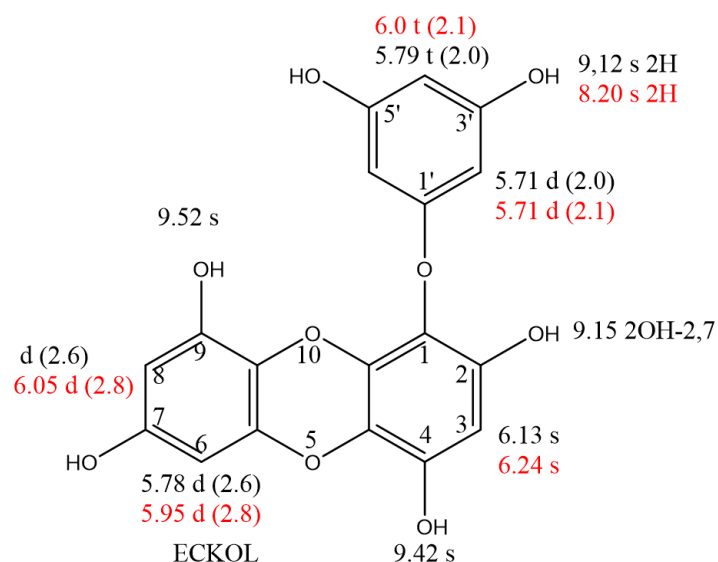


Figura 23. Eckol presente en fracción 2s, interpretación de resultados de RMN. Números en negro son desplazamientos químicos (J) en acetona- d_6 , números en rojo son los reportados en DMSO- d_6 (Okada *et al.* 2004).

En el análisis GC-MS a la fracción 2h se identificaron un total de 23 compuestos (ANEXO V). Los compuestos que presentaron mayor porcentaje fueron los ácidos grasos (29.51%) y los ésteres metílicos de ácidos grasos (10.98%). A su vez, se reportó la presencia del fucosterol con un porcentaje de 4.38%, ésteres de ácido ftálico (PAEs) y ftalato de dibutilo (4.5%) (Fig. 24).

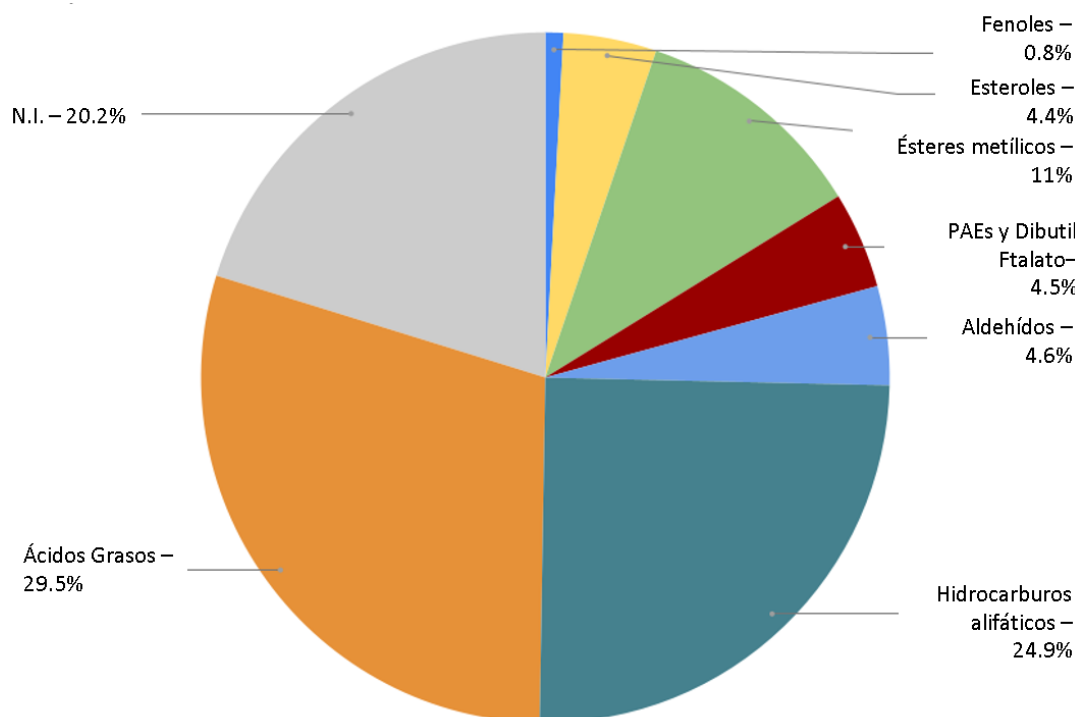


Figura 24. Compuestos presentes en la fracción 2h con base en GC-MS. N.I.= No identificados.

7.7.1. Actividad Antioxidante de Fracciones

Considerando la cantidad y posible similitud de algunas fracciones, se probó la actividad antioxidante solo de las fracciones 2s, 2h, 7, 10, 15, 16, 17, 18 y 21. Se observó que la fracción con mayor actividad fue la 2h (76%) seguida de la 7 (58.85%) y 16 (16.95%) con una concentración de 0.5 mg/ml, mientras que las demás fracciones se mantuvieron debajo del 10% utilizando la misma concentración (Tabla XI).

Tabla XI. Actividad antioxidante de fracciones del extracto AcOEt-Invierno. Promedios y desviación estándar.

DPPH (% de reducción)	0.05 mg/ml	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml
2h	27.82 ±0.54	46.69 ±13.04	76 ±0.32
7	6.52 ±1.56	17.24 ±4.48	58.85 ±1.11
15	0.67 ±1.39	2.66 ±0.31	8.95 ±1.97
16	3.09 ±0.77	5.24 ±0.56	16.95 ±3.24
17	0.12 ±0.68	1.55 ±1.52	8.94 ±0.96
18	1.94 ±0.37	1.32 ±0.59	9.03 ±1.62
Control Trolox			83.62 ±0.25

7.8. Temperatura superficial y radiación

Para la estación de verano 2023, se tomaron en cuenta los datos del 23 de julio al 23 de agosto, donde la mayor temperatura registrada por día fue de 22.21°C, la menor de 19.67°C y se obtuvo un promedio de 20.97°C. El índice UV en esta estación presentó un valor máximo de 3.47 y un mínimo de 0.86, con un promedio de 2.82 (Fig. 26).

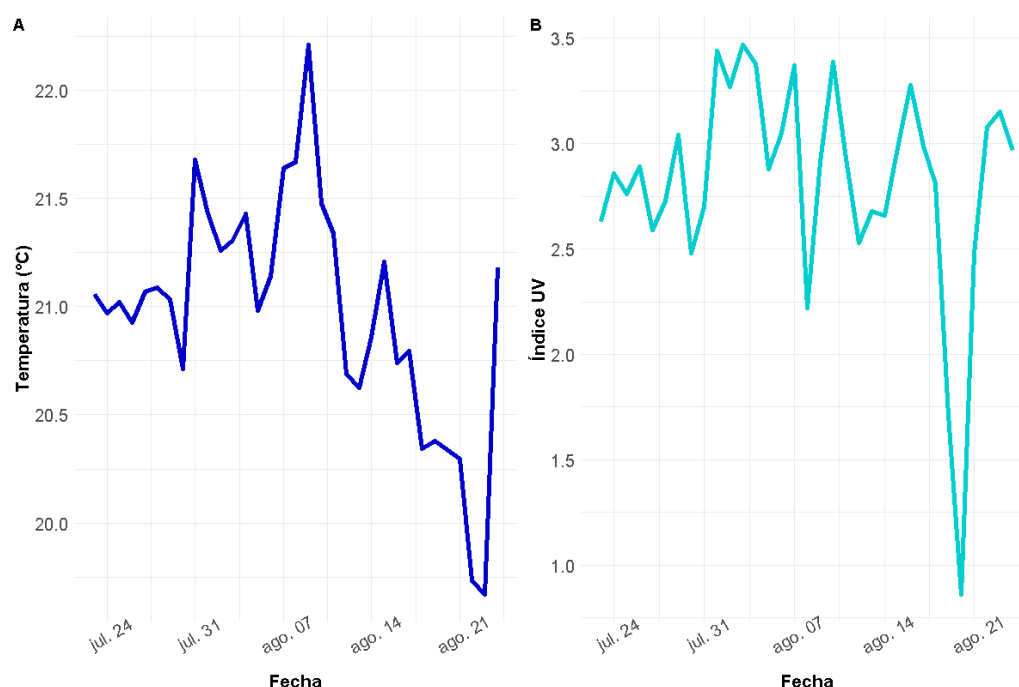


Figura 26. (A) Temperatura e (B) índice UV en los días considerados para verano 2023 de este trabajo.

Para otoño de 2023 se tomaron en cuenta los datos del 29 de agosto al 29 de septiembre, donde la mayor temperatura fue de 22.85°C y la menor de 19.58°C, con un promedio de 20.83°C. El índice UV en esta estación presentó un valor máximo de 2.98 y un mínimo de 1.9 con un promedio de 2.44. En este caso, se observa una tendencia a la disminución del índice UV con respecto al tiempo (Fig. 27).

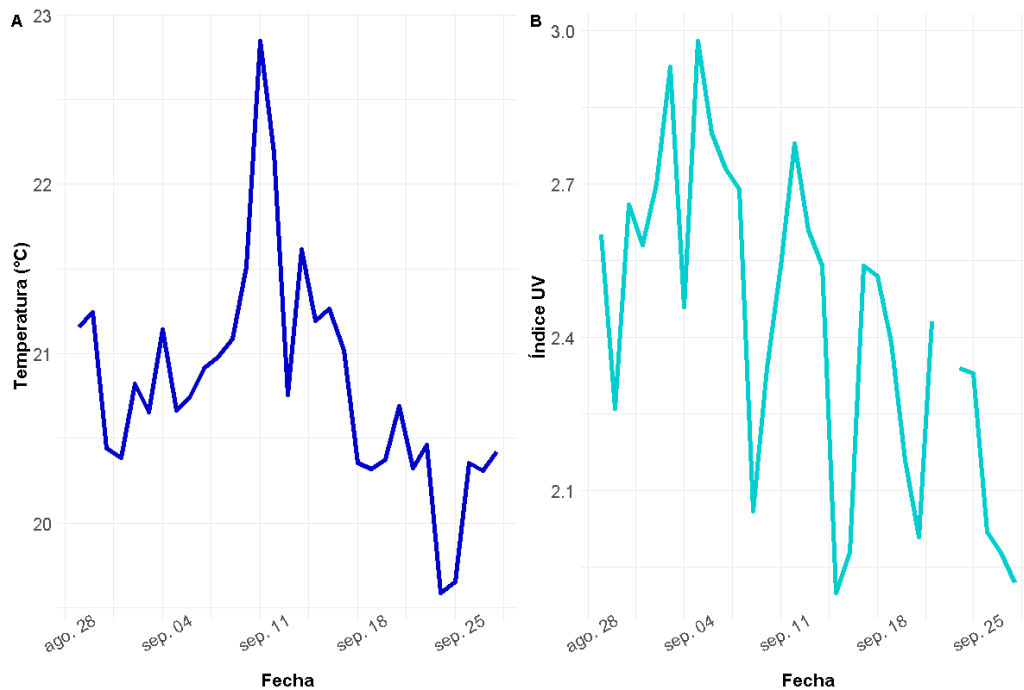


Figura 27. (A) Temperatura e (B) índice UV en los días considerados para otoño 2023 de este trabajo.

Para el invierno de 2024, se tomaron en cuenta los datos del 15 de diciembre del 2023 al 15 de enero del 2024, donde el valor máximo de temperatura fue de 17.84 °C y el mínimo de 14.76 °C, con un promedio de 16.70 °C. El índice UV presentó un valor máximo de 0.74 y un mínimo de 0.41, con un promedio de 0.57. Los valores que se presentaron en esta estación, tanto temperatura como índice UV, fueron menores a los registrados en las otras estaciones del año, el que para la temperatura se aprecia un decremento con respecto al tiempo (Fig. 28).

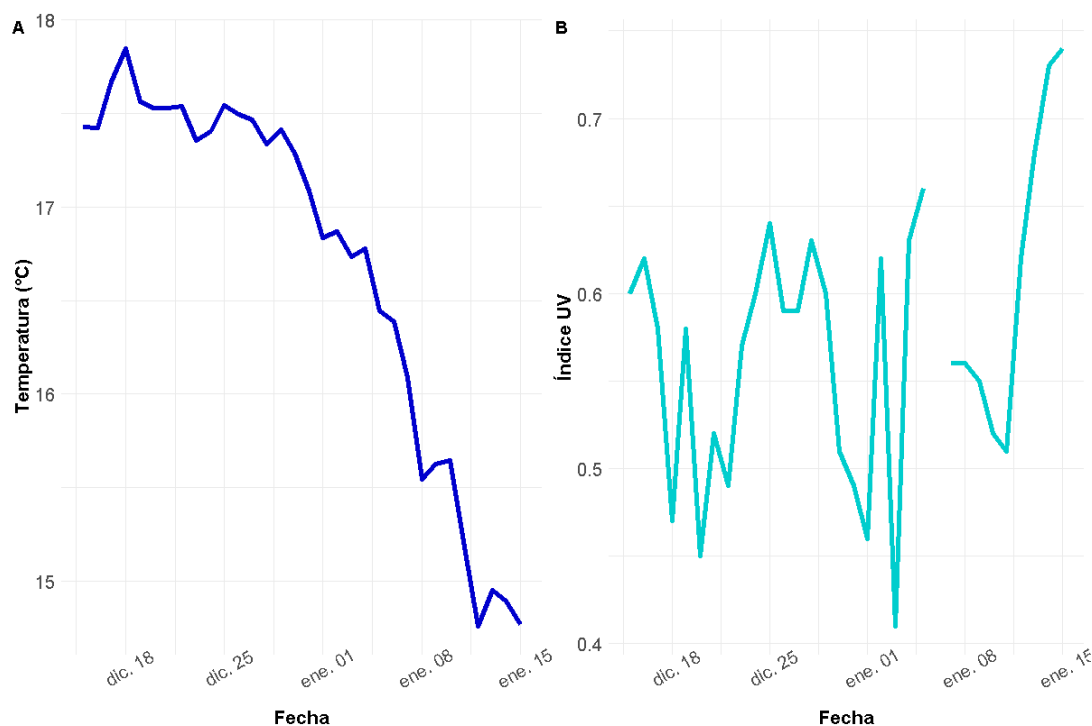


Figura 28. (A) Temperatura e (B) índice UV en los días considerados para invierno 2024 de este trabajo.

Se identificaron diferencias significativas entre estaciones para cada variable. Con respecto a la temperatura, el valor en otoño fue significativamente mayor que el de invierno y significativamente mayor en verano que en invierno ($p < 0.001$). Con respecto al índice UV, hubo diferencias significativas entre todas las estaciones, siendo mayor en verano que en otoño ($p < 0.05$), mayor en otoño que en invierno y mayor en verano que en invierno ($p < 0.001$).

Además se obtuvieron los valores de correlación entre cada componente proximal determinado y las variables ambientales de temperatura e índice UV (Tabla XII). Ambas variables presentaron una correlación significativa negativa con la humedad, cenizas y proteínas (método Lowry). Las correlaciones sugieren que a mayor temperatura/radiación, presentan menor porcentaje. En contraste, los carbohidratos, lípidos y proteína (método Kjeldahl) presentaron correlación significativa positiva, sugiriendo que a mayor temperatura/radiación, mayor porcentaje presentan. Los carbohidratos, las cenizas y la humedad tuvieron el valor de correlación más alto (mayores a 0.9/-0.9).

Tabla XII. Datos de correlación entre proximales de *Eisenia arborea* y variables ambientales.

ρ	Proteína Kjeldahl	Proteína Lowry	Lípidos	Humedad	Cenizas	Carbohidratos
Temperatura	0.837*	-0.738*	0.843**	-0.926**	-0.949***	0.949***
Índice UV	0.837*	-0.738*	0.843**	-0.926**	-0.949***	0.949***

*Valor-p menor a 0.05.

**Valor-p menor a 0.01.

***Valor-p menor a 0.001

Con respecto a las bioactividades, se presentó una correlación significativa negativa en los antibiogramas ($p=-0.917$ para AcOEt y -0.961 para MeOH) y en FRAP ($p=-0.948$ para AcOEt y -0.946 para MeOH) tanto con la temperatura como con índice UV y con valores p exactamente iguales. Estos valores de correlación alta sugieren que a mayor temperatura/radiación, menor será el halo de inhibición o la actividad FRAP.

8. Discusión

8.1. Proximales y estacionalidad

En este trabajo se realizó una caracterización proximal de la composición química del alga *E. arborea* colectada en distintos meses representativos de las estaciones de verano, otoño e invierno, de la localidad campo Kennedy en Ensenada, B.C. De manera general se observó que la proporción de constituyentes coincide con otros trabajos realizados para *E. arborea* por Hernández-Carmona *et al.* (2009) y Landa-Cansigno (2015), donde los carbohidratos representan el mayor porcentaje ($>50\%$), seguido de las cenizas ($>15\%$) y los de menor porcentaje fueron los lípidos ($<3\%$), mientras que humedad y proteínas se encontraban en rangos cercanos al 10% (Hernández-Carmona *et al.*, 2009; Landa-Cansigno, 2015). En particular, en este trabajo se observó una diferencia en la proporción porcentual de los constituyentes en relación a la temporada de muestreo (Tabla VI). En comparación, el trabajo

realizado por Hernández-Carmona *et al.* (2009), no muestra un patrón definido de los constituyentes con respecto a los meses de muestreo. Esto puede estar relacionado por las diferencias en las variables ambientales que ocurren en las distintas localidades de muestreo. Por ejemplo, los trabajos de Hernández-Carmona *et al.* (2009) y Landa-Cansigno, (2015) se realizaron en Baja California Sur, Bahía Asunción y Bahía Magdalena respectivamente, en donde los rangos de temperatura entre estaciones del año varían de 17 a 27°C . En comparación, en la localidad de campo Kennedy, los rangos de temperatura entre estaciones fue de 14 a 22°C. Por lo que, estas observaciones sugieren que las variables ambientales tienen un efecto directo en la composición proximal de *E. arborea*, y que posiblemente resultan en alguna ventaja adaptativa de este organismo a su medio ambiente.

La aproximación estadística permitió evaluar la relación de las observaciones químicas y biológicas con los parámetros ambientales, y por lo tanto inferir la relación estacional entre estas. Por ejemplo, con base en las correlaciones identificadas, se considera que el contenido de carbohidratos, lípidos y proteína (método Kjeldahl) será mayor en temporadas cálidas y/o de mayor radiación solar, con sus valores máximos en verano. Mientras, el contenido de proteínas por el método Lowry, humedad y cenizas ocurre lo contrario, a mayor temperatura y/o radiación, menor contenido de estos constituyentes.

En este estudio, en la temporada de verano se presentó menor humedad en las láminas de *E. arborea* (7.87%), dato que difiere con lo reportado por Arvizu *et al.* (2007) donde en dicha temporada se reporta el mayor contenido (17.5%). A su vez, en dicho trabajo los porcentajes de humedad se mantienen arriba del 10.4%, valores más altos que los reportados en el estudio actual. Esto se puede deber a las diferencias de las condiciones ambientales, ya que en el trabajo de Arvizu *et al.* (2007), la recolecta se realizó en Bahía Magdalena, BCS, a menor latitud que la recolecta del trabajo actual, lo que expone a los organismos de BCS a mayor radiación solar y mayor temperatura en comparación con BC. En consecuencia puede forzar a los organismos a retener mayor agua en general para evitar el daño celular por dicha radiación.

El contenido de lípidos en este estudio, presentó su mayor valor en verano (2.415%), lo que contrasta con lo reportado en Landa-Cansigno (2015) y en Hernández-Carmona *et al.* (2009) donde en ambos estudios, en verano, se reportan menores porcentajes de lípidos que en otras estaciones; por otro lado, el contenido

de lípidos en ambos estudios se mantiene debajo del 1%, mientras que en el trabajo actual el valor más bajo obtenido fue de 1.74%. Se podría explicar que en el trabajo actual, los valores de lípidos son más altos que en lo reportado en la literatura debido a que, al estar a mayor latitud que las recolectas de los trabajos mencionados anteriormente, requieren hacer mayor reservas de energía ya que llega menos radiación en comparación, y por lo mismo, en verano es cuando hay mayor contenido de lípidos debido a que podría haber mayor actividad fotosintética que favorezca la acumulación de estos componentes (Konstantin *et al.*, 2023).

A su vez, un trabajo que estudió la influencia de la variación estacional en el contenido de lípidos de *Saccharina cichorioides* (orden Laminariales), reportó que la temporada con mayor acumulación de lípidos fue en verano, en la fase de esporogénesis y una disminución en invierno en la fase de crecimiento (Gerasimenko *et al.*, 2014). Con base en lo reportado sobre la estrategia de vida de *E. arborea*, donde en verano-otoño comienza la esporogénesis, y que en invierno se ha registrado la mayor tasa de crecimiento (Parada *et al.*, 2009), relacionando esto con lo reportado por Gerasimenko *et al.* (2014) podría explicar este máximo y mínimo del contenido total de lípidos en *E. arborea* en BTS.

El contenido de carbohidratos en este trabajo presentó sus valores máximos en verano (57.92%), lo que coincide con lo reportado en la literatura según Hernández-Carmona *et al.* (2009) y Landa-Cansigno (2015) (54.30% y 61.43% respectivamente). Similar a los lípidos, estos valores máximos de carbohidratos en verano se pueden explicar con el incremento en la actividad fotosintética en la temporada de mayor radiación.

En invierno se obtuvo el mayor valor de cenizas en este estudio (30.71%), lo cual coincide con lo reportado en diferentes estudios: un 33.75% de acuerdo a Landa-Cansigno (2015), y un 29.3% según Hernández-Carmona *et al.* (2009). Debido a que las cenizas representan el contenido de minerales que hay en las algas (D'Armas *et al.*, 2019), el hecho de que haya mayor contenido en invierno se podría explicar con la menor temperatura de la columna de agua, lo que disminuiría la intensidad de la termoclina lo que favorece la mezcla, aportando nutrientes que estaban a mayor profundidad.

En la literatura, el contenido de proteínas de *E. arborea* está usualmente determinado por métodos que determinan a base del nitrógeno (método dumas) o del nitrógeno orgánico (Kjeldahl), siendo el caso de lo reportado por Landa-Cansigno

(2015) y Hernández-Carmona *et al.* (2009) donde en invierno es cuando se reportan los valores más altos de proteína (12.5% y 11.6% respectivamente), valores que coinciden con el trabajo actual (10.515% por el método Kjeldahl). Por otra parte, el contenido de proteínas por el método Lowry fue menor en dicha época, puesto que este método determina las proteínas en base a aminoácidos, es posible que en invierno, al haber mayor disponibilidad de nutrientes (por la circulación en la columna de agua) y menor radiación, haya más reservas de nitrógeno (método Kjeldahl) y menos síntesis de proteínas (método Lowry), y viceversa en la temporada de verano (Konstantin *et al.*, 2023; Sánchez-Barredo, 2009).

8.2. Rendimiento

En la literatura, la mayoría de los estudios realizados con *E. arborea* u organismos del género *Eisenia*, se enfocan en los compuestos polifenólicos debido a su conocida actividad antioxidante, por lo que no siempre se reportan los rendimientos de los extractos crudos. Sin embargo, en este trabajo se consideró relevante reportar el rendimiento obtenido de los extractos crudos debido a que los polifenoles no son los únicos compuestos con actividad biológica que se han reportado del género *Eisenia*, como los polisacáridos sulfatados por ejemplo (Morán-Santibañez *et al.*, 2016); a su vez, conocer el rendimiento nos permite conocer cuánto se va a obtener de recurso por cada cantidad de muestra seca, aportando una base o un aproximado para futuras investigaciones. En este estudio los valores de rendimiento tuvieron una diferencia en relación al solvente utilizado para la extracción en todas las temporadas, siendo para los extractos de CH₂Cl₂ y AcOEt menor a 1%, y en los de MeOH mayor a 8%. En comparación, el trabajo realizado por Landa-Cansigno (2015), muestra valores de rendimiento con un rango de 1.87-5.40%, siendo el mayor para la temporada de otoño; estos valores difieren mucho con los reportados por este estudio. Las diferencias entre ambos estudios se pueden deber a las diferentes metodologías utilizadas para obtener los extractos; en el estudio de Landa-Cansigno (2015) se utilizó maceración con etanol, mientras que en este estudio se realizó una percolación secuencial con diferentes solventes (CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH). Es probable que para la extracción por percolación tanto la polaridad como el hecho de ser secuencial, pudo haber separado colectivamente compuestos en las primeras dos extracciones,

además de extraer distintos compuestos por el metanol que pueden no ser extraídos en etanol.

Un estudio realizado con tres algas pardas (*Sargassum thunbergii*, *Undaria pinnatifida*, y *Saccharina japonica*), en el cual se utilizó una extracción mediante agua subcrítica (mayor presión y temperatura), obtuvo rendimientos mayores a 68%, valores mucho mayores a los obtenidos en este estudio, incluso sumando los rendimientos de los 3 extractos por cada estación (Park *et al.*, 2023). Otro estudio que también utilizó maceración, en este caso sucesiva con metanol, después agua a temperatura ambiente y después agua a 70°C del alga *Sargassum vulgare*, los extractos metanólicos estuvieron entre 2.38% para otoño y 11.05% para primavera, donde los valores de primavera fueron los más cercanos a los reportados en el trabajo actual (Pires-Santos *et al.*, 2019). Sin embargo, los extractos acuosos de primavera superan en gran medida los rendimientos reportados en este estudio, ya que presentan valores mayores a 38% (Pires-Santos *et al.*, 2019). En el trabajo actual, los extractos de MeOH fueron los que presentaron mayor rendimiento, que junto con lo reportado en la literatura, indicaría que en *E. arborea* hay mayor abundancia de compuestos muy polares, ya que estos son los que se extraen con metanol o con agua principalmente.

8.3. Actividad Antibacteriana

Respecto a la actividad antimicrobiana, los extractos de MeOH y AcOEt presentaron actividad contra *V. harveyi* con respuesta intermedia y susceptible (Tabla VIII). Sin embargo, solo los extractos de AcOEt fueron significativamente diferentes del blanco. Esto no descarta que los extractos de MeOH tengan actividad, sino sugiere que se pueden realizar pruebas a una mayor concentración para evaluar su eficiencia o se puede realizar un fraccionamiento para identificar si alguna fracción o compuesto presenta más actividad aislado que en conjunto con todo el extracto, ya que puede haber un efecto antagonista, donde una sustancia o compuesto anula o disminuye el efecto de otra (Caesar & Cech, 2019).

La actividad de extractos metanólicos en algas pardas se ha evaluado previamente. Por ejemplo, Assegaf e Insafitri (2023) reportaron actividad antibacteriana (Concentración Mínima Inhibitoria o CMI) contra *Vibrio harveyi* con extractos metanólicos de *Sargassum sp.* y *Padina sp.* donde las concentraciones más

bajas para tener respuesta bacteriana susceptible a las 24 horas fue de 3 µg/µl del extracto de *Sargassum* sp. y de 2 µg/µl del extracto de *Padina* sp. Similar a esto, el trabajo realizado por Gonzalez-Colunga *et al.* (2019) reportó una CMI de 3.5 µg/µl de un extracto crudo de acetona de *E. arborea* con la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. Estos valores son considerablemente menores a lo reportado en el trabajo actual (100 µg/µl), aunque no se descarta que el extracto de AcOEt de invierno presente una CMI cercana.

Además, la comparación de extractos metanólicos y acuosos se ha reportado anteriormente. Por ejemplo, un estudio evaluó la actividad antibacteriana ante diferentes especies de *Vibrio* (exceptuando *V. harveyi*), de extractos metanólicos y acuosos de semillas de la planta nativa de África, *Garcinia kola*, reportó que los extractos metanólicos tuvieron mejor CMI que los extractos acuosos (0.3 µg/µl a 2.5 µg/µl, y 10 µg/µl respectivamente (Penduka *et al.*, 2011). En este trabajo se observó que los extractos de AcOEt tuvieron mayor actividad que los de MeOH, lo que puede indicar que los extractos de polaridad intermedia son los que presentan mayor actividad antimicrobiana, o que en los extractos metanólicos y acuosos, hay compuestos que están actuando como antagonistas en el extracto debido a su polaridad.

Cabe mencionar que el hecho de que en la estación con mayor actividad biológica (invierno), se haya reportado menor contenido de carbohidratos, no descarta que el organismo haya sintetizado polisacáridos como el fucoidan o alginatos con diferentes características en dicha estación (Arvizu *et al.*, 2007), ya que hay estudios que mencionan actividad biológica importante de estos compuestos, principalmente antimicrobiana (Morán-Santibañez *et al.*, 2016).

8.4. Actividad Antioxidante

Referente a la actividad antioxidante, en este trabajo se encontró que los extractos de invierno presentaron mayor actividad antioxidante tanto para DPPH como para FRAP (Fig. 21). La actividad antioxidante evaluada por DPPH de extractos de *E. arborea* recolectada de diferentes zonas, mostró tener un valor de EC50 de 70 µg/ml (Tenorio-Rodríguez, 2018) para una fracción de diclorometano de un extracto hidroalcohólico (1:1), el cual resulta ligeramente menor a lo reportado en este estudio para un extracto crudo. En comparación, Landa-Cansigno (2015) evaluó la actividad antioxidante DPPH de *E. arborea* en la que el extracto etanólico de la temporada

cálida (verano) presentó una EC50 de 55 µg/ml, lo que contrasta con este estudio ya que los valores más altos se presentan en la temporada fría (invierno). Lo anterior puede estar explicado con base en la diferencia de los ecosistemas y factores de estrés a los que se encuentran expuestas las algas ya que en ese trabajo, la recolecta se realizó en una latitud menor (BCS), y de acuerdo a lo que se menciona en el estudio, el rango de temperatura fue de 17-27°C, mientras que en el trabajo actual fue de 14-22°. Esta diferencia en el rango de temperaturas puede indicar que el estrés que sufre *E. arborea* en ese estudio fue principalmente causado por la temperatura ya que el gradiente es mayor y alcanza temperaturas más altas, mientras que en este trabajo, el principal estresor puede ser otro factor (Matson & Edwards, 2007). Por lo mencionado anteriormente, los valores de correlación reportados, a pesar de ser significativos, podrían no indicar una causalidad.

Por ejemplo, se observa en otros estudios una diferencia en la actividad antioxidante de distintas especies, incluyendo *Macrocystis pyrifera*, en los que la temporada de muestreo tiene un efecto en la eficiencia del extracto aparentemente de manera independiente al solvente utilizado, por lo que se sustenta el argumento de que la variabilidad temporal de las condiciones fisicoquímicas de la localidad en donde se realiza la colecta tiene un efecto en la actividad antioxidante del alga (ANEXO VI).

Un dato importante a mencionar en este trabajo, es la profundidad a la que se recolectó el alga (entre 0 y 15 metros) ya que, al estar más cerca de la superficie, es más susceptible a las corrientes superficiales que tienden a ser más fuertes en la estación de invierno (González-Yajimovich *et al.*, 2015). Este movimiento puede generar un estrés en el organismo, que junto con el herbivorismo y los organismos epífitos, forcen al alga a activar un sistema de defensa química, a producir compuestos como los polifenoles, proteínas y algunos polisacáridos por mencionar algunos.

Con respecto a la actividad FRAP, se han reportado con el mismo control que en este estudio valores de actividad para tres algas, donde el alga parda *Sargassum vulgare* presentó la mayor actividad (414.80 µMTE/g), que resulta un valor más alto que los reportados en este trabajo. En comparación, las otras algas incluyendo *Palizada flagellifera* y *Ulva fasciata*, presentaron valores de FRAP menores a lo obtenido con el extracto de AcOEt de invierno en este estudio (Pires-Santos *et al.*, 2019; ANEXO VI).

De manera similar a lo observado en este estudio donde un mismo extracto, AcOEt de invierno, mostró actividades DPPH y FRAP más eficientes que el resto (Fig. 21), Tenorio-Rodríguez (2018) observó que la fracción que presentó mejor actividad DPPH (EC50 de 70 µg/ml) también presentó mayor actividad FRAP (42.3 mM eq. FeSO₄/g), lo que puede indicar que el mecanismo del antioxidante puede ser por transferencia de átomos de hidrógeno (H⁺), y principalmente de transferencia de electrones (e⁻); esto según el mecanismo de acción de cada ensayo donde el de DPPH se basa en la transferencia tanto de H⁺ como de e⁻ mientras que FRAP solo se basa en la transferencia de e⁻ (Gisbert *et al.*, 2023). Adicionalmente, se han realizado más estudios con extractos etanólicos/acuosos de *E. arborea*, en los que se ha obtenido una menor actividad antioxidante. Por lo que el uso de AcOEt en percolación secuencial para las extracciones se puede considerar una estrategia que favorezca el incremento del aislamiento de compuestos que presenten actividad antioxidante y que también se pueda evaluar así el efecto de la variación espacio-temporal de los extractos de *E. arborea*.

8.5. Contenido de Fenoles

En relación al contenido de fenoles, se observó una relación con respecto al valor de TPC para los extractos de AcOEt y MeOH con la estación del año, en la que durante el otoño se observó una disminución del TPC, mientras que en verano e invierno los valores aumentaron y fueron muy similares (Fig. 22). En referencia al solvente, los extractos de AcOEt presentaron mayor TPC que los de MeOH, lo que puede explicar en cierta medida las actividades biológicas observadas. El contenido de polifenoles se ha observado en distintas algas como *S. vulgare*, en el que extractos acuosos y metanólicos mostraron distintos valores de TPC. Pires-Santos *et al.* (2019), reportó para *S. vulgare* el valor más alto de TPC de 38.93 mg GAE/g del extracto con agua a 70°C en la temporada lluviosa (verano), mientras que para el extracto de metanol fue menor (6.70 mg GAE/g). Cabe mencionar que en dicho trabajo el mayor valor de TPC coincide con la mayor actividad FRAP. De manera similar, en otro estudio realizado por Tenorio-Rodríguez (2018), se menciona la relación entre TPC y actividad antioxidante FRAP de extractos de *E. arborea* y *M. pyrifera*, donde se presenta una correlación positiva entre dichas variables ($r = 0.620$).

Lo anterior sugiere que los polifenoles pueden ser los principales compuestos relacionados con la actividad antioxidante. Sin embargo, en este estudio no se

observó dicha correlación, lo que se puede deber a una diferencia en el tipo de polifenoles extraídos presentes en *S. vulgare* y *E. arborea* en el caso de lo reportado por Pires-Santos *et al.* (2019) debido a diferencias en la estructura molecular, o a una diferencia en el tipo de compuestos extraídos con respecto al solvente en el caso de Tenorio-Rodríguez (2018) ya que en ese caso fue un extracto hidroalcohólico, que debido a la alta polaridad (principalmente por el agua) se hayan extraído más compuestos capaces de transferir H^+ y e^- . Del mismo modo, la ausencia de esta correlación en el trabajo actual, puede indicar que hay otros compuestos que están influyendo en la actividad antioxidante.

Es posible que en el caso de los fenoles, principalmente en el caso de los extractos de AcOEt, se hayan sintetizado diferentes compuestos en cada época, lo que también podría explicar las diferencias en las actividades biológicas entre cada estación.

8.6. Pre-fraccionamiento y Actividad Antioxidante de Fracciones

La selección y pre-fraccionamiento del extracto de AcOEt de invierno, permitió evaluar con mayor detalle la relación entre la composición química de las fracciones con la actividad antioxidante. Por ejemplo, la fracción 2 tuvo el mayor rendimiento posiblemente en relación al tipo de mezcla que se utilizó (Mezcla A: CH_2Cl_2 , 8:2; Mezcla A= AcOEt:MeOH:H₂O 200:16:7), que pudo haber contenido compuestos de diferentes polaridades.

Esto se aprecia en los resultados de RMN a 400 MHz (H) de la fracción 2s, que se caracterizó por tener muchas señales no identificadas, pero de la cual se logró identificar el Eckol (Fig. 24), compuesto que ha reportado gran actividad antioxidante previamente en algas del mismo género (Shibata *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2021). Se menciona que este metabolito tiene una función antioxidante en el alga, y con respecto a la farmacéutica, aún se siguen haciendo estudios para su uso, en donde también se ha reportado actividad antiviral contra el virus de la influenza AH1N1 (Besednova *et al.*, 2021). Sin embargo, esta fracción no presentó actividad antioxidante pese a la presencia del eckol, lo que puede explicarse con el antagonismo con otros compuestos que pueda haber en dicha fracción.

En la fracción 2h, con la GC-MS se logró identificar una variedad más amplia de compuestos, entre los que destacan ácidos grasos, ésteres metílicos y un compuesto fenólico (Fig. 25), que podrían estar relacionados con la actividad

antioxidante y antimicrobiana del extracto ya que esta fue la fracción con mayor actividad antioxidante (Tabla XI), principalmente por la presencia del ácido oléico, ácido caprílico y el 2,4 Di-terc-butilfenol, compuestos de los que se ha reportado actividad biológica previamente (PubChem, 2024). Referente a los ácidos grasos, la presencia del ácido oléico se ha reportado previamente en otras especies de algas pardas como *Sargassum vulgare* y *Padina pavonia*, incluso en *E. arborea* (Kamenarska *et al.*, 2002; Serviere-Zaragoza *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2013). Por otro lado, no se encontraron reportes que mencionen la presencia del ácido caprílico en *E. arborea* pero sí en otras especies de algas pardas (Kamenarska *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2013). De modo similar, la presencia del 2,4 di-terc-butilfenol solo se encontró reportada en el alga *Dictyota ciliolata* (Aravinth *et al.*, 2023). Otro compuesto con actividad biológica que se encontró en la GC-MS fue el fucosterol, del cual se ha reportado uso como tratamiento para la diabetes (PubChem, 2024). Este compuesto se ha reportado en una gran cantidad de algas, incluyendo a *E. arborea*, y este metabolito cumple el rol de antioxidante (Kamenarska *et al.*, 2002; Serviere-Zaragoza *et al.*, 2021).

Adicionalmente, se identificaron compuestos que pueden estar relacionados con la capacidad de *Eisenia arborea* para la bioacumulación de contaminantes. Se identificaron ésteres de ácido ftálico (PAEs), compuestos que se utilizan en la industria de plásticos, adhesivos, pesticidas, entre otros. Hay estudios que se enfocan en la interacción de estos compuestos con las algas marinas, como por ejemplo, *Ulva lactuca*, donde un estudio relaciona la presencia de estos compuestos con la contaminación en el ambiente que rodea a esta macroalga (Gezgin *et al.*, 2001), e incluso se realizó un estudio en laboratorio, para observar su capacidad de bioacumulación y biodegradación con el fin de mitigar el impacto de estos contaminantes (Savoca *et al.*, 2022). También se ha observado que estos compuestos pueden ser sintetizados naturalmente y que tienen diferentes funciones, como en el caso del alga *Ulva fasciata* donde funcionan como antimicrobianos o como antiincrustante en el caso de *Sargassum muticum* (Pace *et al.*, 2024). Sin embargo, Pace *et al.* (2024) menciona que tanto el estrés biótico y abiótico, como la contaminación por industria de plásticos, tienen influencia en la presencia de los PAEs en las algas, por lo que se requiere de más estudios para determinar su origen.

En las fracciones 15, 16, 17 y 18 se presentó poca actividad antioxidante (menor a 17% en 0.5 mg/ml) sin embargo no se descartan debido a que no se

disolvieron por completo, por lo que algunos compuestos con actividad antioxidante pudieron no reaccionar como debieron. Esto se menciona debido a que en varios artículos, los extractos y/o fracciones más polares presentaron actividad antioxidante por lo que existe la posibilidad de que ocurra algo similar con los extractos de este trabajo (Shin *et al.*, 2021; Tenorio-Rodríguez *et al.*, 2019).

9. Conclusiones

- ❖ La variación estacional influye en la composición química de las láminas de *E. arborea* de la localidad Campo Kennedy; y en las actividades biológicas de los extractos.
- ❖ Los extractos de AcOEt y MeOH tienen potencial antimicrobiano ante la bacteria *V. harveyi*, así como potencial antioxidante dada su efectividad en el secuestro del radical DPPH y reducción de hierro FRAP.
- ❖ La estación de invierno es la más óptima para realizar extractos de *E. arborea* ya que en esta se reportaron buenos rendimientos, y las actividades biológicas más eficientes en comparación a verano y otoño.
- ❖ Los extractos de AcOEt fueron los más eficientes tanto en la actividad antibacteriana como en las antioxidantes mientras que los de MeOH tuvieron mejor rendimiento.
- ❖ Hubo mayor contenido de polifenoles en los extractos de AcOEt que en los de MeOH, y solo se presentó diferencia de TPC en los extractos de MeOH entre las estaciones de otoño-invierno.
- ❖ Las fracciones 2h y 2s del extracto de AcOEt de invierno fueron las que tuvieron mejor potencial antioxidante en el ensayo DPPH, y el identificar algunos compuestos presentes en dichas fracciones, puede facilitar su posterior aislamiento.

10. Recomendaciones

- Para un mejor análisis de influencia de variación estacional, tanto en composición química como en actividad biológica, se recomienda realizar recolectas cada dos meses. De ser posible, al mismo tiempo de hacer las

recolectas, tomar muestras de agua para análisis fisicoquímicos (salinidad, temperatura y nutrientes).

- Realizar pruebas de concentración mínima inhibitoria de extractos de *E. arborea* ante *V. harveyi* con el fin de identificar la eficiencia del extracto y futuras aplicaciones en la industria acuícola, así como probar con diferentes especies dado el potencial que se observó en este caso.
- Con base en lo reportado en el pre-fraccionamiento, en las últimas 10 fracciones probar con agua o agua caliente para hacer las pruebas antioxidantes y que la solubilidad no sea un problema.
- Continuar el aislamiento de las fracciones 2s y 2h dada la diversidad de compuestos y el potencial antioxidante.

11. Referencias Bibliográficas

- Abbott, I. y Hollenberg, G. (1976). *Marine algae of California*. Stanford University Press.
- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L., Ávila-Serrano, G., González-Yajimovich, Ó. y Becerril-Bobadilla, F. (2010). Macroalgas submareales de la bahía de Todos Santos, Baja California, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81, 601-618.
- Ajanth, M., Karthika, K., Balasubramanian, P. y Jayabalan, R. (2019). An overview of extraction and purification techniques of seaweed dietary fibers for immunomodulation on gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*. 92, 46-64. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.011>
- AlgaeBase (2024). *Eisenia arborea* J.E Areschoug 1876. AlgaeBase. Disponible en: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=4011
- Altamirano-Gómez, Z. (2017). Maricultivo de *Eisenia arborea* y *Macrocystis pyrifera* en Bahía Santa María, Baja California, México: Validación de sitio. [Tesis de Maestría] Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas.
- AOAC. (1995). Official methods of analysis of AOAC. Ed. 16. Arlington, VA.
- Aravinth, A., Perumal, P., Rajaram, R., Dhanasundaram, S., Narayanan, M., Maharaja, S. y Manikumar, A. (2023). Isolation and characterization of 2,4-di-tert-butyl phenol from the brown seaweed, *Dictyota ciliolata* and assessment of its anti-oxidant and anticancer characteristics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Vol. 54. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102933>
- Arvizu, D., Rodríguez, Y., Hernández, G. y Murillo, J. (2007). Chemical constituents of *Eisenia arborea* Areschoug from Baja California Sur, México. *Investigaciones Marinas*, 35(2), 63-69.
- Assegaf, M. e Insafitri. (2023). Potential extract of brown algae *Sargassum* sp. and *Padina* sp. as antibacterial *Vibrio harveyi*. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*. 1251(1). <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/1251/1/012034>
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3):119-145.
- Beas-Luna, R., Lorda, J., Malpica-Cruz, L., Montaña-Moctezuma, G., Zepeda-Domínguez, J., Vaca-Rodríguez, J. y Abadía-Cardoso, A. (2019). Bosques de macroalgas en arrecifes templados. En Paz-Pellat F, Hernández-Ayón J, Sosa-Ávalos R, Velázquez-Rodríguez A (Eds.), *Estado del ciclo del carbono: Agenda azul y verde* (103-124). Programa Mexicano del Carbono.
- Beltrán-Velarde, M. (2011). Patogenicidad de *Vibrio harveyi* (Cim 1792) asociada al síndrome de rojos vivos en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. [Tesis de Maestría] Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.
- Bernal M y Guzmán M (1984). El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, 4(3-4), 112-121.
- Besednova, N., Andryukov, B., Zaporozhets, T., Kryzhanovsky, S., Fedyanina, L., Kuznetsova, T., Zyagintseva, T. y Schelkanov, M. (2021). Antiviral effects of polyphenols from marine algae. *Biomedicines*. Vol. 9(200). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020200>

- Caesar, L. y Cech, N. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*. Vol. 36(6), 869-888. <https://doi.org/10.1039/c9np00011a>
- Cerdeira-Estrada, S., Martell-Dubois, R., Valdéz, J., Rosique-De la Cruz, L., Caballero-Aragón, H., Lopez, J., Santamaría-Del Ángel, E. y Ressler, R. (2024). Daily 1-km Satellite Nighttime Sea Surface Temperature (NSST). (L4-blended, since 1-Oct-1981). Satellite-based Ocean Monitoring System (SATMO), Marine-Coastal Information and Analysis System (SIMAR). CONABIO, México. Base de datos accesada en: <https://simar.conabio.gob.mx/explorer/?satmo=nsst>
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M. y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Cortez, V. (2013). Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. *Cuadernos de Biodiversidad*, 41, 16-21. <http://dx.doi.org/10.14198/cdbio.2013.41.03>
- D'Armas, H., Jaramillo, C., D'Armas, M., Echavarría, A. y Valverde P. (2019). Proximate composition of several macroalgae from the coast of Salinas Bay, Ecuador. *Journal of Tropical Biology*. Vol. 67(1), 61-68.
- Espinosa-Carreón, L., Gaxiola-Castro, G., Robles-Pacheco, J y, Najera-Martínez, S. (2001). Temperatura, salinidad, nutrientes y clorofila a en aguas costeras de la ensenada del sur de California. *Ciencias Marinas*, 27(3), 397-422.
- FAO (2024). Versión resumida de El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/cd0690es>
- Flores-Ruiz, E., Miranda-Novales, MG. y Villasis-Keever, M. (2017). El protocolo de investigación VI: cómo elegir la prueba estadística adecuada. *Estadística inferencial. Revista alergia México*. 64(3). <https://doi.org/10.29262/ram.v64i3.304>
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497-509.
- Gerasimenko, N., Busarova, N. y Logvinov, S. (2014). Seasonal changes in the content of lipids and photosynthetic pigments in a brown alga *Saccharina cichorioides*. *Russian Journal of Plant Physiology*. Vol. 61(6), 893-898. <https://doi.org/10.1134/S1021443714050082>
- Gezgin, T., Güven, K. y Akcin, G. (2001). Phtalate esters in marine algae. *Turkish Journal of Marine Sciences*. 7, 119-130.
- Gisbert, M., Franco, D., Sineiro, J. y Moreira, R. (2023). Antioxidant and antidiabetic properties of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* seaweed extracts. *Molecules*, 28(4937). <https://doi.org/10.3390/molecules28134937>
- González-Colunga, D., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. y Cruz-Suárez, L. (2019). Bioactivity-guided identification of anti-AHPND (acute hepatopancreatic necrosis disease) metabolites of *Ecklonia arborea*. *Journal of Applied Phycology*, 31, 3189-3199. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01818-5>
- González-Yajimovich, O., Ruíz-De la Torre, M., Castro-Valdez, R. y Bustos-Serrano, H. (2015). Reporte técnico del crucero oceanográfico CO 2014-2. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.10309.86243>
- Hafez-Ghoran, S. y Kijjoo A. (2021). Marine-derived compounds with anti-Alzheimer's disease activities. *Marine drugs*, 19(410). <https://doi.org/10.3390/md19080410>

- Hernández-Carmona, G., Carrillo-Domínguez, S., Arvizu-Higuera, D., Rodríguez-Montesinos, E., Murillo-Álvarez, I., Muñoz-Ochoa, M. y Castillo-Domínguez, R. (2009). Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J.E. Areschoug. *Journal of Applied Phycology*, 21, 607-616. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-009-9454-5>
- Huerta-Jiménez, M., Ortega-Cerrilla, M., Cobos-Peralta, M., Herrera-Haro, J., Díaz-Cruz, A. y Guinzberg-Perrusquía, R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia*, 30(12).
- Jiménez, C. (2018). Marine natural products in medicinal chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9, 959-961. <http://dx.doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.8b00368>
- Kang, KA., Lee, KH., Chae, S., Zhang, R., Jung, MS., Lee, Y., Kim, SY., Kim, H., Joo, HG., Park, J., Ham, YM., Lee, NH. y Hyun, JW. (2005). Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, 579, 6295-6304. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.008>
- Kennedy-Costa, W., De Oliveira, A., Da Silva-Santos, I., Guimaraes-Silva, V., De Oliveira, J., Ferraz-Navarro, D., Dos Santos-Correia, M. y Da Silva, M. (2022). Influence of seasonal variation on the chemical composition and biological activities of essential oil from *Eugenia pohliana* DC Leaves. *Chemistry & Biodiversity*, 19. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200034>
- Khan, R. (2018). Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 739-753. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015>
- Kamenarska, Z., Gasic, M., Zlatovic, M., Rasovic, A., Sladic, D., Kljajic, Z., Stefanov, K., Seizova, K., Najdenski, H., Kujumgiev, A., Tsvetkova, I. y Popov, S. (2002). Chemical composition of the brown alga *Padina pavonia* (L.) Gaill. from the Adriatic Sea. *Botánica Marina*. Vol. 45, 339-345. <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.034>
- Konstantin, B., Anastasia, P., Nikolay, I. y Daria, P. (2023). Seasonal variations in the chemical composition of Arctic brown macroalgae. *Algal Research*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103112>
- Landa-Cansigno, C. (2015). Variación en la composición química y en la actividad biológica de *Eisenia arborea* (Laminariales: Ochrophyta). [Tesis de Maestría] Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 106 pp.
- Lee, J. y Byun, HG. (2018). A novel BACE inhibitor isolated from *Eisenia bicyclis* exhibits neuroprotective activity against β -amyloid toxicity. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(38). <https://doi.org/10.1186/s41240-018-0114-z>
- Li, Y., Qian, ZJ., Ryu, B., Lee, SH., Kim, MM. y Kim, SK. (2009). Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 1963-1973. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.031>
- Lovstad-Holtdt, S. y Kraan, S. (2010). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Manandhar, B., Paudel, P., Seong, S., Jung, H. y Choi, J. (2019). Characterizing eckol as a therapeutic aid: a systematic review. *Marine drugs*, 17(361). <http://dx.doi.org/10.3390/md17060361>

Matson, P. y Edwards, M. (2007). Effects of ocean temperature on the southern range limits of two understory kelps, *Pterygophora californica* and *Eisenia arborea*, at multiple life-stages. *Marine Biology*. 151(5): 1941-1949. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-007-0630-3>

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Education and Technology*. 26(2), 211-219.

Morán-Santibañez, K., Cruz-Suárez, L., Ricque-Marie, D., Robledo, D., Freile-Pelegrín, Y., Peña-Hernández, M., Rodríguez-Padilla, C. y Trejo-Avila, L. (2016). Synergistic effects of sulfated polysaccharides from mexican seaweeds against measles virus. *BioMed Research International*, 2016(1). <https://doi.org/10.1155/2016/8502123>

Morán-Santibañez, K., Peña-Hernández, M., Cruz-Suárez, L., Ricque-Marie, D., Skouta, R., Vasquez, A., Rodríguez-Padilla, C. y Trejo-Avila, L. (2018). Virucidal and synergistic activity of polyphenol-rich extracts of seaweeds against measles virus. *Viruses*, 10(465). <http://dx.doi.org/10.3390/v10090465>

Morreuw, P., Ríos-González, L., Salinas-Salazar, C., Melchor-Martínez, E., Ascacio-Valdéz, J., Parra-Saldivar, R., Iqbal H. y Reyes, A. (2021). Early optimization stages of *Agave lechuguilla* bagasse processing toward biorefinement: Drying procedure and enzymatic hydrolysis for flavonoid extraction. *Molecules*. 26(7292). <https://doi.org/10.3390/molecules26237292>

NASA Langley Research Center (LaRC) (2024). POWER Project funded through the NASA Earth Science/Applied Science Program. Base de datos accesada en: <https://power.larc.nasa.gov/>

Nur, M., Harwanto, D., Tirtawijaya, G., Perwira, B., Sohn, JH., Kim, JS. y Choi JK. (2021). Fucosterol of Marine Macroalgae: Bioactivity, safety and toxicity on organism. *Marine drugs*. 19(545). <https://doi.org/10.3390/md19100545>

OBIS (2024). Ocean Biodiversity Information System. Disponible en: <https://obis.org/>

Okada, Y., Ishimaru, A., Suzuki, R. y Okuyama, T. (2004). A new phloroglucinol derivate from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Potential for the effective treatment of diabetic complications. *Journal of Natural Products*. 67, 103-105. <https://doi.org/10.1021/np030323j>

Othman, M., San-Loh, H., Wiart, C., Jin-Khoo, T., Hon-Lim, K. y Nee-Ting, K. (2011). Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 84: 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.008>

Pace, A., Vaglica, A., Maccotta, A. y Savoca, D. (2024). The origin of phthalates in algae: Biosynthesis and environmental bioaccumulation. *Environments*. 11(78). <https://doi.org/10.3390/environments11040078>

Parada-Sánchez, G. (2005). Dinámica y variación morfológica de una población intermareal de *Eisenia arborea* (Laminariales) en Punta Eugenia, B.C.S., México. [Tesis de Maestría] Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 73 pp.

Parada, G., Riosmena-Rodríguez, R., Martínez, E. y Hernández-Carmona, G. (2009). Dinámica poblacional de *Eisenia arborea* Areschoug (Laminariales: Ochrophyta) en el intermareal de Punta Eugenia, Baja California Sur, México. *Ciencia y Mar* Vol. 13(39), 3-13.

Park, JS., Han, JM., Park, YS., Shin, YR., Park, SW., Roy, V., Lee, HJ., Kumagai, Y., Kishimura, H. y Chun, BS. (2023). Exploring bioactive compounds

in brown seaweeds using subcritical water: A comprehensive analysis. *Marine drugs*, 21(328). <https://doi.org/10.3390/md21060328>

Penduka, D., Okoh, O. y Okoh, A. (2011). *In-Vitro* antagonistic characteristics of crude aqueous and methanolic extracts of *Garcinia kola* (Heckel) seeds against some *Vibrio* bacteria. *Molecules*. 16: 2754-2765. <https://doi.org/10.3390/molecules16042754>

Perán-Alarcos, C. (2020). Estrés en acuicultura: una visión actualizada para mejorar el bienestar animal en especies de interés comercial.[Trabajo de Grado] Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. 34 pp.

Pires-Santos, J., Bezerra-Torres, P., dos Santos, D., Motta, L. y Chow, F. (2019). Seasonal effects on antioxidant and anti-HIV activities of Brazilian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 31: 133-1341. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1615-y>

Praiboon, J., Palakas, S., Noiraksa, T. y Miyashita, K. (2018). Seasonal variation in nutritional composition and anti-proliferative activity of brown seaweed, *Sargassum oligocystum*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 101-111. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1248-6>

PubChem (2024). PubChem, National Center for Biotechnology Information. Base de datos accesada en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>

Romero, N. (1997). Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. En Morón, C. y Zacarías I. (Eds.), *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.

Sáenz-Campos, D. (2004). Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. *Fármacos*, 16(1 y 2), 13-20.

Sánchez-Barredo, M. (2009). Incorporación de nitrato y duración de las reservas de nitrógeno en la macroalga perenne *Eisenia arborea*. [Tesis de Maestría] Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Seca, A., Pinto, D., Michalak, I., Trincone, A., Prakash, A., Nigam, M., Zam, W. y Martins, N. (2019). Current trends on seaweeds: looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. *Molecules*, 24(4182). <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24224182>

Savoca, D., Coco, R., Melfi, R. y Pace, A. (2022). Uptake and photoinduced degradation of phthalic acid esters (PAEs) in *Ulva lactuca* highlight its potential application in environmental bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 29, 90887-90897 <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22142-5>

Schiener, P., Black, K., Stanley, M. y Green, D. (2015). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 27, 363-373. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0327-1>

SEMAR (2024). Ensenada, B.C. Secretaría de Marina (SEMAR) Disponible en: <https://digaohm.semar.gob.mx/cuestionarios/cnarioEnsenada.pdf>

Serviere-Zaragoza, E., Hurtado, M., Manzano-Sarabia, M., Mazariegos-Villareal, A., Reza, M., Arjona, O. y Palacios E. (2014). Seasonal and interannual variation of fatty acids in macrophytes from the Pacific coast of Baja California Peninsula (Mexico). *Journal of Applied Phycology*, 27, 1297-1306. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0415-2>

Serviere-Zaragoza, E., Hurtado-Oliva, M., Mazariegos-Villareal, A., Arjona, O. y Palacios, E. (2021). Seasonal and interannual variation of sterols in macrophytes from the Pacific coast of Baja California Peninsula (Mexico). *Phycological research*. Vol. 69, 41-47. <https://doi.org/10.1111/pre.12440>

Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H. y Hama, Y. (2008). Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *Journal of Applied Phycology*, 20, 705-711. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-007-9254-8>

Shin, HC., Wayas, IB., Choi, BW. y Lee, BH. (2021). Identification and biological activities of the phenolic compounds in *Eisenia arborea*. *American Journal of Plant Sciences*, 12, 259-265. <https://doi.org/10.4236/ajps.2021.122015>

Silva, G., Pereira, R., Valentao, P., Andrade, P. y Sousa, C. (2013). Distinct fatty acid profile of ten brown macroalgae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vo. 23(4). <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000048>

SIMoN (2024). Southern sea palm *Eisenia arborea*. Sanctuary Integrated Monitoring Network (SIMoN) Tools. Disponible en: <https://sanctuarysimon.org/dbtools/species-database/id/461/eisenia/arborea/southern-sea-palm/>

Sugiura, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Imai, K. y Amano, H. (2006). Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(11), 2807-2811. <https://doi.org/10.1271/bbb.60417>

Tenorio-Rodríguez, P. (2018). Compuestos polifenólicos de macroalgas marinas: actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana. [Tesis de Doctorado] Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Tenorio-Rodríguez, P., Esquivel-Solis, H., Murillo-Álvarez, J., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. y Angulo, C. (2019). Biosprospecting potential of kelp (Laminariales, Phaeophyceae) from Baja California Peninsula: phenolic content, antioxidant properties, anti-inflammatory, and cell viability. *Journal of Applied Phycology*, 31, 3115-3129. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01781-1>

Thompson, F., Iida, T. y Swings J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431. <https://doi.org/10.1128/mmb.68.3.403-431.2004>

Vasco, C., Ruales, J. y Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 11, 816-823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>

WoRMS (2024). *Eisenia arborea* J.E. Areschoug, 1876. World Register of Marine Species. Disponible en: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=371990>

Zertuche-González, J., Sandoval-Gil, J., Sánchez-Barredo, M., Altamirano-Gómez, Z., Guzmán-Calderón, J., Rangel-Mendoza, L., Ladah, L., Cruz-López, R. y Yarish, C. (2022). *Eisenia arborea* (Areschoung) domestication and mariculture development on the Pacific coast of Baja California, México. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.932534>

Zhang, XH., He, X. y Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science & Technology*, 2, 231-245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>

Zubia, M., Fabre, MS., Kerjean, V., Lann, KL., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M. y Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chemistry*. 116, 693-701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.025>

12. Anexos

ANEXO I. Estadísticos exploratorios

Proximales				
	Normalidad (Shapiro)		Heterocedasticidad (Levene)	
	W	valor p	F	valor p
Proteína Kjeldahl	0.8852	0.2938	1.57E+29	2.20E-16
Proteína Lowry	0.84297	0.06232	0.4428	0.6617
Proteínas (K y L)	0.89924	0.09265	0.4023	0.5369
Lípidos	0.80393	0.02264	0.3624	0.7103
Humedad	0.73543	0.00367	0.0594	0.9429
Cenizas	0.83904	0.05635	0.753	0.5108
Carbohidratos	0.88511	0.1776	0.0681	0.9349
Valores de normalidad en rojo indican que se rechaza normalidad. Valores de heterocedasticidad en rojo indican que se rechaza igualdad de varianzas.				

Actividades y Fenoles (Para diferencia por solvente)				
	Normalidad (Shapiro)		Heterocedasticidad (Levene)	
	W	valor p	F	valor p
TPC	0.86312	0.01373	2.0033	0.1761
Halo de Inhibición	0.74957	4.37E-07	16.738	4.33E-07
DPPH EC50	0.80222	0.02165	2.2236	0.1894
FRAP	0.85064	0.002246	0.0607	0.8077
Valores de normalidad en rojo indican que se rechaza normalidad. Valores de heterocedasticidad en rojo indican que se rechaza igualdad de varianzas.				

Continuación de ANEXO I

Extractos, Actividades y Fenoles (Para diferencia por estación)				
	Normalidad (Shapiro)		Heterocedasticidad (Levene)	
	W	valor p	F	valor p
Rendimiento	0.66619	0.00057	1.2325	0.3561
	Extractos de AcOEt			
TPC	0.9352	0.5324	0.6862	0.5391
Halo de Inhibición	0.90348	0.2729	0.5	0.6297
DPPH EC50	0.76922	0.04295	NA	NA
FRAP	0.83987	0.02759	0.7075	0.5184
	Extractos de MeOH			
TPC	0.75861	0.006821	0.3498	0.7183
Halo de Inhibición	0.93676	0.5482	0	1
DPPH EC50	0.95347	0.5848	NA	NA
FRAP	0.76809	0.004156	3.8497	0.06193
Valores de normalidad en rojo indican que se rechaza normalidad. Valores de heterocedasticidad en rojo indican que se rechaza igualdad de varianzas. NA= No Aplica				

ANEXO II Estadísticos Comparativos

	Diferencia de Proximales por Estación											
	Proteína (Kjeldahl)		Proteína (Lowry)		Lípidos		Humedad		Cenizas		Carbohidratos	
	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>
Grupal*	3.7143	0.1561	5.4222	0.06646	5.9556	0.0509 1	6.8796	0.0320 7	7.2	0.0273 2	7.2	0.0273 2
Verano - Otoño**	-	-	-	-	-	-	-1.42	0.465	-1.34	0.539	1.34	0.539
Otoño - Invierno**	-	-	-	-	-	-	-1.2	0.693	-1.34	0.539	1.34	0.539
Invierno - Verano**	-	-	-	-	-	-	-2.62	0.0264	-2.68	0.0219	2.68	0.0219
Proteínas por método***	50	0.00479 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Diferencia de Extractos (Rendimiento, Actividades Biológicas y TPC) por solvente											
	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>								
Rendimiento*	5.9556	0.05091										
	TPC		FRAP									
AcOEt - MeOH***	81	4.11E-05	144	3.64E-05								
	Halo de Inhibición											
	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>
Grupal*	38.37	2.36E-08										
	AcOEt - Blanco		AcOEt - Control		AcOEt - MeOH		MeOH - Blanco		MeOH - Control		Control - Blanco	
Combinaciones**	-3.26	6.77E-03	2.43	0.0895	-0.769	1	2.43	0.0895	-3.26	6.77E-03	6.15	4.76E-09
	DPPH EC50											
Grupal*	6.7126	0.03486										
	AcOEt - Control		AcOEt - MeOH		MeOH - Control							
Combinaciones**	-1.52	0.388	1.06	0.866	2.58	0.0299						

Continuación de ANEXO II

	Diferencia de Extractos (Rendimiento, Actividades Biológicas y TPC) por estación							
Rendimiento*	1.0667	0.5866						
	Extractos de AcOEt							
	TPC		Halo de Inhibición		DPPH EC50		FRAP	
	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>	<i>Est</i>	<i>valor-p</i>
Grupal*	5.6	0.06081	6.8889	0.03192	2	0.3679	9.8807	0.007152
Verano - Otoño**	-	-	-1.65	0.297	-	-	-1.57	0.348
Otoño - Invierno**	-	-	-0.943	1	-	-	-1.57	0.348
Invierno - Verano**	-	-	-2.59	0.0286	-	-	-3.14	0.00501
	Extractos de MeOH							
	TPC		Halo de Inhibición		DPPH EC50		FRAP	
	<i>Estadístico</i>	<i>valor-p</i>	<i>Estadístico</i>	<i>valor-p</i>	<i>Estadístico</i>	<i>valor-p</i>	<i>Estadístico</i>	<i>valor-p</i>
Grupal*	7.2	0.02732	7.3846	0.02491	2	0.3679	9.8462	0.007277
Verano - Otoño**	1.34	0.539	-1.36	0.523	-	-	-1.57	0.35
Otoño - Invierno**	-2.68	0.0219	-1.36	0.523	-	-	-1.57	0.35
Invierno - Verano**	-1.34	0.539	-2.72	0.0197	-	-	-3.14	0.00511
Est: Valor Estadístico *Prueba de Kruskal-Wallis, estadístico es χ^2 . **Prueba de Dunn, estadístico es <i>valor-Z</i> . ***Prueba U de Mann-Whitney (código en R fue wilcox.test), estadístico es <i>W</i> .								

ANEXO III Estadísticos de Correlación y de Variables Ambientales

Estadísticos de Variables Ambientales

	Normalidad		Heterocedasticidad	
	<i>D</i>	<i>valor-p</i>	<i>F</i>	<i>Pr</i>
Temperatura	0.27066	2.20E-16	4.4947	0.0137
Índice UV	0.20657	1.15E-10	9.7807	0.000142
	Diferencias por estación			
	Temperatura		Radiación	
	<i>Estadístico</i>	<i>valor-p</i>	<i>Estadístico</i>	<i>valor-p</i>
Grupal*	64.425	1.02E-14	69.879	6.70E-16
Verano-Otoño	1.04	0.893	2.86	0.0126
Otoño-Invierno	6.3	8.68E-10	5.25	4.54E-07
Invierno-Verano	7.45	2.72E-13	8.26	4.24E-16
*Prueba de Kruskal-Wallis, estadístico es χ^2 . **Prueba de Dunn, estadístico es <i>valor-Z</i> . ***Prueba de normalidad de Lilliefors				

Estadísticos de Correlación

ρ	Proteína Kjeldahl	Proteína Lowry	Lípidos	Humedad	Cenizas	Carbohidratos		
Temperatura	0.837*	-0.738*	0.843**	-0.926**	-0.949***	0.949***		
Índice UV	0.837*	-0.738*	0.843**	-0.926**	-0.949***	0.949***		
	TPC		Halo de Inhibición		DPPH		FRAP	
ρ	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH	AcOEt	MeOH
Contenido de Polifenoles	-	-	-0.369	0.456	1	-1	-0.117	0.467
Temperatura	0.158	-0.474	-0.917***	-0.961***	0.5	0.5	-0.948***	-0.946***
Índice UV	0.158	-0.474	-0.917***	-0.961***	0.5	0.5	-0.948***	-0.946***
Los datos de temperatura e índice UV utilizados para calcular esto, fueron promedios por mes (el mes antes del día de recolecta) * Valor de p menor a 0.05. ** Valor de p menor a 0.01. *** Valor de p menor a 0.001.								

ANEXO IV. Rendimiento de fracciones de extracto AcOEt - Invierno.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
1	0.0708	7.08
2	0.4225	42.25
3	0.1194	11.94
4	0.0215	2.15
5	0.0085	0.85
6	0.0047	0.47
7	0.0103	1.03
8	0.002	0.2
9	0.0015	0.15
10	0.005	0.5
11	0.005	0.5
12	0.012	1.2
13	0.0098	0.98
14	0.0442	4.42
15	0.0238	2.38
16	0.0202	2.02
17	0.0151	1.51
18	0.0147	1.47
19	0.0055	0.55
20	0.0024	0.24
21	0.0273	2.73
22	0.071	7.1

ANEXO V Compuestos identificados en fracción 2h

Nombre Estructura	Otro nombre	Similitud	%Área	Tiempo	Familia de compuestos
2,4-Di-terc-butilfenol		95.7	0.84	17.01	Fenol
Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol.(3 beta,24Z)-	Fucosterol	94.9	4.38	36.37	Esterol
Metiltetradecanoato o Tetradecanoato de metilo	Miristato de metilo	94.5	1.19	20.04	Ester metílico de Ácido Graso
Ácido 9-hexadecenoico, metil éster, (Z)-	Palmitoleato de metilo	96.5	2.07	22.40	Ester metílico de Ácido Graso
Ácido hexadecanoico, metil éster	Palmitato de metilo	97.1	4.88	22.65	Ester metílico de Ácido Graso
Ácido 9-octadecenoico, metil éster, (E)-	Elaidato de metilo	97.6	1.7	24.74	Ester metílico de Ácido Graso
Metil estearato	Estearato de metilo	96.3	0.6	25.03	Ester metílico de Ácido Graso
Ácido eicosanoico, metil éster	Araquidato de metilo	91.8	0.54	27.21	Ester metílico de Ácido Graso
Ácido ftálico, hept-4-il isobutil éster		95.8	1.29	21.99	Ester de Ácido Ftálico
Ácido ftálico, di(2-propilpentil) éster		97.1	1.21	29.46	Ester de Ácido Ftálico
Dibutil ftalato	Ftalato de dibutilo	95.9	2.03	23.16	Éster
4-Oxononanal		93.5	3.03	12.64	Aldehído Graso
2-Decenal, (E)-		92.6	1.03	12.92	Aldehído
2-Undecenal		90.4	0.57	14.65	Aldehído
Heptacosano		93.4	1.38	30.80	Alcano lineal/parafina
Nonacosano		96.8	5.84	32.56	Alcano lineal/parafina
Triacontano		93.8	14.22	34.20	Alcano lineal/parafina
Tetratriacontano		91.9	3.46	35.84	Alcano lineal/parafina
Ácido Octanoico	Ácido caprílico	91.1	1.37	11.24	Ácido Graso Saturado
Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	94.9	9.58	20.52	Ácido Graso Saturado
Ácido n-hexadecanoico	Ácido palmítico	97.4	14.24	23.07	Ácido Graso Saturado
Ácido palmitoleico	Ácido palmitoleico	95.2	3.72	22.83	Ácido Graso monoinsaturado
Ácido oléico (ácido octadecenoico-9-cis)	Ácido Oleico	90.4	0.6	25.14	Ácido Graso Insaturado

ANEXO VI. Actividades antioxidantes de extractos de algas marinas.

Comparación de actividades antioxidantes de extractos de algas marinas.

Actividad Antioxidante	Especie	Extracto	Concentración	Referencia
DPPH EC50	<i>E. arborea</i>	EtOH:H ₂ O 1:1*	70 µg/ml	Tenorio-Rodríguez, 2018.
DPPH EC50	<i>M. pyrifera</i>	EtOH:H ₂ O 1:1**	280 µg/ml	Tenorio-Rodríguez, 2018.
DPPH EC50	<i>E. arborea</i>	EtOH de láminas, noviembre	55 µg/ml	Landa-Cansigno, 2015
DPPH EC50	<i>E. arborea</i>	EtOH de estipes, mayo	320 µg/ml	Landa-Cansigno, 2015
DPPH EC50	<i>E. arborea</i>	AcOEt otoño	82 µg/ml	Este estudio
DPPH EC50	<i>E. arborea</i>	MeOH invierno	120 µg/ml	Este estudio
FRAP	<i>Sargassum vulgare</i>	H ₂ O 70°C, tiempo de lluvia	414.80 µMTE/g	Pires-Santos <i>et al.</i> , 2019
FRAP	<i>Palizada flagellifera</i>	MeOH, tiempo seco	152.85 µMTE/g	Pires-Santos <i>et al.</i> , 2019
FRAP	<i>Ulva fasciata</i>	MeOH, tiempo de lluvia	117.62 µMTE/g	Pires-Santos <i>et al.</i> , 2019
FRAP	<i>E. arborea</i>	AcOEt invierno	342.15 µMTE/g	Este estudio
FRAP	<i>E. arborea</i>	MeOH invierno	183.38 µMTE/g	Este estudio

* Actividad de Fracción 2 del extracto hidroalcohólico.

** Actividad de Fracción 12 del extracto hidroalcohólico.