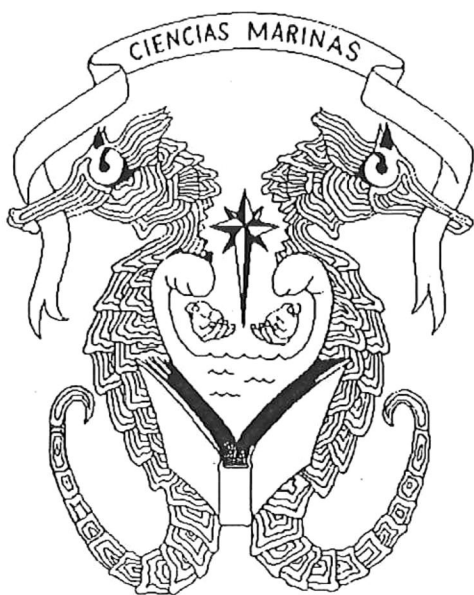




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

EVALUACION DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE METABOLITOS
BACTERICIDAS A PARTIR DE SEIS ESPECIES DE MACROALGAS DE LA BAHIA
DE TODOS SANTOS



TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
OCEANOLOGO
PRESENTA
DANIEL LOZANO MEDRANO

ENSENADA B. C., NOVIEMBRE DE 1999

RESUMEN

Se eligieron, con apoyo bibliográfico, seis especies de macroalgas con abundancia espacial en la bahía de Todos Santos, y que además pertenecieran a algún género que haya sido estudiado como productor de compuestos bactericidas.

Las macroalgas elegidas, más un blanco de disolvente (etanol al 90%), fueron sometidos a tres procesos de extracción (Soxhlet, agitación y centrifugación). El extracto obtenido fue sometido a destilación a presión reducida hasta sequedad, para posteriormente recuperar el sólido con éter dietílico, éste constituye la fracción lipofílica. El producto final de la extracción fue almacenado a -20°C .

Sobre cultivos de dos bacterias gram positivas (*Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*), fueron colocados discos estériles de 7mm. de diámetro impregnados con 3 gotas del producto de cada extracción (por octuplicado) e incubados a 35°C por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación se tomaron lecturas de inhibición sobre las bacterias con un vernier (con precisión de 0.05mm.). Las lecturas obtenidas fueron transformadas mediante la ecuación $H = \{(L-7) / 2\}$, para obtener la inhibición real (H). Después de efectuar una estadística descriptiva, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Bacillus subtilis no resultó un buen organismo de prueba en el bioensayo por presentar lecturas altas de inhibición en los blancos de disolvente, por lo que se descartó del análisis de varianza no paramétrico y de la comparación múltiple Tukey, con el fin de eliminar efectos negativos. Del análisis estadístico, se obtuvieron las siguientes conclusiones.

Existen suficientes evidencias estadísticas para considerar al método de extracción Soxhlet como el más efectivo, seguido del método de agitación, en tanto el método de centrifugación se mostró poco efectivo.

De las algas utilizadas: *Laurencia subopposita* y *Laminaria dentigera* presentaron inhibición significativa por los métodos Soxhlet y agitación, *Dictyota flabellata* y *Codium fragile* sólo por extracción Soxhlet. *Sargassum muticum* y *Egrecia laevigata* no mostraron lecturas significativas.

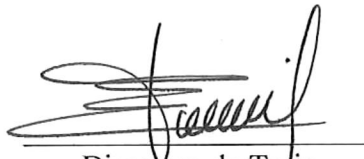
EVALUACION DE TRES METODOS DE EXTRACCION DE METABOLITOS
BACTERICIDAS A PARTIR DE SEIS ESPECIES DE MACROALGAS DE LA BAHIA
DE TODOS SANTOS

TESIS

QUE PRESENTA

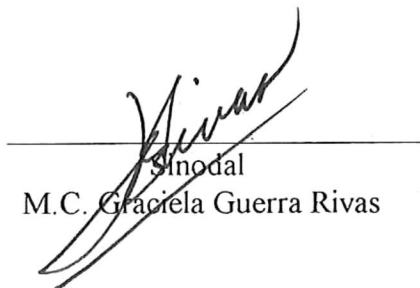
DANIEL LOZANO MEDRANO

APROBADA POR

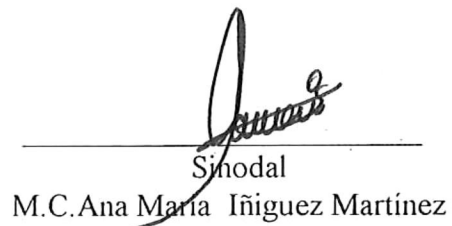


Directora de Tesis

M.C. Irma Esthela Soria Mercado



Sinodal
M.C. Graciela Guerra Rivas



Sinodal
M.C. Ana Maria Iñiguez Martínez

AGRADECIMIENTOS

A mi madre

Ma. Victoria Medrano García

A la que fué mi segunda casa por mucho tiempo

Universidad Autónoma de Baja California

Al iniciador de este proyecto (hoy realidad)

M.C. Juan Antonio Fernández Apango

A mi directora de tesis

M.C. Irma Esthela Soria Mercado

A mis sinodales

M.C. Graciela Guerra Rivas.

M.C. Ana María de Monserrat Iñiguez Martínez.

A los miembros de Papelería del Valle

Ma. del Rosario Ramirez García.

José Arturo Urias Gómez.

Jorge Alberto Acedo Ruiz.

Isaac Frias Camacho.

Ignacio Santana Zamora.

A todos mis compañeros, que no cito para evitarme omitir nombres.

A mis profesores, !! Cuanta paciencia !!

A mis hospederos ensenadenses.

¡Mil gracias!, sin ustedes, este trabajo no se habría realizado.

A MI MADRE
MA VICTORIA MEDRANO GARCIA,
MI ESPOSA
MA DEL ROSARIO RAMIREZ GARCIA,
Y MI HIJO
ADRIAN LOZANO RAMIREZ
!! LOS AMO !!

INDICE

1.- GENERALIDADES.....	1
1.a.- INTRODUCCION.....	1
1.b.- ANTECEDENTES.....	5
1.c.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	10
2.- METODOLOGIA.....	11
2.a.- DESCRIPCION Y LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA.....	11
2.b.- COLECTA.....	13
2.c.- EXTRACCION.....	14
2.c.i.- EXTRACCION SOXHLET.....	14
2.c.ii.- AGITACION MECANICA.....	15
2.c.iii.- CENTRIFUGACION.....	17
2.c.iv.- BLANCOS.....	17
2.d.- BIOENSAYO.....	19
2.d.i.- PREPARACION DE LOS MEDIOS.....	19
2.d.ii.- LECTURA.....	19
2.e.- ESTADISTICA.....	20
3.- RESULTADOS.....	22
3.a.- DE LA ESTADISTICA.....	22
3.b.- DE LOS METODOS DE EXTRACCION.....	23
3.c.- DE LAS MACROALGAS.....	26
3.d.- DE LAS BACTERIAS.....	28
4.- DISCUSIONES.....	29
4.a.- DE LOS METODOS.....	29
4.b.- DE LAS MACROALGAS.....	33
5.- CONCLUSIONES.....	39

6.- RECOMENDACIONES.....	40
7.- BIBLIOGRAFIA.....	41
8.- ANEXOS	46

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Promedio de lecturas de inhibición en mm.sobre <i>Staphylococcus epidermidis</i> por método de extracción.....	24
Tabla II	Lecturas de inhibición en mm sobre <i>Staphylococcus epidermidis</i> para todas las especies de macroalgas y por los 3 métodos de extracción....	24
Tabla III	Lecturas de inhibición promedio en mm sobre <i>Sataphylococcus epidermidis</i> por extractos de macroalga y blanco de disolvente.....	27
Tabla IV	Extractos con inhibición significativa una vez aplica la prueba "TUKEY".....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localización del área de colecta.....	12
Figura 2	Diagrama de bloques que muestra el proceso de extracción por el método Soxhlet	16
Figura 3	Diagrama de bloques que muestra el proceso de extracción por Agitación	16
Figura 4	Diagrama de bloques que muestra el proceso de extracción por Centrifugación	18
Figura 5	Diagrama de las lecturas de inhibición, en donde L = Diámetro de inhibición, 7 = Diámetro del sensidisco y H = Inhibición real despues de aplicar la ecuación $H = (L - 7) / 2$	21
Figura 6	Lecturas de inhibición de crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> usando los extractos de las 6 macroalgas y el blanco de disolvente	25

INDICE DE ANEXOS

Anexo I	Descripción de las macroalgas y su distribución en la bahía de Todos Santos.....	47
Anexo II	Lecturas de inhibición de crecimiento bacteriano, empleando los diferentes métodos de extracción.....	54
Anexo III	Resultados de las pruebas Estadísticas.....	57

1.- GENERALIDADES

1.a.- INTRODUCCION:

Gracias a estudios realizados en ecosistemas terrestres y recientemente en los marinos, se ha determinado la importancia que tienen en el ambiente algunos compuestos químicos con actividad biológica sintetizados por organismos (Andrew *et al.*, 1989). La función biológica de estos metabolitos es estudiada desde el siglo XIX (Fenical, 1982), y generalmente se les atribuye el incrementar la supervivencia de los organismos aumentando su competitividad en el medio frecuentemente hostil.

Su síntesis se ha vinculado con la competencia por nutrientes y/o por espacio (alelopatía), disuación química y/o para evitar la fauna incrustante ("antifouling") (Lodeiros *et al.*, 1988; Uriz *et al.*, 1992).

Paul y Fenical (1987) reportan que algunos de estos metabolitos son sintetizados por algas marinas de acuerdo a diversos factores, tales como:

- 1.- La necesidad de inhibir el crecimiento de organismos patógenos o pioneros de la sucesión poblacional como son: bacterias y hongos.

- 2.- La constante lucha contra los organismos incrustantes, como esporas de macroalgas, larvas de invertebrados etc.
- 3.- Competencia interespecífica por espacio.
- 4.- Disuación química sobre herbívoros (micropastoreo y/o macropastoreo).

Desde hace tiempo es conocido, que un porcentaje importante de metabolitos de los phyla Cnidaria, Porifera y Mollusca provienen directa o indirectamente de comunidades algales con las que viven en simbiosis y utilizan como parte de su dieta (Martin y Darias, 1978). Como ejemplo, el coral *Pleuxaura homomalia* contiene Prostaglandinas en 1.8% de peso seco, y existen evidencias para señalar al ácido araquidónico, producido por la comunidad algal simbiótica, como el principal precursor bioquímico (Barrow, 1983).

Otro ejemplo de relación simbiótica es el de *Laurencia pacifica*, que produce metabolitos que son utilizados por *Aplysia californica* como protección ante sus depredadores. Esta interacción se reafirma al observar que la larva veliger de *Aplysia californica* no sufre metamorfosis hasta situarse sobre *L. pacifica*. (Munro *et al.*, 1987).

En la actualidad, se sabe que los metabolitos secundarios frecuentemente cumplen un papel de mensajeros químicos a los que se conoce como feromonas cuando

actúan entre organismos de una misma especie y alomonas cuando actúan entre organismos de diferentes especies (Braeckman y Daloze, 1983) y estudios reciente sobre interacciones alelopáticas y aleloquímicas en microorganismos marinos, reportan actividad antibiótica de estos metabolitos (Targett y Word, 1991).

Se sospecha también, que la mayor actividad antimicrobiana de los metabolitos marinos con respecto a los terrestres radica en sus rutas de síntesis; debido a las diferencias de presión, temperatura y relaciones interespecíficas de los organismos; además, algunos compuestos con actividad biológica, son terpenos de alto peso molecular y éstos son producidos principalmente por organismos marinos (Braeckman y Daloze, 1983).

Un aspecto importante a considerar en los criterios de búsqueda de metabolitos bactericidas, es la variación de constituyentes secundarios debido a factores ambientales como son: sustrato, clima y flora asociada, que dificultan el análisis individual de producción de estos compuestos (Tyler *et al.*, 1988).

En los diversos estudios, se han establecido una serie de modificaciones en los cribados bactericidas y se ha encontrado que la efectividad de los mismos depende de: el método de cultivo (cuando las condiciones de crecimiento del alga son controladas), el método de extracción utilizado, el pH del medio de cultivo durante el cribado y el

extracto obtenido, la temperatura de incubación de la bacteria durante el bioensayo, el volumen o cantidad de microorganismo inoculado, etc. (Rios *et al.*, 1988). Por lo anterior, la búsqueda de compuestos con actividad biológica se torna difícil y laboriosa además de requerir un trabajo interdisciplinario entre los investigadores.

El enfoque ecológico, como son: la ausencia de epibiosis, distribución homogénea o en parches y una aparente dominancia del organismo, disminuye la aleatoriedad de la búsqueda y parece ser una herramienta muy útil en la localización de estos metabolitos.

Los diversos métodos de extracción de metabolitos activos utilizados por investigadores e instituciones varían de acuerdo con los objetivos planteados y la disponibilidad de tiempo para la búsqueda, y hasta el momento, se encuentran sin evaluar las ventajas y desventajas en cada método.

En el presente trabajo se pretende evaluar el método de extracción más efectivo, de acuerdo a las condiciones de infraestructura disponible y probar que las especies de macroalgas seleccionadas, producen sustancias antimicrobianas.

1.b.- ANTECEDENTES:

El cribado bacteriológico, ha resultado una herramienta útil para identificar y posteriormente aislar las moléculas con actividad biológica producidas por organismos marinos y que pueden ayudar al hombre en la solución de problemas de salud aunque se presentan variaciones en las diferentes metodologías y los disolventes empleados.

Existen algunas vías para detectar moléculas activas en organismos marinos como son: la búsqueda de toxicidad y la realización de pruebas sistemáticas de antibiosis en extractos de organismos (Braeckman y Dalozé, 1983). De éstas, la segunda opción ha sido utilizada por la mayoría de los investigadores con sus respectivas variaciones de criterio, recursos materiales y especies de organismos sometidos al estudio.

Utilizando directamente el talo del alga para disminuir las fuentes variación, Hornsey y Hide (1974 y 1976b) trabajaron sobre cultivos de bacterias gram positivas y encontraron que la actividad bactericida de las algas cribadas varía con respecto a la estación del año, al período de crecimiento del alga y a la parte del talo utilizada. Los factores de variación son mínimos, pero la difusión de los metabolitos del talo hacia el medio de cultivo bacteriano no es óptima. Además, la lectura corresponde sólo a una parte del talo y no a la macroalga.

También se ha elaborado una pasta de ficofita con agua destilada, misma que se utilizó directamente y se encontró que el 44% de las especies probadas inhiben el crecimiento bacteriano, que la actividad varía de acuerdo con la estación del año y que entre otras, destaca *Laurencia obtusa* que inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas (Burkholder *et al.*, 1961).

Buscando emplear únicamente la fracción activa, se ha utilizado el alga entera o partes del talo para obtener extractos por inmersión en disolvente (metanol o etanol principalmente) y se ha observado que se inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas y no se inhiben las gram negativas (Allen y Dawson, 1960) o que se restringe en mayor medida el crecimiento de bacterias gram positivas con respecto a las gram negativas u hongos, aunque algunos extractos se muestran fungicidas y bactericidas (Pesando y Caram, 1984).

Para incrementar el poder de arrastre del disolvente se ha empleado la centrifugación como medio mecánico adicional en el proceso de extracción, así, Olesen *et al.*, (1964) obtuvieron mayor efectividad de inhibición con este método utilizando agua o acetona como disolventes. Pero para incrementar la concentración de metabolitos en los extractos, se ha introducido la modalidad de homogenizar las macroalgas con el disolvente a utilizar seguido de filtración para eliminar los sólidos presentes y se ha determinado que las macroalgas presentan una variación estacional en la producción de antibióticos y cuatro patrones de conducta: actividad uniforme en todo

el año, máxima actividad en invierno, máxima actividad en verano y/o máxima actividad en primavera. De éstos, la inhibición del crecimiento bacteriano es mayor cuando se utilizan las especies colectadas en invierno probablemente por el bajo nivel de carbohidratos presentes en las macroalgas durante este período donde la macroalga disminuye su ritmo de crecimiento (Hornsey y Hide, 1976a).

La sofisticación de los métodos de extracción ha ido en aumento y se ha combinado la homogenización, filtrado, centrifugación y destilación a presión reducida, pero la actividad bactericida sigue siendo más notable sobre bacterias gram positivas, aunque se nota un mayor número de algas feofitas activas (82%) con respecto a las rodofitas (46%) y clorofitas (25%) (Lustigman y Brown, 1991). También se ha encontrado que las especies con actividad fungicida (70%) superan a las especies bactericidas (6%) (Ballesteros *et al.*, 1992), y que además algunas rodofitas son tóxicas para peces (Targett y Mitsui, 1979).

En las costas de Michoacán De Lara-Isassi *et al.*, (1989) han iniciado la búsqueda de metabolitos bactericidas bajo las mismas condiciones de extracción (homogenizado, filtrado, centrifugado y destilación a presión reducida) y utilizando dos extractos, acuoso y etanólico sobre una bacteria gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y una gram negativa (*Shigella sonni*), encontraron que diez de dieciséis algas estudiadas, mostraron actividad sobre *S. aureus*, cinco sobre *S. sonni* y cinco sobre

ambas; nueve de los extractos acuosos mostraron actividad bactericida; entanto, los extractos etanólicos activos, fueron solamente cinco.

En la Bahía de Todos Santos, las condiciones físicas y geológicas han originado una rica variedad de especies animales y vegetales (de las cuales algunas pertenecen a géneros mencionadas en literatura como productores de sustancias con actividad biológica); sin embargo, las investigaciones en este campo no son muy abundantes: la mayoría se han centrado en la producción de macroalgas o fitoplancton, y en la producción así como extracción de agentes aglutinantes como son: agar, carragenanos y alginatos.

En la actualidad sólo se cuenta con pocos estudios en la región sobre macroalgas como productoras de sustancias con actividad biológica: *Sargassum muticum* como productor de sargasterol, sustancia hipocolesterolémica (Gonzalez-Trejo, 1990), o como fertilizante en chicharo (Barreto-Estrada, 1994), y *Egregia menziensii* en su utilización como fertilizante en horticultura (Daniel-Harrel, 1987), pero ninguna toma el enfoque ecológico que implica la síntesis de éstas sustancias.

González-López (1979), realizó un estudio de ficoflora litoral en 16 estaciones de la bahía de Todos Santos y encontró que en la estación denominada Villa de las Rosas se hallan presentes 41 especies y sólo es superada en diversidad por Punta China con 43. Además, reporta que *Macrocystis pyrifera*, *Egregia laevigata*, *Codium fráigile*,

Pelagophycus porra y *Cystoseira osmundacea* son las especies más abundantes en la Bahía. De los géneros mencionados por González-López, son reportados como sintetizadores de metabolitos con actividad biológica: *Codium* (Ballesteros *et al.*, 1992; Lustigman y Brown, 1991; Hornsey y Hide, 1974, 1976a y 1976b), *Dyctiota* (Pesando y Caram, 1984; Allen y Dawson, 1960; Munro *et al.*, 1987; König y Wright, 1994; Tringalli *et al.*, 1984 y 1985), *Laurencia* (Ballesteros *et al.*, 1992; Caccamese *et al.*, 1980; Hornsey y Hide, 1974, 1976a y 1976b; Lustigman y Brown, 1991; Kamat *et al.*, 1992; Burkholder *et al.*, 1961; Olesen *et al.*, 1964; Target y Mitsui, 1979; Uriz *et al.*, 1991; Pesando y Caram, 1984; Welch, 1962; Munro *et al.*, 1987), *Ulva* (Baslow, 1977), *Enteromorpha* (Starr *et al.*, 1962; Starr y Kajima citados por Baslow, 1977), *Sargassum* (Ehresmann *et al.*, 1977; González-Trejo, 1990; Barreto-Estrada, 1994; Ballesteros *et al.*, 1992; Padimi *et al.*, 1987), *Porphyra* (Munro *et al.*, 1987), y más.

Cabe mencionar que algunas especies no han sido ni descartadas ni declaradas como productoras de sustancias con bactericidas, atribuible a la falta de estudios sobre las mismas.

1.c.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

HIPOTESIS:

No existe diferencia de efectividad entre los métodos de extracción de metabolitos secundarios con efectos bactericidas.

Algunas macroalgas de la Bahía de Todos Santos, que presentan abundancia espacial, poseen metabolitos con propiedades bactericidas.

OBJETIVOS:

1.- Comparar tres diferentes métodos de extracción de metabolitos bactericidas provenientes de seis macroalgas marinas (*Codium fragile*, *Dictyota flabellata*, *Egregia laevigata*, *Laminaria dentigera*, *Laurencia subopposita* y *Sargassum muticum*)

2.- Evaluar la actividad bactericida en la fracción lipofílica de extractos etanólicos, obtenidos a partir de seis especies de macroalgas.

2.- METODOLOGIA

2.a.- DESCRIPCION Y LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA.

La Bahía de Todos Santos, se localiza en el extremo Noroeste de la península de Baja California (México), entre los 31°43' y 31°54' Latitud Norte y entre los 116°36' y 116°49' Longitud Oeste (Fig. 1). Se encuentra limitada al norte por Punta San Miguel, al sur por Punta Banda, al este por la playa que va desde la rada portuaria hasta la boca del Estero de Punta Banda y al oeste por las islas de Todos Santos (Secretaría de Marina, 1974).

El área de colecta se localizó en la costa norte de la Bahía de Todos Santos, aproximadamente un kilómetro al sur del hotel "Las Rosas". Está formada por roca ígnea, principalmente basalto y andesita (Secretaría de Marina, 1974), casi sin pendiente, semiexpuesta a la acción del oleaje. En su mayoría presenta pastos marinos y/o algas rojas carbonatadas (Coralina, Lithothamnium). Se eligió la presente área por presentar mayor abundancia y diversidad de algas (rojas, cafés y verdes), y por presentar las condiciones geológicas idóneas para el crecimiento de las ficofitas (González-López, 1979).

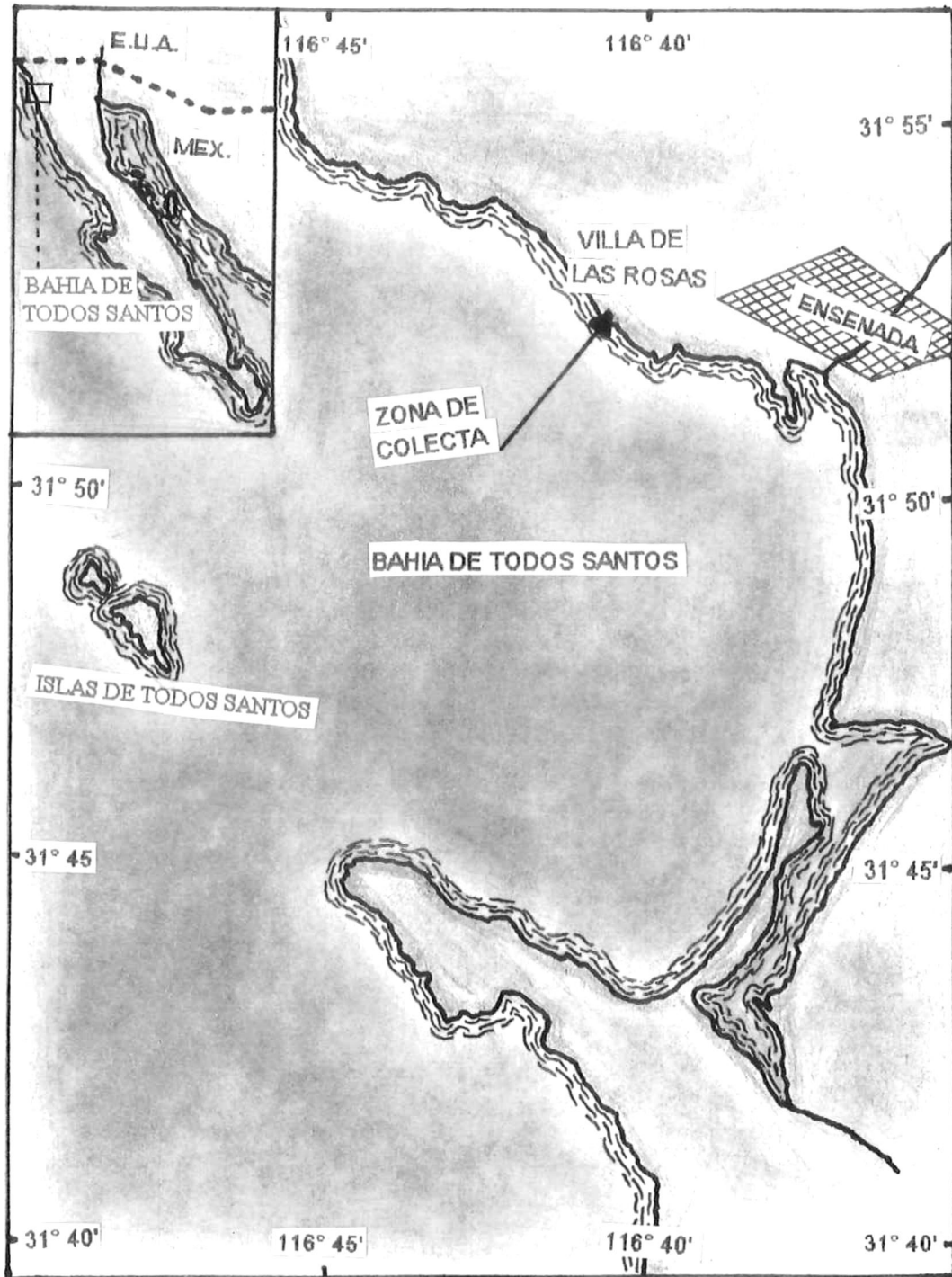


FIG. 1. LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA

2.b.- COLECTA:

Las especies de macroalgas seleccionadas fueron aquellas que presentaron mayor abundancia espacial (González-López, 1979), además de cubrir los siguientes criterios:

- ** Pertenecer a géneros utilizados en estudios anteriores (por referencias bibliográficas).
- ** Nula o poca presencia de simbiontes sobre los organismos a colectar.
- ** Notable dominancia del organismo sobre la comunidad, observada como homogeneidad de especies en un nicho o distribución en parches (al menos durante la colecta).

Una vez seleccionados los organismos, se procedió a la colecta durante los días 22, 23 y 24 de noviembre de 1995. Las especies coleccionadas fueron:

<i>Codium fragile</i> (Chlorophyta)	<i>Laminaria dentigera</i> (Phaeophyta)
<i>Dictyota flabellata</i> (Phaeophyta)	<i>Laurencia subopposita</i> (Rhodophyta)
<i>Egregia laevigata</i> (Phaeophyta)	<i>Sargassum muticum</i> (Phaeophyta)

Los especímenes colectados (Anexo I) fueron transportados húmedos (en bolsa de plástico), y una vez en laboratorio; se limpiaron de arena y organismos extraños a las mismas, las algas frescas fueron almacenadas a -20°C hasta que fueron sometidas a la extracción correspondiente. De cada especie se conservó una muestra en etanol para ser identificada.

2.c.- EXTRACCION:

Las macroalgas fueron descongeladas y lavadas con agua destilada, posteriormente se sometieron a extracción por tres métodos diferentes: extracción Soxhlet, agitación mecánica y centrifugación, para todos los métodos se trabajó con proporciones de 10 ml de disolvente por cada gramo de macroalga.

2.c.i.- EXTRACCION SOXHLET

10 g de macroalga fueron pesados en una balanza electrónica con precisión de ± 0.001 g y encapsulados en un cartucho de papel filtro (Whatman #1) que siempre fue manipulado con pinzas de disección estériles.

Cada cartucho elaborado fue colocado en un extractor Soxhlet con 100 ml de etanol al 90% hasta lograr una extracción exhaustiva.

Los extractos obtenidos de cada macroalga fueron tratados por destilación a presión reducida hasta sequedad cuidando que la temperatura no excediera los 35°C, el residuo sólido del matraz, fue recuperado con 2ml de éter dietílico (fig. 2), etiquetado como "Soxhlet fracción lipofílica" y conservado a temperatura de -20°C (Hashimoto, 1979).

2.c.ii.- AGITACION MECANICA

10 g de macroalga fueron pesados en una balanza electrónica con precisión de ± 0.001 g y cortados en fragmentos pequeños de aproximadamente 2 mm con pinzas de disección y bisturí estériles.

La macroalga se colocó en un vaso de precipitado con 100 ml de etanol al 90% y un magneto de 1 pulgada de largo, posteriormente se sometió a agitación continua por un período de 30 minutos a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos de cada macroalga fueron concentrados de inmediato por destilación a presión reducida hasta sequedad cuidando que la temperatura no sobrepasara los 35°C, el residuo sólido del matraz fue recuperado con 2 ml de éter dietílico (fig. 3), etiquetado como "agitación fracción lipofílica" y almacenado a -20°C (Hashimoto, 1979).

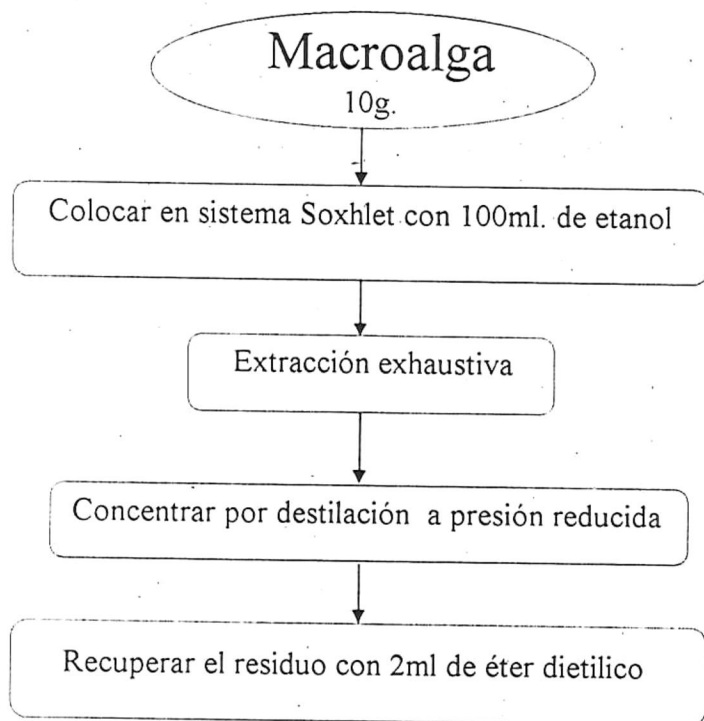


Figura 2. Diagrama de bloques que muestra el proceso de extracción por el método Soxhlet.

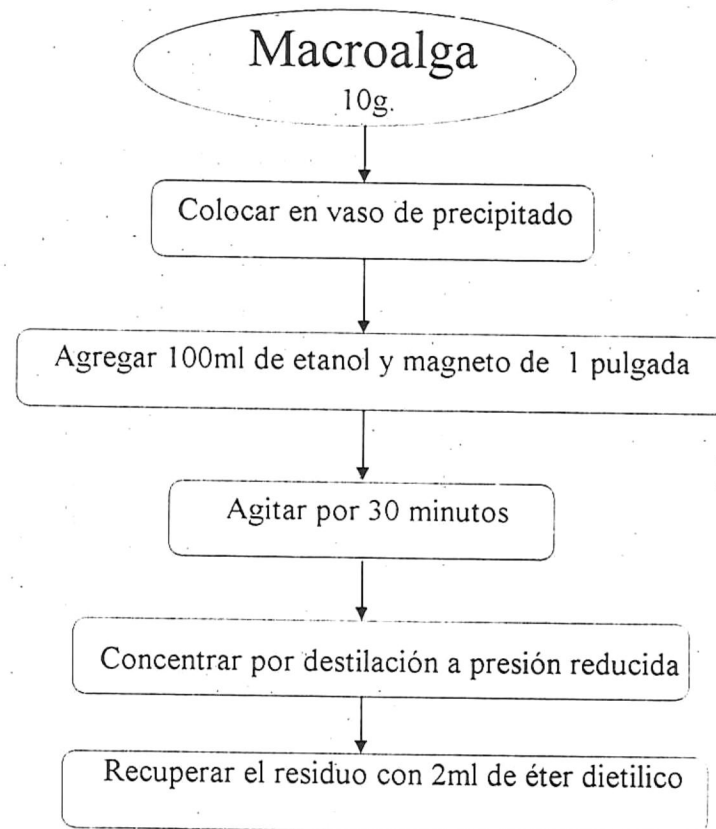


Figura 3. Diagrama de bloques que muestra el proceso de extracción por Agitación

2.c.iii.- CENTRIFUGACION

2 g de macroalga fueron pesados en una balanza electrónica con precisión de ± 0.001 g y cortados en fragmentos pequeños de 2 mm con pinzas de disección y bisturí estériles.

La macroalga se colocó en partes iguales en dos tubos de centrífuga de plástico de 15 ml. con 10 ml de etanol al 90% y se sometió a centrifugación a 3500 rpm x 15 min (Rinehart *et al.*, 1983) y (De Lara *et al.*, 1989). Los extractos obtenidos de cada macroalga fueron tratados de inmediato por destilación a presión reducida hasta sequedad cuidando que la temperatura no sobrepasara los 35°C, el sólido resultante en el matrás fue recuperado con 2 ml de éter dietílico (fig. 4), etiquetado como "centrifugación fracción lipofílica" y almacenado a -20°C (Hashimoto, 1979).

2.c.iv.- BLANCOS:

Para la elaboración de blancos de disolvente, se procedió como en cada método de extracción (Soxhlet, agitación y centrifugación), pero utilizando únicamente etanol al 90% sin macroalga.

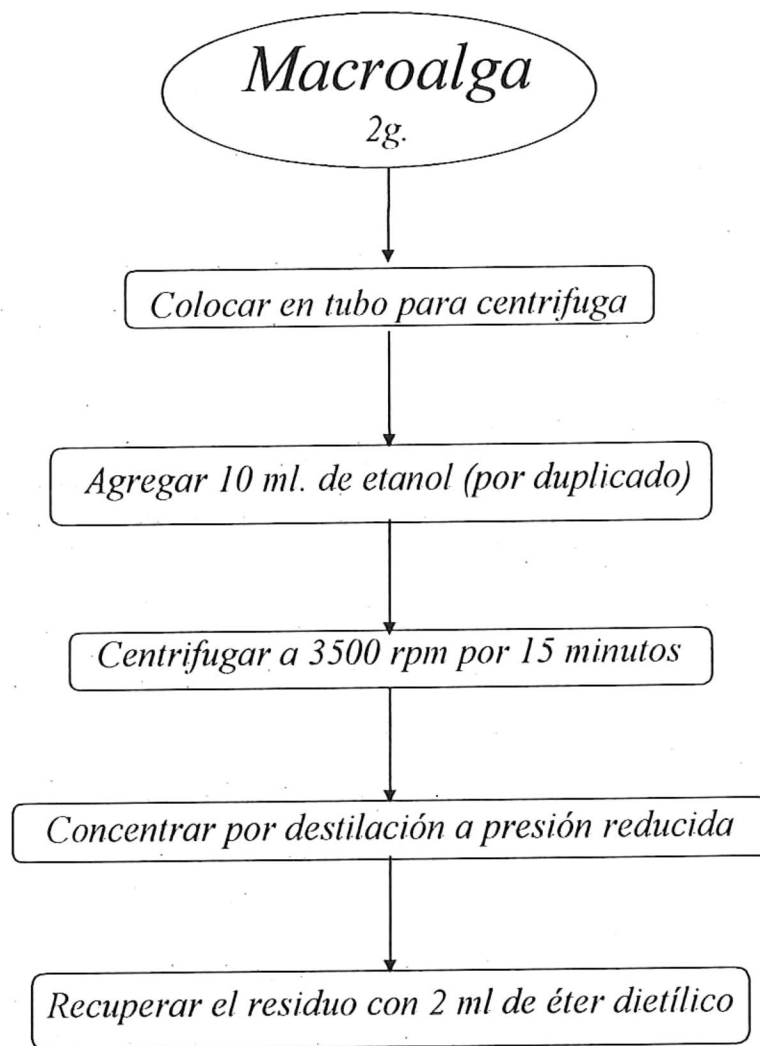


Figura 4. Digrama de bloques que muestra el proceso de extracción por Centrifugación

2.d.- BIOENSAYO:

2.d.i.- PREPARACION DE LOS MEDIOS:

En una atmósfera estéril y sobre medio de cultivo sólido (agar nutritivo) estéril (120°C/ 15 psi / 30min) se sembró *Staphylococcus epidermidis* o *Bacillus subtilis* con asa de inoculación mediante la técnica de estrías. Una vez sembrado el microorganismo, se colocaron discos de 7 mm. de diámetro impregnados con 3 gotas de cada extracto por octuplicado y se numeraron en sentido de las manecillas del reloj en cada caja petri, una vez terminada la siembra y colocación de sensidiscos, se procedió a incubar los microorganismos sin luz, a temperatura controlada de 35°C, durante 48 hrs.

2.d.ii.- LECTURA:

Transcurridas las 48 hrs. de incubación, se procedió a tomar la lectura del halo de inhibición (diámetro) en mm con ayuda de un Vernier con precisión de ± 0.05 mm. y para contar con lecturas útiles para el proceso estadístico y lograr una correcta interpretación de los resultados, se procedió a transformar las lecturas del diámetro de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$H = \frac{L - 7}{2}$$

En donde L , representa el diámetro del halo de inhibición, la constante 7, el diámetro del sensidisco y la división entre 2, es para obtener la distancia desde el borde del sensidisco y la línea del halo de inhibición (H) (Figura 5).

2.e.- ESTADISTICA:

Sobre las lecturas de inhibición (obtenidas mediante la ecuación antes descrita) se realizó una prueba de normalidad de Karl Pearson (Zar, 1984), seguida de un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) no-paramétrica de Kruskal-Wallis (Siegel, 1986; Zar, 1984; Sokol y Rohlf, 1979) para verificar y comparar la efectividad de las metodologías de extracción utilizadas, así como el poder bactericida de los extractos algales obtenidos por los diferentes procesos.

Posteriormente, fueron sometidos a una comparación múltiple mediante la prueba de Tukey (Zar, 1984), para comparar las lecturas por método de extracción para evaluar su efectividad relativa; las lecturas por especie de macroalga, para verificar la diferencia de inhibición de crecimiento bacteriano que provocan sus extractos en los bioensayos realizados, y finalmente las lecturas por macroalga y método de extracción para identificar a las que provocan inhibición estadísticamente diferente del blanco de disolvente (inhibición significativa).

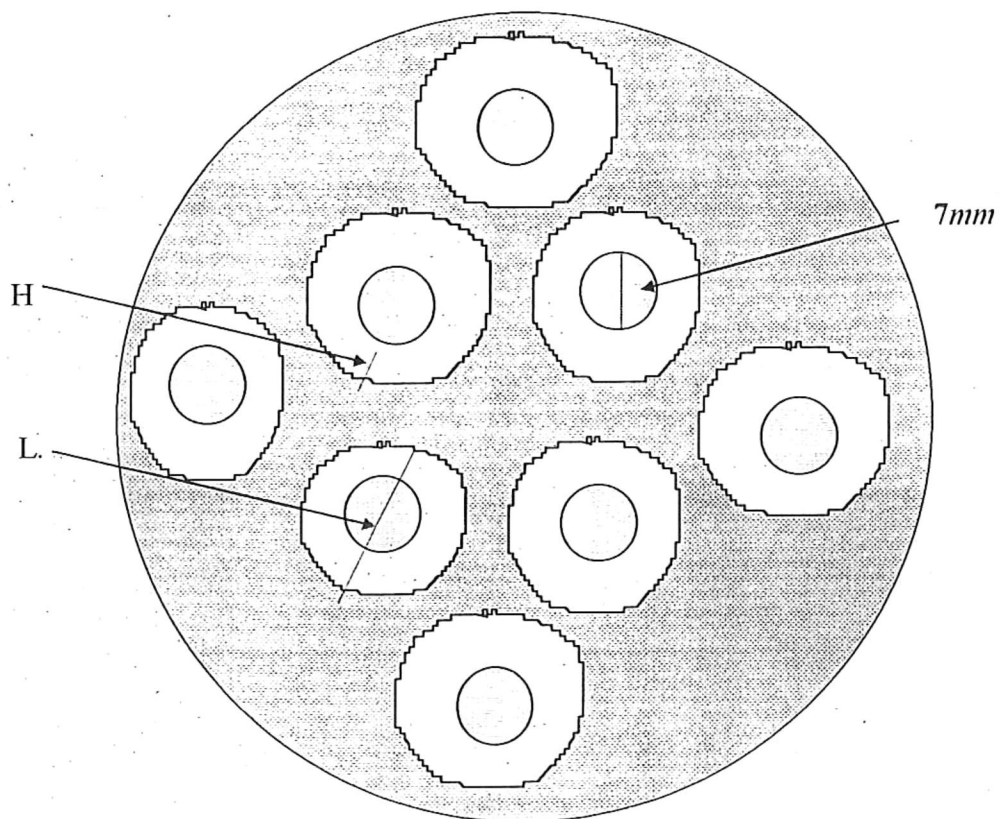


Fig. 5. Diagrama de las lecturas de inhibición, en donde **L** = diámetro de inhibición, 7 mm = diámetro del sensidisco y **H** = inhibición real después de aplicar la ecuación $H = (L - 7) / 2$.

3.- RESULTADOS:

3.a.- DE LA ESTADISTICA

Las lecturas obtenidas de los bioensayos (anexo II), fueron sometidas a una prueba de normalidad (Karl Pearson, anexo III) y se determinó que mostraban un comportamiento no normal ($\chi^2 = 783.481$, $\chi^2_{(crit)} = 27.587$, $P \leq 0.05$).

Con apoyo en los resultados de la prueba de normalidad y tomando en cuenta que los organismos utilizados (las macroalgas) provienen de diferentes poblaciones, se realizó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) no paramétrico de Kruskal Wallis (anexo III), cuyos resultados se describen posteriormente.

Como una forma de reforzar los resultados del ANOVA, con la comparación múltiple Tukey, se logró determinar con mayor exactitud la diferencia estadística de efectividad entre los métodos de extracción, la diferencia de inhibición provocada por los extractos obtenidos a partir de algunas macroalgas y la diferencia de las lecturas de inhibición por cada extracto (anexo III). Los datos específicos se detallan en los siguientes apartados.

3.b.- DE LOS METODOS DE EXTRACCION:

La estadística descriptiva indica que los valores (promedio) más altos de inhibición se presentan con mayor incidencia en los extractos obtenidos por el sistema Soxhlet (Tablas I y II, figura 6).

Por sistema Soxhlet las lecturas de inhibición más altas las presentaron los extractos obtenidos de: *Codium fragile* (3.628 mm) y *Laurencia subopposita* (2.381 mm); por agitación, *Laurencia subopposita* (3.459 mm) y por centrifugación *Dictyota flabellata* (1.316 mm) (Tabla II).

Al considerar sólo el método de extracción como variante, el ANOVA no-paramétrico (anexo III) indicó que existen evidencias suficientes para considerar por lo menos a alguna de las metodologías como la más efectiva ($H = 6.24$, $ji^2_{(crit.)} = 5.991$, $P \leq 0.05$).

La comparación múltiple Tukey (anexo III), de las lecturas de inhibición indica que los métodos no presentan suficiente evidencia estadística para considerarse como diferentes entre sí, ya sea *Agitación-Soxhlet* ($q = 1.22$, $q_{(crit.)} = 5.144$, $P \leq 0.05$), *Agitación-Centrifugación* ($q = 3.47$, $q_{(crit.)} = 5.144$, $P \leq 0.05$) y aún *Soxhlet-Centrifugación* ($q = 2.25$, $q_{(crit.)} = 5.144$, $P \leq 0.05$).

Tabla I. Promedio de lecturas de inhibición en mm. sobre *Staphylococcus epidermidis* por método de extracción

METODO DE EXTRACCION	LECTURA	
	μ	S
SOXHLET	1.355	1.692
AGITACION	0.948	1.239
CENTRIFUGACION	0.287	0.558

μ : valor promedio (mm) de 56 lecturas

s: desviación estandar

Tabla II. Lecturas de inhibición en mm sobre *Staphylococcus epidermidis* para todas las especies de macroalgas y por los 3 métodos de extracción

Especie cribada	METODO DE EXTRACCION					
	Soxhlet		Agitación		Centrifugación	
	μ	s	μ	s	μ	s
<i>Laurencia subopposita</i>	2.381	1.701	3.459	0.610	0.147	0.322
<i>Laminaria dentigera</i>	1.816	1.431	1.563	0.480	0.469	0.083
<i>Dictyota flabellata</i>	1.631	1.066	0.631	0.789	1.316	0.822
<i>Codium frágile</i>	3.628	1.445	0.025	0.000	0.009	0.012
<i>Egregia laevigata</i>	0.025	0.000	0.591	0.597	0.025	0.000
<i>Sargassum muticum</i>	0.006	0.011	0.347	0.428	0.022	0.008
Blanco	0.000	0.000	0.022	0.008	0.025	0.000

μ : valor promedio (mm) de 8 lecturas

s: desviación estandar

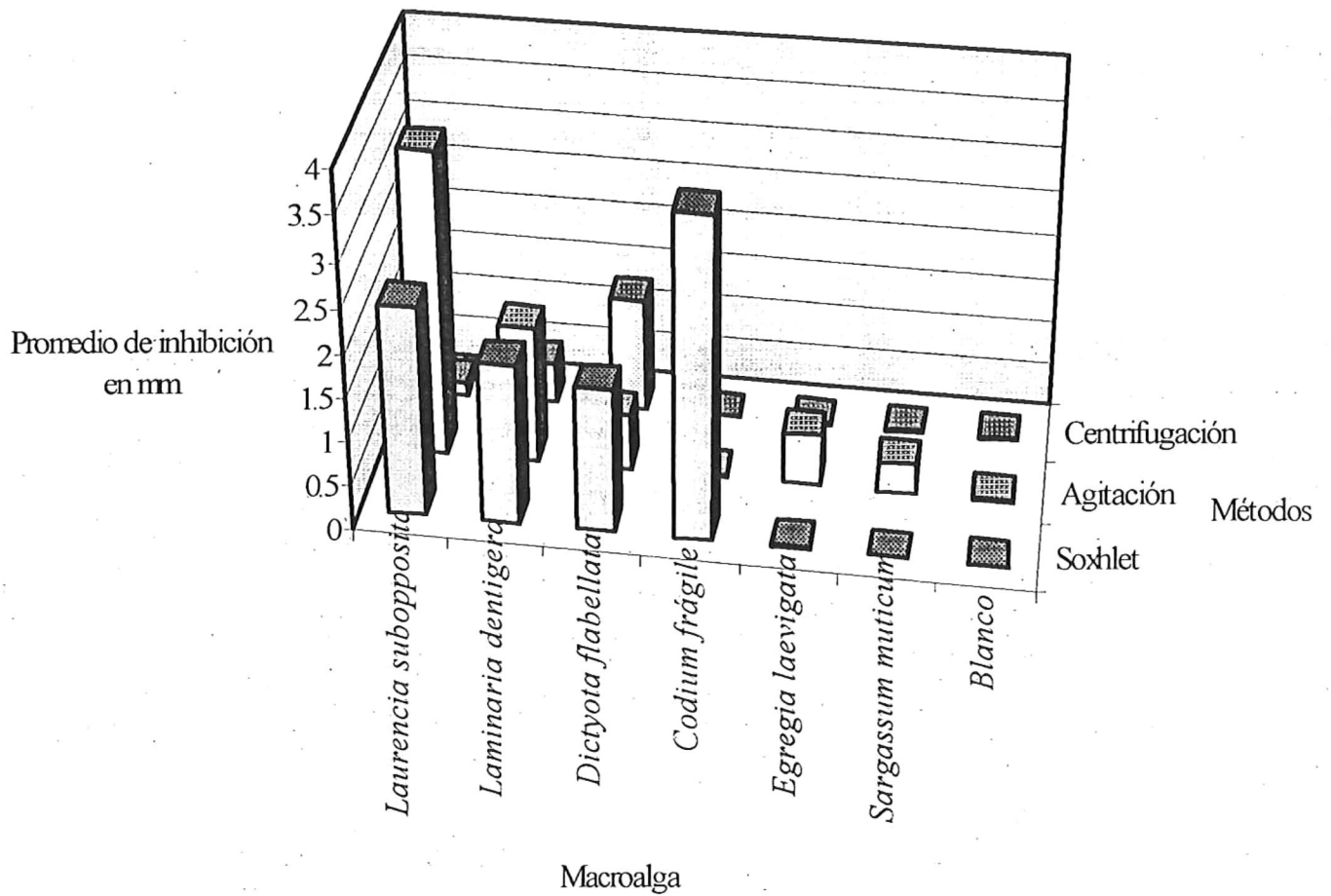


Figura 6. Lecturas de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* usando los extractos de las seis macroalgas y el blanco de disolvente.

3.c.- DE LAS MACROALGAS

La estadística descriptiva (tablas II y III, figura 6) indica que los promedios de inhibición por macroalga se muestran mayores cuando éstas son sometidas a extracción por sistema Soxhlet, v.g. *Codium frágame*, *Dictyota flabellata*, *Laurencia subopposita* y *Laminaria dentigera*.

Al considerar como variable sólo la especie de macroalga utilizada en el cribado, las lecturas fueron catalogadas como estadísticamente diferentes ($H = 55.54$, $ji^2_{(crit)} = 12.592$, $P \leq 0.05$) por el ANOVA no paramétrico.

Si las variantes son *Método de extracción-Macroalga*, el mismo estadístico determina que existen diferencias significativas ($H = 48.07$, $ji^2_{(crit)} = 21.026$, $P \leq 0.05$) entre las lecturas de inhibición.

Al realizar la comparación múltiple Tukey con los extractos y su respectivo blanco de disolvente, se determinó que los obtenidos de *Laurencia subopposita*, *Laminaria dentigera*, *Dictyota flabellata* y *Codium frágame* por el método Soxhlet, difieren significativamente de su blanco, al igual que los extractos de *Laurencia subopposita* y *Laminaria dentigera*, obtenidos por agitación, pero por centrifugación, ningún extracto de ninguna macroalga mostró diferencia significativa (Tabla IV, Anexo III).

Tabla III. Lecturas de inhibición en mm sobre *Staphylococcus epidermidis* por extracto de macroalga y blanco de disolvente

<i>Especie cribada</i>	μ	S
<i>Laurencia subopposita</i>	1.996	1.739
<i>Laminaria dentigera</i>	1.283	1.050
<i>Codium frágile</i>	1.221	1.890
<i>Dictyota flabellata</i>	1.193	0.993
<i>Egregia laevigata</i>	0.214	0.436
<i>Sargassum muticum</i>	0.125	0.293
<i>Blanco</i>	0.016	0.012

μ : valor promedio (mm) de 24 lecturas
s: desviación estandar

Tabla IV. Extractos con inhibición significativa una vez aplicada la prueba **TUKEY**

<i>Especie cribada</i>	METODO DE EXTRACCION		
	Soxhlet	Agitación	Centrifugación
<i>Laurencia subopposita</i>	+	+	-
<i>Laminaria dentigera</i>	+	+	-
<i>Dictyota flabellata</i>	+	-	-
<i>Codium frágile</i>	+	-	-
<i>Egregia laevigata</i>	-	-	-
<i>Sargassum muticum</i>	-	-	-
<i>Blanco</i>	-	-	-

* : Estadísticamente diferentes del blanco
+ : Sí presenta inhibición significativa
- : No presenta inhibición significativa

3.d.- DE LAS BACTERIAS:

Las bacterias utilizadas en el presente trabajo (*Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*), mostraron diferentes patrones de inhibición ante los extractos probados; *B.subtilis* presentó una lectura de inhibición cero y ninguna considerada como incipiente ($\leq 0.025\text{mm}$). Además, las lecturas del blanco de disolvente siempre fueron mayores de cero, incluso de mayor magnitud con respecto a las lecturas consideradas como traza (0.025 mm), razón por la cuál se consideró fuera del análisis estadístico.

4.- DISCUSION

4.a.- DE LOS METODOS

Comparando las lecturas por método de extracción, el método Soxhlet mostró mayores evidencias de efectividad al presentar el mayor número de lecturas con valores altos de inhibición (Tabla I) y estadísticamente significativas (Tabla IV); sin embargo, la comparación múltiple Tukey indicó que las lecturas no muestran diferencias significativas (Anexo III), tal vez por la mayor exactitud del análisis para detectar el efecto de las lecturas de inhibición (no significativas) presentadas por algunos extractos, además el análisis de varianza mostró valores muy similares entre el observado y el esperado ($H = 6.24$, $ji^2 = 5.991$, $P \leq 0.05$) (Anexo III).

En la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha (Ballesteros *et al.*, 1992; Burkholder *et al.*, 1961; Caccamese *et al.*, 1980; De Lara-Isassi *et al.*, 1989), se reporta un número notable de especies marinas cuyos extractos muestran actividad bactericida (sobre bacterias gram positivas), no obstante las diferencias de metodología; además, reportan que uno de los factores que influyen en la extracción de metabolitos con actividad biológica es la temperatura (Paul y Fenical, 1987), debido a la naturaleza de los mismos, pueden ser proteínas (Pushkar, 1981), ácidos grasos (Padimi, 1987),

bromofenoles (Craigie y Gruening, 1967) o Terpenoides (Paul y Fenical, 1987; König y Wright, 1994; Tringali *et al.*, 1984 y 1985); compuestos que se desnaturalizan con facilidad o reaccionan químicamente en presencia de calor. El efecto que produjo el calor en el poder bactericida de los extractos en el presente trabajo, parece ser favorable, probablemente por la naturaleza de las macroalgas, ya que las lecturas de inhibición de crecimiento bacteriano producido por los extractos, mostraron diferencias significativas aún cuando se obtuvieron de la misma especie de macroalga (Anexo III).

La extracción por agitación, que fue el proceso menos drástico, presentó dos lecturas de inhibición bacteriana estadísticamente significativas (Tabla IV), y al parecer, esta técnica no influyó en la naturaleza de los metabolitos obtenidos, como lo hizo el método Soxhlet, debido a que las lecturas de inhibición de los extractos obtenidos por los diferentes métodos, no difieren significativamente (Anexo III).

Pesando y Caram (1984), reportan que *Dictyota linearis* y *D. fasciola* producen metabolitos fungicidas pero no bactericidas, mientras *Laurencia obtusa* sí presenta metabolitos fungicidas y bactericidas. Kamat *et al.* (1992) encontraron que *Codium elongatum*, *Dictyota bartayresiana*, *Laurencia myriocystum*, *Laurencia wightii* y *L. papillosa* son especies productoras de metabolitos bactericidas. Por lo anterior, se puede deducir que, perfeccionando el método de agitación (variación en el tiempo de extracción, por ejemplo), este puede ser tan efectivo como el método Soxhlet o tal vez

ya lo sea, y las diferencias en las lecturas de inhibición de los extractos de *Codium fragile* y *Dictyota flabellata*, cuando son sometidas a centrifugación y extracción Soxhlet, sean producto de las diferencias en la naturaleza de las macroalgas y no de la efectividad de los métodos.

Por centrifugación, se excluyó la temperatura en el proceso y se disminuyó el tiempo de extracción; por lo tanto, se disminuyó la posibilidad de transformación química de los compuestos con actividad biológica; además, al excluir el homogenizado y provocar una fuerza centrífuga relativa suficiente (~1500 G) se eliminan células y organelos celulares en el sobrenadante (Williams y Wilson, 1981; Lehninger, 1989), por lo que se obtienen extractos con compuestos químicos intracelulares en mayor cantidad que en el método de agitación: lo que pudo ser un factor importante que determinara una mayor variedad de compuestos químicos en los extractos; pero el proceso fue menos drástico que en el método Soxhlet: lo que disminuyó el poder de extracción de compuestos químicos, y redujo la concentración de metabolitos con actividad bactericida en los extractos. Por los factores antes mencionados, se puede justificar la ausencia de lecturas con inhibición significativa en el bioensayo cuando se utilizaron los extractos que se obtuvieron por centrifugación.

Olesen *et al.*, (1964), obtuvieron extractos con diferentes disolventes, los probaron sobre varias especies de bacterias, y reportan que *Laurencia obtusa* y

Dictyota indica presentan mayor actividad bactericida por extracto y por bacteria en comparación con otras especies de macroalga utilizadas en su trabajo.

Ballesteros *et al.*, (1992) reportan un método de extracción similar, con la variante de homogenizar las muestras de macroalga antes de centrifugar y encontraron que los extractos de *Laurencia microcladia*, *L. pelagosae*, *Dictyota dichotoma*, *Sargassum horschuchil*, *Codium bursa* y *C. vermilara* contienen metabolitos fungicidas pero no bactericidas, resultados que parecen revelar una deficiencia en el proceso de extracción o la disminución en la concentración de metabolitos al destruir las células y mezclar los productos químicos internos y externos.

En el presente trabajo, ninguno de los extractos obtenidos de las especies del género *Laurencia*, *Dictyota*, *Sargassum* o *Codium* por el método de centrifugación presentó lecturas con inhibición significativa (Tabla IV, Anexo III), lo que podría indicar que el método es poco efectivo para extraer metabolitos bactericidas o que la temporada de colecta no fue la adecuada para estas especies.

4.b.- DE LAS MACROALGAS:

Cuando se analizaron las lecturas de inhibición por macroalga, el ANOVA mostró que existen diferencias altamente significativas ($H = 55.54$, $ji^2 = 12.592$, $P \leq 0.05$); en tanto, la comparación múltiple Tukey reveló un número importante de especies cuyos extractos presentaron diferencias significativas, v.gr. *Laurencia subopposita* y *Egregia laevigata* ($q = 4.53$, $q_{crit.} = 4.17$, $P \leq 0.05$), *Laurencia subopposita* y *Sargassum muticum* ($q = 6.33$, $q_{crit.} = 4.17$, $P \leq 0.05$), *Laminaria dentigera* y *Egregia laevigata* ($q = 4.48$, $q_{crit.} = 4.17$, $P \leq 0.05$), *Laminaria dentigera* y *Sargassum muticum* ($q = 6.78$, $q_{crit.} = 4.17$, $P \leq 0.05$), *Dictyota flabellata* y *Sargassum muticum* ($q = 5.51$, $q_{crit.} = 4.17$, $P \leq 0.05$), lo que puede ser indicio de una clasificación: *L. subopposita*, *L. dentigera* y *D. flabellata* como especies productoras de metabolitos bactericidas; *Sargassum muticum* y *Egregia laevigata* como especies no productoras de metabolitos bactericidas. Además *C. fragile*, *E. laevigata* y *S. muticum*, no mostraron extractos con lecturas estadísticamente significativas con respecto al blanco de disolvente (Anexo III).

Al combinar las variables *macroalga-método de extracción*, las lecturas obtenidas de cada extracto presentaron diferencias significativas ($H = 48.07$, $ji^2 = 21.026$, $P \leq 0.05$), pero el efecto logrado por cada metodología, parece depender en mayor medida del tipo de macroalga sometido al proceso correspondiente

($H = 55.54$, $ji^2 = 12.592$, $P \leq 0.05$), más que al método de extracción utilizado ($H = 6.24$, $ji^2 = 5.991$, $P \leq 0.05$), dadas las variaciones en el grado de significancia (Anexo III); además, la comparación múltiple Tukey fortalece esta afirmación al no mostrar diferencias significativas entre las lecturas por método de extracción, en tanto las lecturas por extracto y por macroalga si muestran diferencias (Anexo III).

Laurencia subopposita, como única Rhodophyta utilizada en los bioensayos, y *Laminaria dentigera*, una de las feofitas, parecen ser las especies idoneas para ser consideradas en estudios posteriores al presentar el mayor número de extractos cuyas lecturas de inhibición fueron significativas, únicamente no mostraron significancia los extractos obtenidos por centrifugación.

En la información disponible, no existen datos sobre cuantificación de los diferentes compuestos presentes en las macroalgas del género *Laurencia* (Ballesteros *et al.*, 1992; Caccamese *et al.*, 1980; Hornsey y Hide, 1976 y 1974; Lustigman y Brown, 1991; Kamat *et al.*, 1992; Burkholder *et al.*, 1961; Olesen *et al.*, 1964; Target y Mitsui, 1979;. Uriz *et al.*, 1991; Pesando y Caram, 1984; Welch, 1961). *Laurencia subopposita* es una especie que tiene una forma de crecimiento muy peculiar; no presenta órgano de fijación y habitualmente se encuentra adherida a otras algas o pastos marinos (Abbott y Hollenberg, 1976), por lo que es probable que necesite producir gran cantidad de metabolitos con actividad biológica para evitar el rechazo de sus

hospederos o que éstos permitan a *Laurencia* vivir en simbiosis con ellos sólo por la capacidad que tiene de producir este tipo de metabolitos.

Laminaria dentigera comunmente se distribuye en parches, en zonas de nivel bajo de marea, casi siempre cubierta por agua y expuesta a la energía del oleaje aunque ocasionalmente queda protegida por abundar en zonas relativamente profundas, su talo es moderadamente fibroso y se asocia con *Egregia* (Abbott y Hollenberg, 1976), que presentó muy poca actividad en el presente trabajo y *Macrocystis*, no reportada como productora de compuestos con actividad biológica. Esta asociación probablemente tenga un trasfondo simbiótico entre las tres especies: *Laminaria*, *Egregia* y *Macrocystis*

Por su parte, *Codium fragile* mostró una notable inhibición por extracción Soxhlet; no obstante, no presentó inhibición por los demás métodos, ésto tal vez atribuible a la naturaleza de los metabolitos y/o la estación del año, ya que, de acuerdo con Hornsey y Hide (1976a), esta macroalga presenta mayor actividad bactericida en primavera y menor en el período otoño-invierno, además, Lustigman y Brown (1991) encontraron que presentó inhibición sobre *Staphylococcus epidermidis* y la colecta la realizaron entre marzo y septiembre. Otras especies de *Codium* que han sido estudiadas son: *C.bursa* y *C.vermilara*, que presentan solo metabolitos con propiedades fungicidas (Ballesteros *et al.*, 1992), y *C.efosum* probada sin éxito como productora de metabolitos bactericidas (Caccamese *et al.*, 1980).

Dictyota flabellata inhibió el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* significativamente ($q = 6.257$, $q_{crit} = 4.17$, $OP \leq 0.05$), solo cuando fue sometida a extracción Soxhlet, y aunque muestra un alto promedio de inhibición al someterse a centrifugación, no es estadísticamente significativa, probablemente por la poca efectividad del método o la naturaleza de la macroalga.

Hornsey y Hide (1976a), analizaron varias muestras con variación estacional y encontraron que *Dictyota dichotoma* mostró inhibición significativa cuando la colecta se realizó en verano, y Ballesteros *et al.*, (1992), que trabajaron con la misma especie, encontraron que presenta propiedades fungicidas. Olesen *et al.*, (1964) reportan que 50% de los extractos obtenidos de *Dictyota indica* inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, lo que puede indicar que la temporada de colecta no fue la indicada para especie de macroalga con referencia al efecto buscado o tal vez *Dictyota* no produce metabolitos bactericidas y el efecto de la temperatura o la centrifugación modificó los compuestos químicos existentes.

Dictyota se distribuye en parches y abunda en zonas del nivel medio de marea donde ocasionalmente queda expuesta al bajar la marea y regularmente queda protegida de la energía del oleaje, dando lugar a la posibilidad de invasión por parte de microorganismos y por tal motivo, le es necesaria la fabricación de compuestos con actividad biológica; entonces, la inhibición poco significativa mostrada por los extractos

de *Dictyota* puede ser atribuída a la estación del año, al microorganismo usado en el bioensayo o a la metodología.

Los extractos de *Egregia laevigata* no mostraron lecturas con inhibición significativa sobre el crecimiento bacteriano, lo que puede indicar que los metabolitos presentes en el alga no se encuentran en cantidades considerables o los métodos de extracción utilizados no son los indicados para esta especie, aunque cabe hacer notar el hábitat de esta macroalga; ya que crece y se desarrolla en zonas con oleaje de alta energía y por lo tanto presenta un talo fibroso y resistente que como lo indican Uriz *et al.*, (1992), puede suplir a las defensas químicas de la misma.

Sargassum muticum, que en numerosas ocasiones se asocia con otras especies como *Laurencia subopposita* (Aguilar-Rosas y Machado-Galindo, 1990), fue la única especie que no presentó inhibición significativa, probablemente porque los metabolitos que presenta, muestran alguna actividad que no es bactericida; *S.hornschuchii* fue probado con éxito como fungicida (Ballesteros *et al.*, 1992) aunque habitualmente se encuentra con epibiosis (Uriz, 1991), por lo tanto es probable que los organismos simbiontes protejen químicamente a la macroalga. Otras especies probadas como bacteriricidas son: *Sargassum cymosum*, que no presenta actividad (Hodgson 1984) y *S. johnstonii*, que presenta actividad en dos fracciones, saponificable e insaponificable, aunque presenta actividad en ambas, ésta es mayor en la primera que en la segunda

(Padimi *et al.*, 1987). Además, esta especie presenta un talo excesivamente fibroso y se ha determinado que solamente la región apical o zonas juveniles del alga son responsables de la producción de antibióticos (Hayward, 1980, citado por Aguilar-Rosas y Machado-Galindo, 1990); en el presente trabajo, se utilizaron diferentes partes del talo, factor que pudo influir en la disminución de la cantidad de metabolitos con actividad bactericida.

5.- CONCLUSIONES:

- A).- El método de extracción Soxhlet presentó evidencias de ser el más efectivo con respecto a los demás métodos
- B).- El método de Centrifugación es el método menos efectivo en la extracción de metabolitos bactericidas.
- C).- *Laurencia subopposita* y *Laminaria dentigera*, mostraron mayores evidencias de efectividad como especies productoras de metabolitos bactericidas.
- D).- *Codium fragile* y *Dictyota flabellata* solo presentaron extractos con inhibición bacteriana significativa cuando se sometieron al método de extracción Soxhlet
- E).- *Sargassum muticum* y *Egregia laevigata*, fueron las únicas macroalgas que no presentaron ninguna lectura de inhibición estadísticamente significativa de crecimiento bacteriano.

6.- RECOMENDACIONES

- 1).- Se sugiere investigar con mayor profundidad a las macroalgas *Laurencia subopposita* y *Laminaria dentigera* como especies con potencialidad como productoras de compuestos químicos bactericidas.
- 2).- *Codium fragile* solo presentó extractos con inhibición altamente significativa cuando se sometió al método Soxhlet, por lo que se sugiere hacer un análisis del extracto en busca de los compuestos responsables de la actividad bactericidas.
- 3).- Es necesario someter a las macroalgas un análisis de variación estacional y determinar la época en la cual la producción de compuestos bactericidas es mas evidente o importante.

7.- BIBLIOGRAFIA:

Abbott I.A. and G.J. Hollenberg, (1976) "**Marine Algae of California**", Stanford University Press. Stanford California.

Aguilar-Rosas L.E., (1980) "**Algas bentónicas de la bahía de Todos Santos, Baja California**", Tesis de licenciatura, FCM, UABC, Ensenada Baja California, México.

Aguilar-Rosas R. and A. Machado-Galindo, (1990) "**Ecological aspects of (Fucales, Phaeophyta) in Baja California, México: reproductive phenology and epiphytes**" *Hydrobiologia* 204/205 pp. 185-190.

Allen M.B. and E.Y. Dawson, (1960) "**Production of antibacterial substances by benthic tropical marine algae**" *J. Bact.* Vol. 79 No 3, pp 459-460.

Andrew R.D., M.N. Targett, J.O. McConell and M.C. Young, (1989) "**Epibiosis of marine algae and Benthic Invertebrates; Natural Products Chemistry and overgrowth**" in: "*Bioorganic marine chemistry*" Vol. 3, pp. 85-114 Edit. Springer-Verlag Berlin Heidenberg.

Ballesteros E., D. Martín, and J. Uriz, (1992) "**Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes**" *Bot. Mar.* Vol. 35, pp 481-485.

Barreto-Estrada E., (1994) "**Evaluación del uso del alga *Sargassum muticum* (Yendo y Fensholt) como fertilizante en chicharo *Pisum sativum***" Tesis de maestría, UABC, Ensenada Baja California, México.

Baslow M.H., (1977) "**Marine pharmacology**", 1ra ed., Ed. Robert E. Krieger, N.Y., E.U.A.

Barrow K.D. (1983) "**Biosynthesis of marine metabolites**" in: "*Marine natural products*" Vol. 5 pp. 51-86. Academic press New York, E.U.A.

Braekman J.C. y D. Dalozé, (1983) "**Los medicamentos del mar**" *Mundo Científico* No.26, pp 138-147.

Burkholder P.R., L.M. Burkholder and L.R. Almodovar, (1961) "**Antibiotic activity of some marine algae of Puerto Rico**" *Bot. Mar.* Vol 2, pp 149-156.

Caccamese S., R. Azzolina, G. Furnari, M. Cormaci and y S. Grasso, (1980) **"Antimicrobial and antiviral activities of extracs from Mediterranean Algae"**, Bot. Mar. Vol. 23, pp 285-288.

Craige J.S. and D.E. Gruening, (1967) **"Bromophenols from red algae"**, Science Vol. 157, pp. 1058-1059.

Daniel-Harrel J. H., (1987) **"Estudio sobre el aprovechamiento y utilización del alga parda *Egrecia menziensis* (Turn) como fertilizante en la horticultura"**, Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UABC, Ensenada Baja California, México.

De Lara-Isassi G., F.A. Sobrino, R.C. Lozano, M.E. Ponce y E.K. Dreckman, (1989) **"Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de la costa de Michoacan, México"**, Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela Univ. Oriente, Vol. 28 (1 y 2) pp. 99-114.

Ehresmann D.W., E.F. Deig, M.T. Hatch, L.H. DiSalvo and N.A. Vedros, (1977) **"Antiviral substances from California marine algae"**, J.Phycol. 13, pp. 37-40.

Fenical William (1982) **"Natural products chemistry in the marine environment"** Science, vol. 215, No. 4535, pp.923-927.

González-López J., (1979) **"Ficoflora litoral de la región de Ensenada Baja California"** Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, UNAM, México D.F.

Gonzalez-Trejo I.A., (1990) **"Aislamiento y caracterización del esteroide sargasterol presente en *Sargassum muticum* (Yendo y Fensholt) y su determinación como agente hipocolesterolémico en conejos"**, Tesis de licenciatura, F.C.M. UABC, Ensenada Baja California, México.

Hashimoto Y., (1979) **"Marine toxins and other bioactive metabolites"**, 1st edition, Japan Science Societies, Tokio, Japan.

Hodgson L.M., (1984) **"Antimicrobial and antineoplastic activity in some South Florida seaweeds"**, Bot. Mar. Vol. 27., pp 387-390.

Hornsey I.S. and D. Hide, (1974) **"The production of antimicrobial compounds by British marine algae. I antibiotic-producing marine algae"**, Britis. Phycol. J., Vol 9, pp. 353-361.

Hornsey I.S. and D. Hide, (1976a) **"The production of antimicrobial compounds by British marine algae. II Seasonal variation in production of antibiotics"**, Britis. Phycol. J., Vol 11, pp. 63-67.

Hornsey I.S. and D. Hide, (1976b) **"The production of antimicrobial compounds by British marine algae. III Distribution of antimicrobial activity within the algal tallus"**, Britis. Phycol.J., Vol 11, pp. 175-181.

Kamat S.Y., S. Wahidulla, L. D'Souza, C.G. Naik, V. Ambiyee, D.S. Bhakuni, A.K. Goel and H.S. Garg, (1992) **"Antiviral evaluation of marine algal from the Indian Coast"**, Bot. Mar., Vol. 35, pp. 161-164.

Konig G.M. and A.D. Wright, (1994) **"Extensive 1D and 2D NMR and X-ray studies of diterpenes isolated from the marine alga Dictyota pardalis f.pseudohamata"**, J. Nat. Prod. Vol. 57 pp. 1529-1538.

Lehninger A.L., (1989) **"Bioquímica"**, 2da ed., 13ra reimpression, ediciones OMEGA, Barcelona, España.

Lodeiros C.J.M., E. Fernandez, A. Velez y J. Bastardo, (1988) **"Producción de antibioticos por bacterias y su utilización en acuicultura"**, Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente Vol 27 (1 y 2) pp. 63-69.

Lustigman B. and C. Brown, (1991) **"Antibiotic production by marine algae, isolated from the New York/New Jersey coast"**, Bull. Enviroment. Contam. Toxicol., Vol. 46, pp. 329-335.

Martin J.D. and J. Darias, (1978) **"Algal sesquiterpenoids"**, in "Marine natural products", Vol. 1 pp. 125-173. Academic press, New York, E.U.A.

Munro M.H.G., R.T. Luibrand and J.W. Blunt, (1987) **"The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms"**, in "Bioorganic marine chemistry", Vol. 1, pp. 75-176, Edit. Springer-Verlag, Berlin Heidenberg.

Olesen P. E., A. Maretzki and L.A. Almodovar, (1964) **"An investigation of antimicrobial substances from marine algae"**, Bot. Mar. Vol. 6, pp 224-232.

Paul V.J. and W. Fenical, (1987) **"Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the phylum Chlorophyta"**, in "Bioorganic marine chemistry", Vol. 1, pp. 1-29, Edit. Springer-Verlag, Berlin Heidenberg.

Padimi S.R.P., R.P. Sreenivasa and S.M. Karmarkar, (1987) **"Comparative study of antibacterial activity of fractions of *Sargassum johnstonii*"**, Phykos : 26 : 119-122

Pesando D. and B. Caram, (1984) "Screening of marine algae from the French mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity", Bot. Mar. Vol. 27, pp 381-386.

Pushkar N.K., (1981) "Marine pharmacology: Drugs from the sea", Symposium presented at the 32nd Meeting of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Calgary, Alberta, Canada.

Rinehart K.L.Jr., J.B.Jr. Gloer, G.R. Wilson, R.G.Jr. Huges, H.L. Li, H.E. Renis and J.P. McGrovren, (1983) "Antiviral and antitumor compounds from tunicates", in: "Marine pharmacology: Drugs from the sea" Eds., Fed. Proc. Vol., 42 (1) pp. 87-90.

Rios J.L., M.C. Recio and A. Villar, (1988) "Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature", J. Ethnopharmacology, 23; pp 127-149.

Secretaria de marina, (1974) "Estudio geográfico de la región de Ensenada", Dirección General de Oceanografía y Se alamiento Marítimo, Ensenada B.C., México.

Siegel S., (1986) "Estadística no paramétrica", Editorial trillas, 10 ma. impresión, México D.F.

Sokol R.R. y F.J. Rohlf, (1979) "Biometría", Ed. H. Blume, 1ra Ed. España, Madrid, España.

Targett N.M. and J.E. Word, (1991) "Bioactive microalgal metabolites; mediation of ecological interactions in phytophagous suspension-feeding marine invertebrates", in: "Bioorganic marine chemistry" Eds., Vol. 4, pp. 91-118, Edit. Springer-Verlag, Berlin Heidenberg.

Targett N.M. and A. Mitsui, (1979) "Toxicity of tropical marine algae using fish mortality and blood cell hemolysis for bioassays", J. Phycol. 15 : 181-185

Tringali C., G. Oriente, M. Piattelli and G. Nicolosi, (1984) "Structure and conformation of two new dolabellane-based diterpenes from *Dictyota sp.*", J. Nat. Prod. Vol. 47, pp. 615-619.

Tringali C., G. Oriente, M. Piattelli and G. Nicolosi, (1985) "Two minor dolabellane diterpenoid constituents from a *Dictyota* species", J. Nat. Prod. Vol. 48, pp. 484-485.

Tyler V.E., L.R. Brady and J.F. Robbers, (1988) "Pharmacognosy", 9na ed., Sea and Febiger, Philadelphia, E.U.A.

Uriz M.J., D. Martín, X. Turon, E. Ballesteros, R. Hugues, and C. Acebal, (1991) "**An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in editerran bentic comunities**", Mar. Ecol. Prog. Ser. Vol 70: 175-188.

Uriz M.J., D. Martín and D. Rosell, (1992) "**Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in mediterranean litoral sponges**" Mar. Biol. 113, pp. 287-297.

Welch A.M., (1962) "**Preliminary survey of fungistatic propieties of marine algae**", J. Bacteriol. Vol. 83, pp 97-99

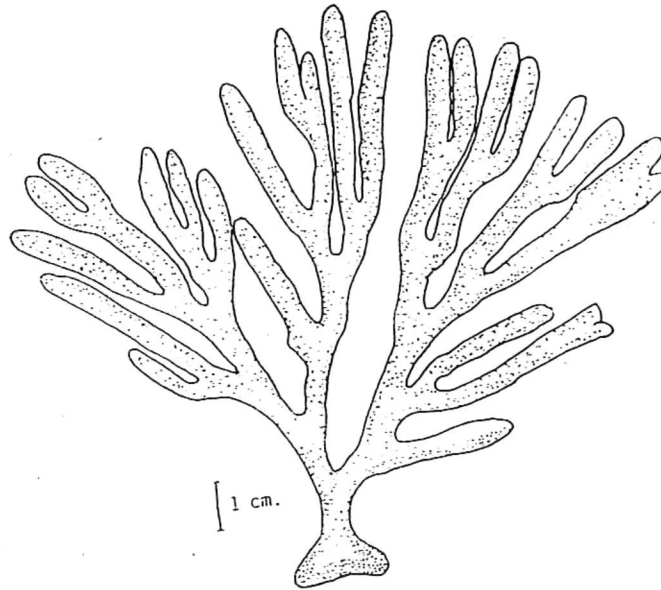
Williams B.L. y K. Wilson, (1981) "**Principios y técnicas de bioquímica experimental**", Editorial OMEGA. Barcelona España. 270 pp.

Zar J.H., (1984) "**Biostatistical Analysis**", 2nd. edition, Ed. OMEGA, USA. 718 pp.

ANEXOS

ANEXO I

Descripción de las macroalgas y su distribución en la bahía de Todos Santos
(fuentes: Abbott y Hollenberg, 1976., Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976)

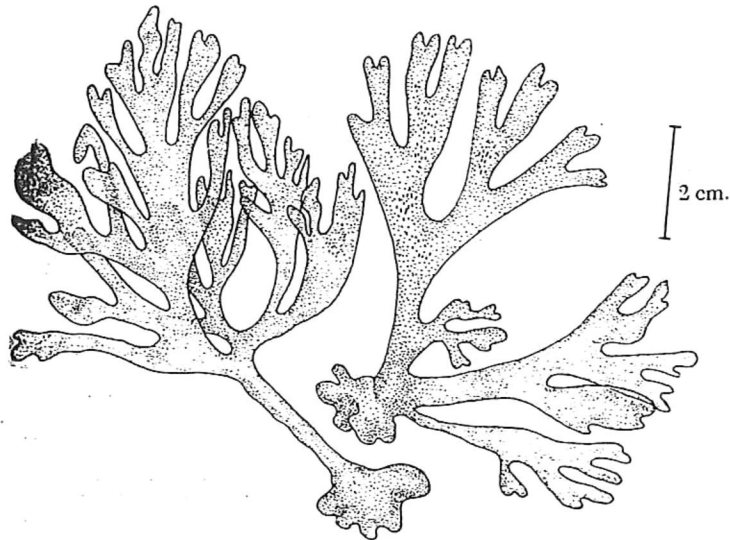


Codium fragile:

Descripción: Talo sifonáceo generalmente de 25 cm. de altura, erecto, color verde oscuro a veces cubierto con vellosidades blancas, las ramificaciones cilíndricas que parten de un disco basal, se ramifican dicotómicamente. Generalmente con dos gametangios en el mismo utrículo con desarrollo independiente; la pared del ápice del utrículo engrosado, en forma de espina. (Abbott y Hollenberg, 1976)

Habitat: Saxícola, abunda en el nivel medio y bajo de marea en áreas protegidas y expuestas al oleaje y se presenta protegido con respecto a su posición en la costa (Abbott y Hollenberg, 1976).

Distribución en la bahía: Faro de San Miguel, Villa de las Rosas, Punta Morro, Hotel Carioca, Punta Banda (Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976)..

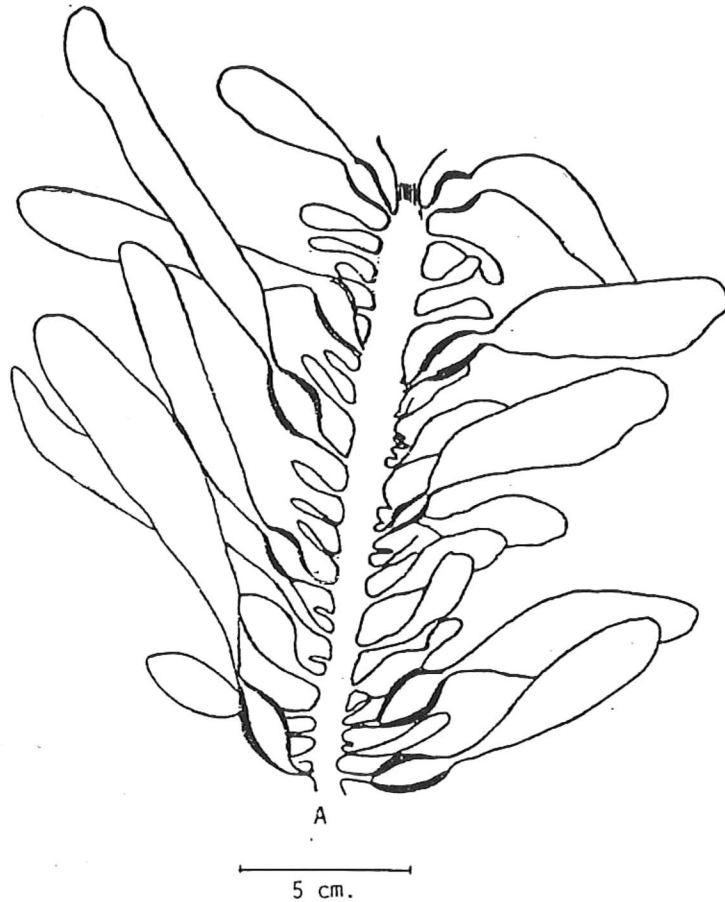


Dictyota flabellata:

Descripción: Talo de hasta 15 cm. de altura; color café amarillento en la parte superior y café oscuro en la parte inferior. Erecto y laminar con ramificación alterna, la dicotomía con crecimiento desigual. Los segmentos de 2 a 15 mm. de ancho; ápices redondeados. Esporangios, Oogonios y Anteridios en agregados (soros) en las dos caras de la lámina (Abbott y Hollenberg, 1976).

Habitat: Saxicola, abunda poco arriba del nivel medio de marea en áreas protegidas al oleaje y se presenta semiprotégida con respecto a su posición de la costa (Abbott y Hollenberg, 1976).

Distribución en la bahía: Villa de las Rosas, Punta Morro, Punta Banda (Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976).

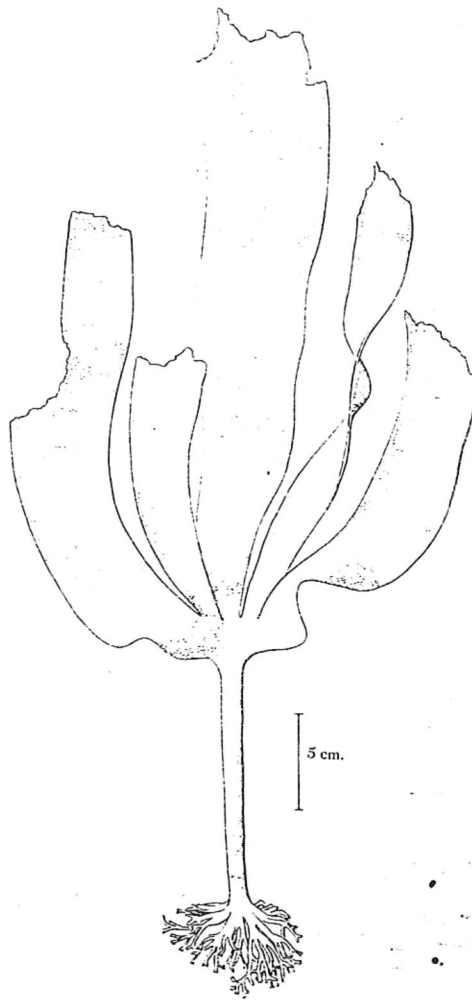


Egregia laevigata:

Descripción: Talo esporangial maduro de gran longitud (5 a 15 mts), con ramificaciones aplanadas desde un metro a partir de la base, cubierta densamente por hojas anchas dísticas; color café chocolate a verde oliva, organo de fijación de 25 cm de diametro. Estipe plano y parejo de 1 a 3.5 cm de ancho, con superficie moteada o densamente cubierto con tuberculos que varian desde cortos y romos hasta largos y espigados; hojas de 8 cm de longitud, filiformes, a veces con tuberculos en la superficie, particularmente cerca de la base; neumatocistos elipsoidales o subesfericos con o sin papilas (Abbott y Hollenberg, 1976).

Habitat: Saxicola, abunda desde el nivel medio bajo hasta poco arriba del nivel medio de marea en áreas expuestas al oleaje, se presenta expuesta con respecto a su posición en la costa o en zonas moderadamente expuestas, frecuentemente forma cinturones en la zona de entremareas, generalmente se mezcla con *Macrocystis* en aguas profundas (Abbott y Hollenberg, 1976).

Distribución en la bahía: Faro de San Miguel, Villa de las Rosas, Punta Morro, Tres hermanas y Cabo de Punta Banda (Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976).

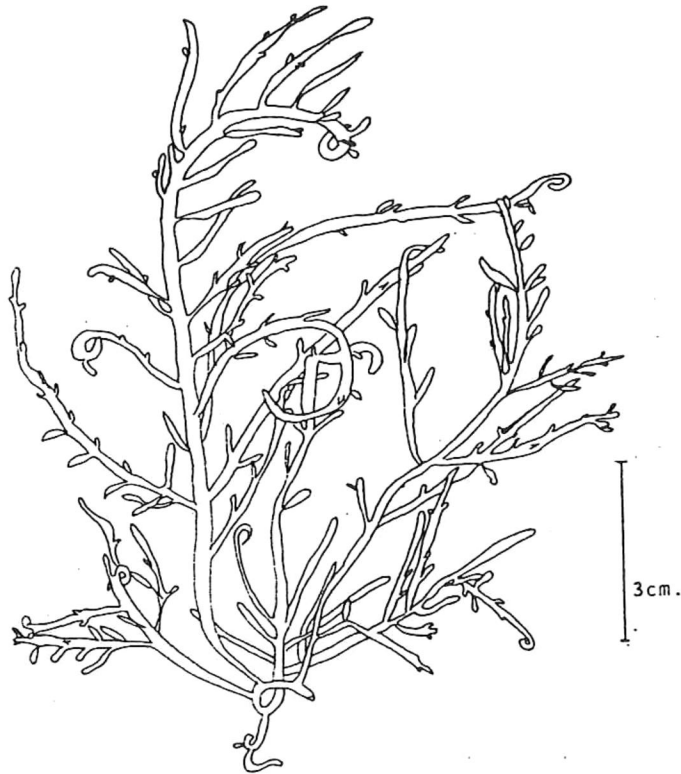


Laminaria dentigera:

Descripción: Talo de hasta 1.5 mts. de longitud, con un solo estipe por cada rizoide, el estipe de 3 cm. de diametro en la base, el cual se comprime cerca de las láminas; estas son lanceoladas u ovaladas de 12 a 16 cm. de ancho que se divide a partir del ápice en varias láminas lanceoladas; el estipe formado de anillos concentricos con ductos mucilaginosos (Abbott y Hollenberg, 1976).

Habitat: Saxicola, abunda en la parte superior del nivel medio hasta el nivel bajo de marea en areas semiprotegidas al oleaje. Talo expuesto con respecto a su posición en la costa en grupos (Abbott y Hollenberg, 1976).

Distribución en la bahía: Cabo de Punta Banda, Villa de las Rosas y Punta Banda (Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976).



Laurencia subopposita:

Descripción: Talo epifítico rojo rosado profundo, ramificaciones de 5 a 14 cm. de longitud, forman grandes masas globulares en aguas quietas; con soros tetrasporangiales en los márgenes (Abbott y Hollenberg, 1976).

Habitat: Abunda sobre algas rojas, pardas y pastos marinos de varios géneros entre el nivel bajo de marea en áreas expuestas al oleaje y se presenta expuesta con respecto a su posición en la costa (Abbott y Hollenberg, 1976).

Distribución en la bahía: Faro de San Miguel, Villa de las Rosas, Hotel Carioca (Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976).



Sargassum muticum:

Descripción: Talo de hasta 9 mts. de longitud; ramificaciones repetidas y alternas, las láminas lanceoladas en la porción basal del estipe a 10 cm. de distancia, las laminas a veces con denticulaciones, numerosos neumatocistos, solitarios o en las axilas de las láminas(Abbott y Hollenberg, 1976).

Habitat: Saxicola, abunda en el nivel medio y bajo de marea en areas tanto expuestas como protegidas al oleaje, se presenta expuesto con respecto a su posición en la costa (Abbott y Hollenberg, 1976).

Distribución en la bahía: Faro de San Miguel, Villa de Las Rosas, Punta Morro, Hotel Carioca, Rincón de Ballenas y Punta Banda (Aguilar-Rosas, 1980. y Gonzalez-López, 1976).

Anexo II. Lecturas de inhibición en mm para cada una de las macroalgas empleadas en los diferentes métodos de extracción y frente a los 2 organismos de prueba.

Tabla I. Lecturas de inhibición (mm) en el bioensayo sobre *Bacillus subtilis*

Macroalga	Método de Extracción	R é p l i c a s							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Codium fragile</i>	Soxhlet	4.425	4.150	5.500	6.000	7.500	8.000	7.500	5.000
	Agitación	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	Centrifugación	1.500	0.025	0.750	0.025	1.000	2.000	1.500	0.025
<i>Dictyota flabellata</i>	Soxhlet	4.500	4.250	5.250	5.000	5.000	4.750	3.500	4.500
	Agitación	0.775	0.550	0.575	0.800	0.775	0.825	1.000	1.250
	Centrifugación	5.750	2.500	3.500	6.250	4.500	4.500	4.000	4.000
<i>Egregia laevigata</i>	Soxhlet	3.500	3.000	0.750	2.500	0.500	2.000	2.750	4.000
	Agitación	1.250	0.825	0.925	0.800	0.325	0.550	0.025	0.450
	Centrifugación	2.000	1.500	1.500	2.000	2.750	2.500	2.750	1.250
<i>Laminaria dentigera</i>	Soxhlet	0.750	0.500	0.250	0.250	0.500	0.500	0.500	1.000
	Agitación	2.500	2.500	2.000	1.750	1.750	2.000	1.500	1.500
	Centrifugación	5.750	2.000	3.500	3.500	3.500	4.000	4.000	4.500
<i>Laurencia subopposita</i>	Soxhlet	5.500	6.500	5.250	5.000	4.500	3.500	0.025	6.000
	Agitación	4.800	3.550	2.175	3.525	3.350	3.500	2.975	3.575
	Centrifugación	3.500	3.500	1.750	1.250	1.000	3.000	3.500	2.500
<i>Sargassum muticum</i>	Soxhlet	1.500	0.750	1.000	0.750	1.000	2.000	1.000	4.000
	Agitación	0.775	0.475	0.450	0.300	0.225	0.250	0.525	0.625
	Centrifugación	1.750	0.500	1.750	2.000	0.025	0.025	1.000	0.500
Blanco	Soxhlet	3.300	2.425	2.900	2.300	4.100	2.750	1.875	2.325
	Agitación	2.000	1.000	1.400	0.025	1.100	0.700	0.550	1.100
	Centrifugación	0.025	0.475	0.025	0.750	2.200	1.850	0.025	0.025

Tabla II. Lecturas de inhibición (mm) en el bioensayo sobre *Staphylococcus epidermidis*.

Macroalga	Método de extracción	R é p l i c a s							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Codium fragile</i>	Soxhlet	4.000	5.000	4.500	3.500	0.025	4.000	4.500	3.500
	Agitación	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	Centrifugación	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.025	0.025
<i>Dictyota flabellata</i>	Soxhlet	2.225	2.500	2.000	3.250	1.500	0.025	0.025	1.500
	Agitación	1.500	1.550	1.875	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	Centrifugación	0.500	1.500	0.025	2.000	2.000	2.500	1.500	0.500
<i>Egregia laevigata</i>	Soxhlet	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	Agitación	1.225	0.025	0.025	0.750	1.150	1.500	0.025	0.025
	Centrifugación	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
<i>Laminaria dentigera</i>	Soxhlet	3.000	2.500	0.500	1.500	0.000	3.000	0.025	4.000
	Agitación	2.000	2.500	1.750	1.500	1.000	1.250	1.000	1.500
	Centrifugación	0.500	0.500	0.500	0.250	0.500	0.500	0.500	0.500
<i>Laurencia subopposita</i>	Soxhlet	3.500	5.000	3.500	3.000	0.025	1.000	0.025	3.000
	Agitación	3.425	2.600	3.150	3.125	3.750	4.000	4.650	2.975
	Centrifugación	1.000	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
<i>Sargassum muticum</i>	Soxhlet	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.025
	Agitación	1.000	1.000	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.650
	Centrifugación	0.000	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Blanco	Soxhlet	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	Agitación	0.000	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	Centrifugación	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

ANEXO III

Resultados de las pruebas estadísticas

Tabla III. Resultados de la prueba de normalidad de Karl Pearson

Rangos	m.c.	fo	p(x)	fe	ji ²
0.000 - 0.399	0.200	167	0.0886	29.770	632.598
0.400 - 0.799	0.600	23	0.1026	34.474	3.819
0.800 - 1.199	1.000	24	0.1119	37.598	4.918
1.200 - 1.599	1.400	9	0.1152	38.707	22.800
1.600 - 1.999	1.800	19	0.1058	35.549	7.704
2.000 - 2.399	2.200	16	0.0962	32.323	8.243
2.400 - 2.799	2.600	11	0.0751	25.234	8.029
2.800 - 3.199	3.000	22	0.0581	19.522	0.315
3.200 - 3.599	3.400	1	0.0388	13.037	11.114
3.600 - 3.999	3.800	13	0.0314	10.550	0.569
4.000 - 4.399	4.200	12	0.0084	2.822	29.843
4.400 - 4.799	4.600	6	0.0081	2.722	3.949
4.800 - 5.199	5.000	4	0.0038	1.277	5.808
5.200 - 5.599	5.400	2	0.0018	0.605	3.219
5.600 - 5.999	5.800	3	0.0007	0.235	32.501
6.000 - 6.399	6.200	1	0.0003	0.101	8.021
6.400 - 6.799	6.600	0	0.0001	0.034	0.034
6.800 - 7.199	7.000	2	0.0000	0.000	0.000
7.200 - 7.599	7.400	0	0.0000	0.000	0.000
7.600 - 8.000	7.800	1	0.0000	0.000	0.000
SUMATORIAS		336.0	0.847	284.558	783.481
MEDIA = 1.3533				ji ² _{crit.} =	27.587

m.c. = marca de clase.

fo = frecuencia observada.

fe = frecuencia esperada.

p(x) = probabilidad de ocurrencia de x

ji² = ji² calculada.

ji²_{crit.} = ji² critica.

Tabla IV. Resultados del análisis de varianza multifactorial no paramétrico por rangos de Kruskal-Wallis

ANALISIS DE VARIANZA NO-PARAMETRICO KRUSKAL-WALLIS (POR RANGOS)

FUENTE DE VARIANZA	SUMA DE CUADRADOS (SC)	GRADOS DE LIBERTAD (GL)	H CALCULADA (SC/MS)	ji ² critica (α = 0.05)
TOTAL	353,108	167		
OBSERVACIONES	259,909.8	20	109.85	31.41
FACTOR A (MET. DE EXT')	14,770	2	6.24	5.991
FACTOR B (MACROALGA)	131,412	6	55.54	12.592
INTERACCION (A X B)	113,727	12	48.07	21.026

Tabla V. Resultado de la comparación **Tukey** para los métodos de extracción.

COMPARACION	DIFERENCIA	SE	q	q _(0.05,∞,24)	decisión
Agitación – Soxhle	444	364	1.22	5.144	H ₀
Agitación – Centrifugación	1264	364	3.47	5.144	H ₀
Soxhlet - Centrifugación	820	364	2.25	5.144	H ₀

$$SE = \sqrt{([N(N+1)] / 12)}$$

donde;

$$N = 168, \quad q = \text{diferencia} / SE$$

$$q_{(0.05, \infty, 24)} = \text{valor crítico para 24 muestras con un } \alpha = 0.05$$

para

H₀ : No existe diferencia significativa entre las muestras comparadas

H₁ : Si existe diferencia significativa entre las muestras comparadas

Tabla VI. Resultado de la comparación **Tukey** para las macroalgas.

COMPARACION	DIFERENCIA	SE	q	q _(0.05,∞,7)	Decisión
L.s. – L.d.	12	238.24	0.05	4.17	H ₀
L.s. – D.f.	195.5	238.24	0.82	4.17	H ₀
L.s. – C.f.	871	238.24	3.65	4.17	H ₀
L.s. – E.l.	1080	238.24	4.53	4.17	H ₁
L.s. – S.m.	1508.5	238.24	6.33	4.17	H ₁
L.s. – Bco.	1771.5	238.24	7.43	4.17	H ₁
L.d. – D.f.	183.5	238.24	0.77	4.17	H ₀
L.d. – C.f.	859	238.24	3.6	4.17	H ₀
L.d. – E.l.	1068	238.24	4.48	4.17	H ₁
L.d. – S.m.	1496.5	238.24	6.28	4.17	H ₁
L.d. – Bco.	1759.5	238.24	7.38	4.17	H ₁
D.f. – C.f.	675.5	238.24	2.83	4.17	H ₀
D.f. – E.l.	884.5	238.24	3.71	4.17	H ₀
D.f. – S.m.	1313	238.24	5.51	4.17	H ₁
D.f. – Bco.	1576	238.24	6.61	4.17	H ₁
C.f. – E.l.	209	238.24	0.88	4.17	H ₀
C.f. – S.m.	637.5	238.24	2.67	4.17	H ₀
C.f. – Bco.	900.5	238.24	3.78	4.17	H ₀
E.l. – S.m.	428.5	238.24	1.798	4.17	H ₀
E.l. – Bco.	691.5	238.24	2.9	4.17	H ₀
S.m. – Bco.	263	238.24	1.1	4.17	H ₀

L.s. = *Laurencia subopposita*

L.d. = *Laminaria dentigera*

C.f. = *Codium fragile*

bco. = Blanco de disolvente

D.f. = *Dictyota flabellata*

E.l. = *Egregia laevigata*

S.m. = *Sargassum muticum*

$$SE = \sqrt{([N(N+1)] / 12)}$$

donde;

N = 168, q = diferencia / SE

q_(0.05,∞,7) = valor crítico para 7 muestras con un α = 0.05

para **H₀** : No existe diferencia significativa entre las muestras comparadas

H₁ : Si existe diferencia significativa entre las muestras comparadas

Tabla VII. Resultado de la comparación **Tukey** para los extractos por blanco de disolvente

COMPARACION	DIFERENCIA	SE	q	q _(0.05,∞,7)	Decisión
L.s.A. - bco.A.	789	137.6	5.734	4.17	H ₁
L.d.A. - bco.A.	583	137.6	4.237	4.17	H ₁
E.l.A. - bco.A.	287	137.6	2.086	4.17	H ₀
D.f.A. - bco.A.	260	137.6	1.889	4.17	H ₀
S.m.A. - bco.A.	212	137.6	1.541	4.17	H ₀
C.f.A. - bco.A.	50	137.6	0.363	4.17	H ₀
C.f.S. - bco.S.	1103	137.6	8.016	4.17	H ₁
L.s.S. - bco.S.	927	137.6	6.737	4.17	H ₁
D.f.S. - bco.S.	861	137.6	6.257	4.17	H ₁
L.d.S. - bco.S.	818	137.6	5.945	4.17	H ₁
E.l.S. - bco.S.	404	137.6	2.936	4.17	H ₀
S.m.S. - bco.S.	101	137.6	0.734	4.17	H ₀
D.f.C. - bco.C.	455	137.6	3.307	4.17	H ₀
L.d.C. - bco.C.	359	137.6	2.609	4.17	H ₀
L.s.C. - bco.C.	56	137.6	0.407	4.17	H ₀
E.l.C. - bco.C.	0	137.6	0	4.17	H ₀
S.m.C. - bco.C.	-50	137.6	-0.363	4.17	H ₀
C.f.C. - bco.C.	-252	137.6	-1.831	4.17	H ₀

L.s. = *Laurencia subopposita* D.f. = *Dictyota flabellata* L.d. = *Laminaria dentigera*
 E.l. = *Egregia laevigata* C.f. = *Codium fragile* bco. = Blanco de disolvente
 S.m. = *Sargassum muticum* A. = Agitación S. = Soxhlet C. = Centrifugación

$$SE = \sqrt{([N(N+1)] / 12)}$$

donde;

$$N = 167, \quad q = \text{diferencia} / SE$$

$$q_{(0.05, \infty, 7)} = \text{valor crítico para 7 muestras con un } \alpha = 0.05$$

para

H₀ : No existe diferencia significativa entre las muestras comparadas

H₁ : Si existe diferencia significativa entre las muestras comparadas