



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ESTUDIO COMPARATIVO TOXICOLÓGICO DE DIFERENTES ESPECIES
DE ALGAS MARINAS RECOLECTADAS EN SALINAS-ECUADOR,
MEDIANTE ARTEMIA SALINA Y CAENORHABDITIS ELEGANS N2.

CAMACHO CALLE PRISCILA PAOLA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

DIAZ ROMERO ANDREA DEL CISNE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Estudio comparativo toxicológico de diferentes especies de algas
marinas recolectadas en Salinas-Ecuador, mediante *Artemia salina* y
Caenorhabditis elegans N2.

CAMACHO CALLE PRISCILA PAOLA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

DIAZ ROMERO ANDREA DEL CISNE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

Estudio comparativo toxicológico de diferentes especies de algas marinas recolectadas
en Salinas-Ecuador, mediante *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans* N2.

CAMACHO CALLE PRISCILA PAOLA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

DIAZ ROMERO ANDREA DEL CISNE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

JARAMILLO JARAMILLO GLADYS CARMITA

MACHALA, 11 DE FEBRERO DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado Estudio comparativo toxicológico de diferentes especies de algas marinas recolectadas en Salinas-Ecuador, mediante *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans* N2., hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.

JARAMILLO JARAMILLO GLADYS CARMITA

0701575920

TUTOR - ESPECIALISTA 1

GONZALEZ CARRASCO VICTOR HUGO

0702323809

ESPECIALISTA 2

NÚÑEZ QUEZADA THAYANA

0702161068

ESPECIALISTA 3

Machala, 11 de febrero de 2019

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Estudio comparativo toxicológico de diferentes especies de algas marinas recolectadas en la playa de Salinas-Ecuador ANDREA DIAZ -PRISCILA CAMACHO.docx (D47121430)
Submitted: 1/22/2019 6:40:00 PM
Submitted By: cjaramillo@utmachala.edu.ec
Significance: 0 %

Sources included in the report:

Instances where selected sources appear:

0

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Las que suscriben, CAMACHO CALLE PRISCILA PAOLA y DIAZ ROMERO ANDREA DEL CISNE, en calidad de autoras del siguiente trabajo escrito titulado Estudio comparativo toxicológico de diferentes especies de algas marinas recolectadas en Salinas-Ecuador, mediante *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans* N2., otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Las autoras declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Las autoras como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 11 de febrero de 2019

CAMACHO CALLE PRISCILA PAOLA
0706182417

DIAZ ROMERO ANDREA DEL CISNE
2300276686

RESUMEN

La flora marina ha sido reconocida como fuente interesante de viables componentes bioactivos, especialmente en las algas marinas. Gracias a su biodiversidad es gran objeto de interés para la comunidad científica. La importancia que poseen las algas actualmente nos incentiva en la elaboración de esta investigación, siendo el objetivo principal evaluar la toxicidad de las diferentes especies de algas marinas (*Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi*), recolectadas en la playa de Salinas - Ecuador, mediante organismos modelos de *Artemia Salina* y *Caenorhabditis elegans* N2.

Las algas antes mencionadas fueron previamente lavadas con agua destilada y secadas en una estufa a temperatura de 40°C por 48 horas, luego se pulverizaron las muestras y se establecieron parámetros de calidad en cada una de las especies de algas marinas analizadas. En cuanto al parámetro fisicoquímico, ninguna de estas especies excedió el 14% de humedad, valor permitido según la farmacopea española 2da edición. En cuanto a cenizas totales los valores fueron muy altos por encima de los valores permitidos, esto se debe a la concentración de minerales presentes en cada una de las especies tal como lo mencionan Etcheverría y López (1982).

Por otro lado, en el control de calidad de los extractos, los valores de pH se encontraron en un rango que va desde ligeramente ácido a neutro. El porcentaje de °Brix reportó la presencia de azúcares reductores en las muestras de algas, datos que fueron confirmados en el tamizaje fitoquímico en donde se analizó la presencia de azúcares y otros metabolitos como alcaloides, cumarinas, saponinas, taninos, flavonoides. Se determinó además la concentración letal media CL50 de cada especie de algas marinas usando como bioindicadores nauplios de *Artemia salina* y nemátodos de *Caenorhabditis elegans* N2, ya que estos organismos son considerados ideales gracias a su grado de sensibilidad ante la presencia de toxinas. El porcentaje de mortalidad se analizó después de las primeras 24 horas de inicio del ensayo, en donde se observó el número de organismos muertos en cada una de las concentraciones preparadas (1000, 100, 10, 1 ppm). Con los datos obtenidos se realizaron los respectivos cálculos de mortalidad y concentración letal media, mediante el programa estadístico Probit, con límite de confianza del 95%. En el ensayo con *Artemia salina*, a cada una de las especies se las clasificó en relación a la toxicidad según las normas CYTED (1995).

Por ello las especies *Hypnea Spinella* y *Padina Pavónica* fueron categorizadas como moderadamente tóxicas porque se encontraron en un rango de 100 a 500ug/ml. Mientras que, las especies *Centroceras Clavulatum*, *Kappaphykus Alvarezii* y *Spatoglossum Schroederi* se consideraron ligeramente tóxicas porque su rango fue de 500 a 1000ug/ml. En el ensayo con *Caenorhabditis elegans* N2, las cinco especies de algas marinas fueron consideradas moderadamente tóxicas debido a que los valores se encontraron entre 100 a 500ug/ml. Culminado el ensayo de toxicidad, las cinco especies de algas marinas analizadas son consideradas como componentes bioactivos porque poseen valores de CL50 menores a 1000ug/ml. Este estudio que fue aplicado a las algas marinas sirve como punto de referencia para posteriores investigaciones considerando la presencia de componentes bioactivos que cada especie posee.

Palabras clave: Algas marinas, toxicidad, Ecuador, *Artemia Salina*, *Caenorhabditis elegans* N2.

ABSTRACT

Marine flora has been recognized as an interesting source of viable bioactive components, especially in marine algae. Thanks to its biodiversity, it is a great object of interest for the scientific community. The importance of algae currently encourages us in the development of this research, the main objective being to evaluate the toxicity of the different species of marine algae (*Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavonica*, *Spatoglossum Schröderi*), collected in the Salinas Beach - Ecuador, through model organisms of *Artemia Salina* and *Caenorhabditis elegans* N2.

The aforementioned algae were previously washed with distilled water and dried in an oven at a temperature of 40 ° C for 48 hours, then the samples were pulverized and quality parameters were established in each of the seaweed species analyzed. Regarding the physicochemical parameter, none of these species exceeded 14% humidity, value allowed according to the Spanish pharmacopoeia 2nd edition. In terms of total ash the values were very high above the allowed values, this is due to the concentration of minerals present in each of the species as mentioned by Etcheverria and López (1982).

On the other hand, in the quality control of the extracts, the pH values were found in a range that ranges from slightly acidic to neutral. The percentage of ° Brix reported the presence of reducing sugars in the samples of algae, data that were confirmed in the phytochemical screening where the presence of sugars and other metabolites such as alkaloids, coumarins, saponins, tannins, flavonoids were analyzed. In addition, the LC50 mean lethal concentration of each species of marine algae was determined using as nauplii of *Artemia salina* nauplii and *Caenorhabditis elegans* N2 nematodes, as these organisms are considered ideal due to their degree of sensitivity to the presence of toxins. The mortality percentage was analyzed after the first 24 hours of the start of the trial, where the number of dead organisms was observed in each of the prepared concentrations (1000, 100, 10, 1 ppm). With the data obtained, the respective mortality and median lethal concentration calculations were carried out using the Probit statistical program, with a 95% confidence limit. In the test with *Artemia salina*, each of the species was classified in relation to toxicity according to CYTED standards (1995).

Therefore, the *Hypnea Spinella* and *Padina Pavónica* species were categorized as moderately toxic because they were found in a range of 100 to 500 ug / ml. Meanwhile, the species *Centroceras Clavulatum*, *Kappaphykus Alvarezii* and *Spatoglossum Schroederi* were considered slightly toxic because their range was from 500 to 1000 ug / ml. In the *Caenorhabditis elegans* N2 assay, the five species of marine algae were considered moderately toxic because the values were between 100 to 500 ug / ml. After the toxicity test, the five species of seaweed analyzed are considered as bioactive components because they have LC50 values lower than 1000 ug / ml. This study, which was applied to marine algae, serves as a point of reference for further research considering the presence of bioactive components that each species possesses.

Key words: Marine algae, Toxicity, Ecuador, *Artemia saline*, *Caenorhabditis elegans* N2.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	6
PROBLEMA.....	7
1.1 Definición y delimitación del problema.....	7
1.2 Planteamiento del Problema.....	7
1.2.1 <i>Problema general.</i>	7
1.2.2 <i>Problemas específicos.</i>	7
1.3 Objetivos	8
1.3.1 Objetivo General.....	8
1.3.2 Objetivos Específicos	8
1.4 Hipótesis.....	8
1.5 Variables dependientes e independientes.....	9
1.5.1 Variable Independiente	9
1.5.2 Variable dependiente	9
CAPITULO II.....	10
2 MARCO TEÓRICO	10
2.1 Antecedentes	10
2.2 Especies de Algas Marinas.....	11
2.2.1 <i>Centroceras Clavulatum</i>	11
2.2.2 <i>Hypnea Spinella</i>	12
2.2.3 <i>Kappaphykus Alvarezii</i>	13
2.2.4 <i>Padina Pavónica</i>	14
2.2.5 <i>Spatoglossum Schröderi</i>	15
2.3 Métodos de extracción	15

2.3.1	<i>Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)</i>	15
2.3.2	<i>Condensación por rotovaporación del Solvente</i>	15
2.4	Modelos experimentales usados en el Bioensayo	16
2.4.1	<i>Artemia Salina</i>	16
2.4.2	<i>Caenorhabditis elegans N2</i>	17
CAPITULO III.....		19
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1	Materiales	19
3.1.1	Materiales de laboratorio	19
3.1.2	Otros materiales.	20
3.1.3	Equipos	20
3.1.4	Sustancias.....	20
3.1.5	Reactivos.....	21
3.1.6	Material biológico.....	21
3.2	MÉTODOS	22
3.2.1	Localización de la Investigación.....	22
3.3	Universo de trabajo.	22
3.4	Tipo de muestra.....	22
3.4.1	Tipo de Investigación.....	22
3.4.2	Selección de la Muestra.	22
3.4.3	Procesamiento del material vegetal	22
3.5	Contenido de Humedad Residual.....	23
3.5.1	Método Gravimétrico.....	23
3.6	Cenizas totales.....	23
3.7	Obtención del Extracto.....	24
3.8	Análisis Físico-Químico.....	24
3.8.1	pH.....	24

3.8.2	°Brix.....	24
3.8.3	Índice de Refracción.....	24
3.9	Tamizaje Fitoquímico.....	24
3.9.1	Ensayos en extracto acuoso y extracto metanólico.....	25
3.10	Actividad tóxica o letal.....	27
3.10.1	Organismos modelos utilizados como bioindicadores.....	27
3.10.1.1.4	Ensayo de letalidad ⁵⁹⁻⁶¹	28
CAPITULO IV.....		29
4	RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
4.1	Parámetros de calidad.....	29
4.2	Tamizaje Fitoquímico.....	32
4.1	Bioensayos de mortalidad con organismos modelos.....	33
CAPITULO IV.....		37
CONCLUSIONES.....		37
CAPITULO V.....		38
RECOMENDACIONES.....		38
BIBLIOGRAFIA.....		39
ANEXOS.....		48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Centroceras Clavulatum.....	11
Tabla 2 Hypnea Spinella.....	12
Tabla 3 Kappaphykus Alvarezii.....	13
Tabla 4 Padina Pavónica.....	14
Tabla 5 Spatoglossum Schröderi.....	15
Tabla 6 Parámetros fisicoquímicos de la droga seca	29
Tabla 7 Parámetros de calidad de los extractos acuosos y metanólicos	30
Tabla 8 Tamizaje fitoquímico.....	32
Tabla 9 Ensayo de mortalidad con Artemia salina	33
Tabla 10 Ensayo de mortalidad con Caenorhabditis elegans N2.....	35
Tabla 11 Cuadro comparativo de resultados de toxicidad CL50 (ug/ml).....	36

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Ciclo de vida de Artemia Salina.....	17
Ilustración 2 Ciclo de vida de Caenorhabditis elegans.	18
Ilustración 3 Proceso para obtener las muestras de algas.....	48
Ilustración 4 Parámetros de calidad realizados a las muestras de algas.....	48
Ilustración 5 Preparación del extracto seco.....	49
Ilustración 6 Tamizaje fitoquímico a las muestras de algas marinas	49
Ilustración 7 Obtención de nauplios de Artemia Salina.....	50
Ilustración 8 Preparación de la solución madre	50
Ilustración 9 Ensayo con el nemátodo Caenorhabditis elegans N2	51

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas son organismos que poseen estructuras simples, pero con tejidos complejos, por lo que son denominados talofitas¹. Son elementos biológicamente importantes de los sistemas marinos mundiales para el funcionamiento de los ecosistemas, la acuicultura y las industrias intermedias². Gracias a la composición química que poseen las algas con capaces de sobrevivir a climas extremos, ofreciendo una gran cantidad de metabolitos únicos. Debido a esto se identifican como una fuente atractiva de amplias posibilidades para elaborar compuestos farmacéuticos bioactivos³. Durante siglos las áreas costeras han recolectado gran variedad de especies de algas marinas, esto se debe a sus beneficios nutricionales y para la salud. Entre los usos tradicionales que se les ha atribuido a las algas marinas incluye medicina, alimento, insumos en procesos industriales, fertilizantes y biocombustible⁴.

Existen muchos beneficios de los extractos de algas porque contienen sustancias bioactivas que poseen actividad antitumoral y antioxidante, entre otras. Por este motivo, la propuesta de realizar un estudio comparativo con cinco especies de algas marinas recolectadas en la playa de Salinas-Ecuador se basa en la evaluación de concentración letal media (CL50) en organismos menos complejos como *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans N2*, usándose para un monitoreo sencillo y rápido durante el fraccionamiento de extractos.

PROBLEMA

1.1 Definición y delimitación del problema

En el perfil costero del Ecuador, se encuentra gran biodiversidad de especies, especialmente en la flora marina, sobresaliendo la variedad de algas marinas, siendo empleadas por los moradores de esta zona, proporcionándoles diversos usos, entre los principales son: alimento, forraje, cosmética y fertilizante. La contaminación marina existente altera los nutrientes y minerales provenientes en las especies de algas que habitan en la playa de Salinas. Estas sustancias tóxicas son absorbidas por las algas, razón por la cual se conocerá el grado de toxicidad de cada una de las especies analizadas mediante diferentes concentraciones.

1.2 Planteamiento del Problema

1.2.1 Problema general.

¿Cuál es la actividad tóxica que presentan los organismos modelos expuestos a los diferentes extractos de las cinco especies de algas marinas?

1.2.2 Problemas específicos.

¿Existe relación entre las características fisicoquímicas de cada especie de algas marinas?

¿Cómo interviene la actividad tóxica de las especies de algas en los bioindicadores utilizados?

¿Qué especies de algas marinas estudiadas tiene los niveles de Cl50 altos?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General.

- Evaluar la toxicidad de las diferentes especies de algas marinas (*Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi*), recolectadas en la playa de Salinas-Ecuador, mediante organismos modelos de *Artemia Salina* y *Caenorhabditis elegans N2*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la caracterización fisicoquímica de las cinco especies de algas marinas recolectadas en la playa de Salinas, Ecuador.
- Establecer actividad tóxica de cinco algas marinas (*Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi*.) a través de bioensayos, usando como indicadores *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans N2*.
- Analizar los valores de CL50 en los extractos de *Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi*.

1.4 Hipótesis

La concentración letal media CL50 de los extractos metanólicos extraídos de las cinco especies de algas marinas *Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica* y *Spatoglossum Schröderi*, recolectadas en la playa de Salinas provincia de Santa Elena presentan actividad tóxica al ser expuestos a organismos modelos como *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans N2*.

1.5 Variables dependientes e independientes

1.5.1 Variable Independiente

- Características físicas y químicas de los extractos de las diferentes especies de algas marinas.

1.5.2 Variable dependiente

- Metabolitos presentes en los extractos de las diferentes especies de algas marinas.
- Mortalidad (CL50) de los organismos modelos estudiados *Artemia salina* y *Caenorhabditis elegans* N2.

CAPITULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

En el océano encontramos una gran diversidad de fauna marina que nos proporciona una amplia gama de bienes y servicios de esencial importancia para la humanidad, así como para los animales que habitan en el medio. Se obtiene alimentos esenciales que son parte de nuestra nutrición, productos biológicos con fines medicinales, manejo de residuos entre otras actividades turísticas. La mayor parte se enfoca en los riesgos que puede causar la contaminación, las proliferaciones de algas y organismos externos⁵. Las macroalgas generalmente no son tóxicas, pero pueden causar importantes impactos en el sistema, como la destrucción del hábitat, el agotamiento de oxígeno y las alteraciones del ciclo de nutrientes, reduciendo así la biodiversidad⁶.

Las algas marinas vienen usándose principalmente como alimento para los seres humanos y animales. así mismo en el uso de la medicina. Se extraen metabolitos espesantes tales como: agar, alginato y carragenina. Estas propiedades que se les brinda mayor interés a su valor nutricional en la actualidad por el gran aporte de vitaminas naturales, proteínas vegetales, minerales⁷.


Muchas especies de algas marinas dependen de etapas microscópicas para sobrevivir a periodos de estrés ambiental y producen nuevas etapas macroscópicas cuando las condiciones mejoran². La literatura menciona que las algas son ricas en polisacáridos sulfatados donde se incluye: galactanos, fucoidanos, glicosaminoglicanos, glucanos y heteropolicáridos. Los carragenanos y agaranos son tipos de galactanos sulfatados que se extrae principalmente de algas rojas, y su interés es en el uso alimenticio y farmacéutico como agentes texturantes, estabilizantes⁸.

Es innumerable la biodiversidad existente de flora marina que nos proporciona nuestro Ecuador, se ha fundamentado parámetros que permitan reconocer a las más comunes, mismas que serán tomadas para investigaciones futuras^{7, 8}.

2.2 Especies de Algas Marinas

2.2.1 *Centroceras Clavulatum*

Tabla 1 *Centroceras Clavulatum*

	Reino: Plantae
	Clase: Florideophyceae
	Orden: Ceramiales
	Familia: Ceramiaceae
	Género: Centroceras

Fuente: Algaebase- *Centroceras Clavulatum*⁹.


Es una especie tropical que crece en rocas calizas, se halla en los mares cálidos: Atlántico, Indico y Pacífico, además en el Mediterráneo Occidental, así como en las costas atlánticas de Marruecos y Canarias¹⁰. Esta especie tolera exposición al fuerte oleaje y a la desecación y son comunes en estos sitios¹¹.

Se considera una especie cosmopolita. Las plantas crecen en densos tufos. Los filamentos se ramifican y miden entre 120 – 180um de diámetro, la corteza se encuentra constituida por células pequeñas rectangulares de 14 x 17um, formando corridas longitudinales. Los nodos poseen verticilos en forma de espinas compuesta de sus células¹².

Se caracteriza por tener espinas en forma de gancho dispuestas en una espiral y columna vertebral. Se lo usa para el cuidado de la salud, en la cosmética, como talasoterapia y medicina popular. Además, proporciona actividad biológica, médica y farmacológica y se utiliza como laxante^{5,12}.

2.2.2 *Hypnea Spinella*

Tabla 2 *Hypnea Spinella*

	Reino: Plantae
	Clase: Florideophyceae
	Orden: Gigartinales
	Familia: Cystocloniaceae
	Género: Hypnea

Fuente: AlgaeBase. *Hypnea Spinella*¹³

El género *Hypnea* se localiza en el mediterráneo, se encontró por primera vez en la isla Simi en Grecia en el año de 1926, su uso es comestible y medicinal¹³. Crece en aguas tranquilas aunque raramente se las puede encontrar en zonas rocosas, de esta especie se extrae carragenina y el uso principal que brinda es para el cuidado personal, además de usarse como alimento¹⁴.


Esta especie es rica en polisacáridos, se usa el agar y la carragenina como agentes gelificantes, espesantes y de texturización, poseen actividad anticancerígena y antitumorales. Además ha ganado gran interés en la producción de metabolitos con propiedades antimicrobianas y antifúngicas, lo cual es de gran importancia en la industria farmacéutica¹⁵.

Es un alga filamentosa con aspecto enredado y normalmente de dimensión pequeño aproximadamente de 1 a 3cm, con un color rojo brillante a carmesí. Tienen especialmente bifurcaciones irregulares, con pequeñas proliferaciones con aspecto espinoso¹⁶.

Formada por una estructura interna con dimensiones de 25-40um y de 4 a 6 células periaxiales más grandes de 100 a 320um rodeadas por una doble capa de células corticales 7,5-25um, se pueden encontrar en zonas intermareal, creando marañas en las rocas sobre las demás algas¹⁶.

2.2.3 Kappaphykus Alvarezii

Tabla 3 Kappaphykus Alvarezii

	Reino: Plantae
	Clase: Florideophyceae
	Orden: Gigartinales Schmitz
	Familia: Solieriaceae
	Género: <i>Kappaphykus</i>

Fuente: AlgaeBase-Kappaphykus Alvarezii¹⁷.

Esta especie es originaria de Filipinas, el cultivo comenzó en el año 1967 y se volvió viable en el año 1974, posteriormente ingresó con éxito a 19 países aproximadamente. Es una planta espinosa y tupida que se compone de numerosas ramas redondas y es abundante en los arrecifes de coral donde la profundidad es escasa. Se considera una de las algas rojas con mayor importancia económica, además esta especie se considera exótica¹⁸.


Su cultivo es con fines comerciales ya que contribuye con el 80% de la producción de carragenina mundial⁴. A nivel de la industria alimentaria se usa como agente emulsionante, gelificante y espesante, además de productos farmacéuticos y nutracéuticos¹⁹.

Algunos investigadores señalan que los datos disponibles no son suficientes para considerar a esta especie dañina motivo por el cual genera su inducción. Se sugiere que hasta puede proteger la diversidad biológica de forma indirecta al evitar que los nativos sobreexploten los recursos naturales al tener una fuente de ingresos seguros. Entre las características que presentan las algas promoviendo que colonicen exitosamente nuevos ambientes tenemos su plasticidad fenotípica, elevadas tasas de crecimiento. producción de compuestos halogenados que reducen su consumo por los herbívoros y capacidad de coalescencia permitiendo que las algas no fijadas se establezcan sobre el sustrato²⁰.

La habilidad para sintetizar cualquier cantidad de metabolitos secundarios que puedan repeler o atraer otros organismos ha evolucionado como una estrategia para sobrevivir ante los seres vivos. El derivado de las algas es muy escaso, a pesar de que ellas conforman una rica fuente de moléculas bioactivas resultando ser diferentes a las obtenidas de plantas terrestres²¹.

2.2.4 *Padina Pavónica*

Tabla 4 *Padina Pavónica*

	Reino: Chromista
	Clase: Phaeophyceae
	Orden: Dictyotales
	Familia: Dictyotaceae
	Género: <i>Padina Pavónica</i>

Fuente: CLUB DÍMMERSIÓ BIOLOGIA- *Padina Pavónica* ²².

Esta especie es el único miembro calcificado de algas marrones, conocida como cola de pavo real, en la parte superior tiene forma de abanico. Es de color verde pardo y viven sobre rocas y lugares soleados poco protegidos²². En países Asiáticos esta especie se consume principalmente como alimento y se considera como importante fuente productora de calcio, están presentes en el océano Atlántico y el mar Mediterráneo²¹. El talo del alga es de color café, formando grupos en forma de abanico. Tamaño de unos 15 cm. Cada cuchilla está calcificada con carbonato cálcico dándole textura rígida y el color blanquecino¹².

Esta especie de algas se reproducen en época de verano. Hay algunos individuos que se agrupan a partir de un estolón²³. Esta especie es rica en carbohidratos, lípidos, vitaminas y sales minerales, además es conocida por su ligera bioactividad contra patógenos microbianos²⁴.

Las algas producen un amplio espectro de sustancias con actividad biológica como: antiinflamatorios, antiviral, antioxidantes, anticoagulante y anticancerígeno²⁵. Los fucoidanos son polisacáridos biológicamente activos en algas pardas con diferentes características estructurales. Se ha demostrado que esta especie produce heteropolisacáridos que consisten en ácido D-glucurónico, L-fucosa, D-manosa, D-glucosa y D-galactosa²⁶.

2.2.5 *Spatoglossum Schröderi*.

Tabla 5 Spatoglossum Schröderi

	Reino: Chromista
	Clase: Phaeophyceae
	Orden: Dictyotales
	Familia: Dictyotaceae
	Género: Spatoglossum

Fuente: CLUB D 'IMMERSIÓ BIOLOGIA- *Spatoglossum Schröderi* ²⁷.

Son plantas foliáceas de color marrón esmeraldas, poseen talos formados por diferentes fracciones en forma de tiras largas. Tiene pelos pluricelulares elaborando tufos en mínimas depresiones¹.

Esta especie se encuentra comúnmente en el Atlántico, Caribe y algunas zonas del Pacífico; posee talos aplanados, crece en lugares donde hay poco oleaje y no es recomendada como fuente de alimento debido a su alto contenido de compuestos antioxidantes (fucanos). Muchos de los fucanos tienen actividades antiproliferativas contra diferentes tipos de células²⁸, esta especie además contiene tres fracciones de polisacáridos sulfatados^{29,30}.

2.3 Métodos de extracción

2.3.1 *Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)*

Este método usa sonidos de alta frecuencia, con el fin de separar los componentes de la materia vegetal. Este proceso se genera porque las partículas vibran provocando que se acelere el proceso de extracción de los metabolitos deseados. Este método es el más usado en el área del laboratorio para extracción de metabolitos, ya que es económica y eficiente, no requiere espacios amplios para realizar su función, además no se pierde reactivo y se logra obtener mejor concentración de metabolitos³¹.

2.3.2 *Condensación por rotovaporación del Solvente*

La condensación por rotovaporación se la utiliza mediante disolventes orgánicos para la asimilación o extracción del analito de interés a partir de la matriz de la muestra. Existe riesgos de pérdida de analito puede ser durante la etapa de la concentración, ya que la

rápida ebullición al momento de la concentración por salpicaduras, evaporación de los analitos que sean más volátiles, degradación u oxidación de compuestos con inestabilidad. Para la concentración del extracto se realiza mediante la evaporación en una campana de gases sin operación externa, para luego realizar una reducción de volumen mediante el rotovaporador³².

2.4 Modelos experimentales usados en el Bioensayo

2.4.1 *Artemia Salina*

Es conocida también como camarón de salmuera. Son crustáceos ramificados que se desarrollan muy bien en condiciones de salinidad donde el principal componente es NaCl. Sin embargo, existen diferentes especies que están adaptadas en ambientes ricos en sulfatos, carbonatos o potasio que se distribuyen en toda la tierra³³. Desempeña un papel importante en la cadena alimentaria y es considerado un método útil para la evaluación de toxicidad a través de la concentración letal media (CL50), este crustáceo se lo utiliza mucho gracias a su fácil biodisponibilidad^{34,35}.

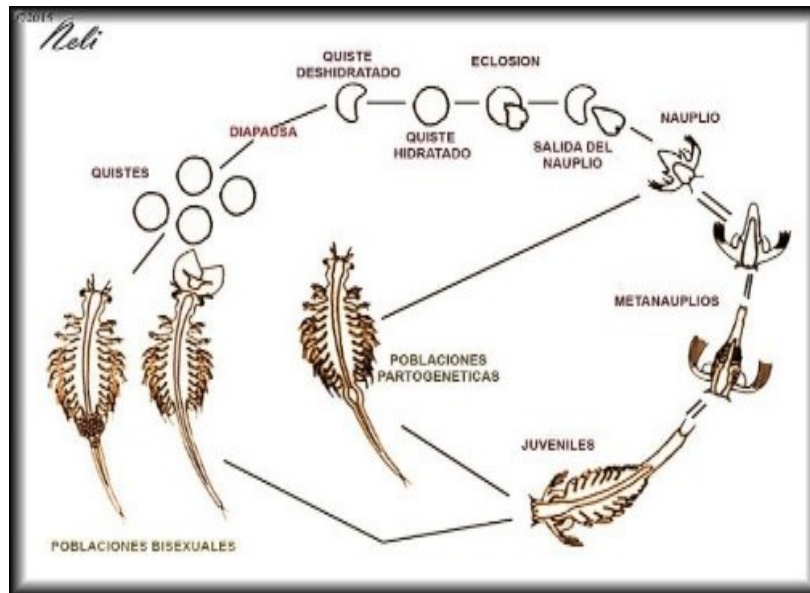
2.4.1.1 Biología de *Artemia Salina*

La *Artemia Salina* posee un cuerpo dotado por una segmentación uniforme, su desarrollo de apéndices de tipo filopoidal aplanados se encuentran a lo largo del cuerpo principal, tienen rasgos muy particulares destacándose una la cabeza que está formada por cinco segmentos fusionados, donde se observa los ojos compuestos y un ocelo frontal entre ellos, las antenas secundarias y las antenas verdaderas^{36,37}. Su tórax está constituido por 11 segmentos, dotados por un par de apéndices foliáceos aplanados, llamados torocopodos, abdomen constituido por 8 segmentos apodos, los dos primeros son los genitales y el último telson, provisto de la furca caudal^{38,36}.

El ciclo de vida de la *Artemia* aproximadamente dura de 14 a 17 días, aunque pueden haber ciclos más cortos hasta 9 días, todo depende de los factores ambientales, físico-químicos, tipo de alimentación o densidad poblacional, el desarrollo de una progenie desde la fase de oocito dura entre 4 a 6 días, los quistes de *Artemia*, son embriones en estado de blástula o gástrula incipiente protegido por el corion, una pared externa gruesa y resistente, el diámetro varía entre 200 y 270µm lo cual al mantener una buena

oxigenación y condiciones ambientales y físico-químicas necesarios pueden eclosionar los quistes deshidratados lo cual puede durar de 1 a 2 días^{37,38}.

Ilustración 1 Ciclo de vida de *Artemia Salina*^{21,35,36,40}.



2.4.2 *Caenorhabditis elegans* N2

Caenorhabditis elegans N2 es una especie de nemátodo hermafrodita autofertilizante de vida libre, que en la naturaleza coloniza hábitats ricos en microorganismos, como son las plantas y frutas en descomposición de muchos lugares del mundo⁴⁴.

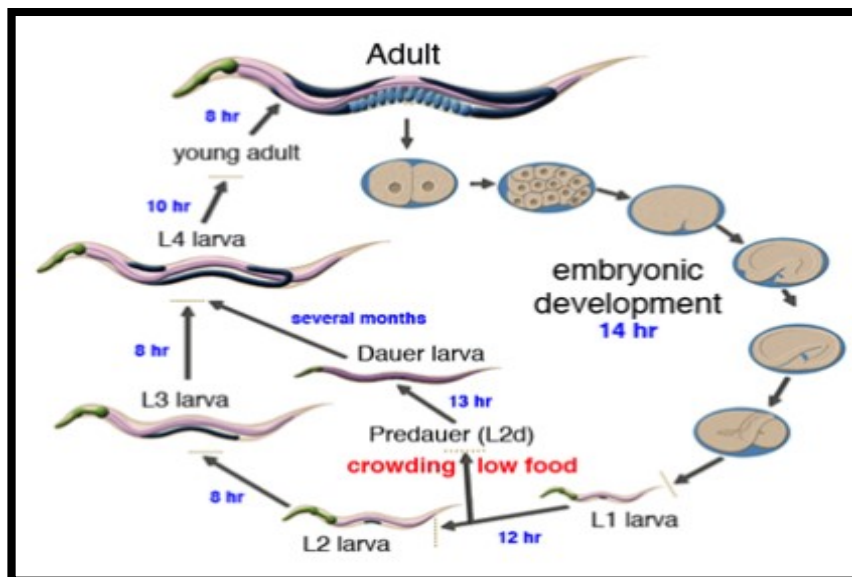
Este pequeño nemátodo no parasitario es uno de los modelos mejor establecidos que ha contribuido enormemente a la comprensión de muchas enfermedades humanas. Es un experimento muy atractivo, debido a sus muchas ventajas: tamaño pequeño, ciclo de vida corto, capacidad de autofecundación y alta tasa reproductiva, lo que favorece su mantenimiento en el laboratorio. Los análisis en laboratorio son rápidos, de bajo costo y susceptibles de análisis de alto rendimiento⁴⁵.

Se alimenta de microorganismos como las bacterias *e. coli* OP50⁴⁶. Hay varias cepas de *Caenorhabditis elegans* como N2 que permiten optimar la visión y alcance de patologías en seres pluricelulares como en humanos, se vuelve en un modelo básico de estudio para enfermedades inmunológicas, degenerativas y procesos cancerígenos^{47,48}.

2.4.2.1 Biología del *Caenorhabditis elegans* N2

El desarrollo embrionario de este nemátodo termina formando una larva tipo L1 conformada por 550 células de las mismas han muerto 113 por proceso de apoptosis. Esta especie necesita pasar por 4 fases larvares, cada fase con sus correspondientes mudas hasta llegar a formarse un organismo adulto con 959 células, 302 de las mismas son neuronas mientras que 18 células más ya habrán muerto por medio de apoptosis^{49,50}. Cada huevo necesita aproximadamente entre 90 a 120 segundos para ser puesto. El intervalo entre puestas consecutivas está alrededor de 20 minutos. Por otro lado, la defecación tiene lugar cada 46-49 segundos. Cada nemátodo pone unos 350 huevos en un periodo de 4 días de vida⁵⁰.

Ilustración 2 Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* N2⁵¹⁻⁵³.



CAPITULO III

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales de laboratorio

- Pinzas Metálicas
- Tubos Eppendorf de 1ml
- Agitador
- Soporte universal
- Papel filtro
- Cajas Petri
- Erlenmeyer de 50ml, 250ml, 500ml (Duran)
- Desecador
- Alambre de platino
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo
- Lámpara de alcohol
- Mechero de Bunsen
- Pipetas Volumétricas
- Vasos de precipitación 100ml, 250 ml PIREX
- Embudo de separación
- Bomba de oxigenación
- Lámpara de luz blanca
- Tubos de 15ml (Kimax)
- Cápsulas de porcelana
- Crisoles de porcelana (Haldenwanger)

- Embudo
- Probetas 250ml,150ml (Superior)

3.1.2 Otros materiales.

- Tijeras.
- Papel Aluminio.
- Toallas de cocina
- Papel periódico

3.1.3 Equipos

- Balanza Analítica (OHAUS)
- Estufa (Mettler)
- Molino Eléctrico (Black & Decker)
- Estereomicroscopio LABOMET
- Incubadora BIBASE
- Mufla MAGRICO
- Cocineta
- Campana de extracción de gases Supreme Air
- Refractómetro (Anton Abbemat 200)
- Lámpara UV Visible
- Potenciómetro (Fischer Scientific)
- Rotovaporador (Heidolph),
- Baño termostático de enfriamiento LAUDA ALPHA RA8
- Bomba al Vacío Vacuubrand
- Agitador Ultrasónico Fischer Scientific

3.1.4 Sustancias

- Agua de mar (isla Santa Clara)
- Agua destilada
- Agua tipo I
- Dimetilsulfoxido (DMSO)
- Metanol
- Hipoclorito de sodio

3.1.5 Reactivos

- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Fehling
- Tricloruro férrico al 5 %
- Cinta de magnesio
- Ácido clorhídrico concentrado
- Reactivo de Kedde
- Alcohol amílico
- Ácido Nítrico Concentrado
- Solución de Nitrato de plata 0.1 mol/lit
- Cloroformo
- Solución de Amonio al 25%
- Cloruro de Potasio (KCl)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Peptona
- Agar
- Colesterol
- Acido hipocloroso (HClO)
- Hidróxido de sodio (NaOH)

3.1.6 Material biológico

- Huevos de *Artemia salina*
- *Caenorhabditis elegans* N2

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Localización de la Investigación

La investigación se efectuó en el Laboratorio de Investigación de Toxicidad Ambiental y en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala.

3.3 Universo de trabajo.

Playa de Salinas-Ecuador.

3.4 Tipo de muestra.

Algas marinas de 5 especies (*Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphykus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi*).

3.4.1 Tipo de Investigación.

- Descriptiva
- Experimental
- Analítica

3.4.2 Selección de la Muestra.

Las muestras a utilizar fueron obtenidas a partir de los talos (ramas) de cada una de las especies de algas marinas en buen estado (*Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi*), recolectadas durante los meses de septiembre y octubre del 2017.

3.4.3 Procesamiento del material vegetal

Se realizó lavado con agua destilada y posteriormente secado en estufa a 40°C por 24 horas, posteriormente se trituro las muestras de algas hasta llegar a un fraccionamiento mínimo (1mm), usando molino mecánico marca CORONA.

3.5 Contenido de Humedad Residual.

3.5.1 Método Gravimétrico.

Para la desecación de las muestras de algas marinas, se utilizaron cápsulas de porcelana taradas mediante estufa marca Memmet a 105°C para posteriormente ser utilizadas⁵⁴.

Se utilizó 2g de muestra pulverizada, se colocan en la cápsula de porcelana tarada y rotulada. El ensayo se realiza por triplicado y se llevó a 105°C, por cuatro horas. Una vez terminado el proceso anterior las muestras se las lleva inmediatamente al desecador, se pesa y posteriormente se realiza los cálculos⁵⁴.

$$H\% = \frac{Z2 - Z1}{Z2 - Z} \times 100$$

H= pérdida de peso por desecación (%)

Z2= peso de cápsula con muestra (g)

Z1= peso de la cápsula con la muestra desecada (g)

Z= peso de cápsula vacía

3.6 Cenizas totales.

Para realizar este parámetro se usa crisoles previamente tarados y desecados a través de una mufla marca MAGRICO a 700°C⁵⁴.

Se necesitan 2g de muestra y se colocó en los crisoles se los colocó en una mufla con temperatura de 700°C en un lapso de 2 horas, transcurrido el tiempo con una pinza para se retira los crisoles y se los pone en el desecador durante 30 minutos y proceder a pesar⁵⁴.

$$CT\% = \frac{Z2 - Z1}{Z2 - Z} \times 100$$

CT%= porcentaje de cenizas totales

Z2= peso del crisol con muestra (g)

Z1= peso del crisol con ceniza de la muestra (g)

Z= peso del crisol vacío

3.7 Obtención del Extracto.

Para la obtención del extracto crudo, se pesaron 20 gramos de muestra de cada especie de algas en 150 ml de metanol, mediante ultrasonido por 20 minutos, los extractos orgánicos se filtraron y se los puso a evaporar mediante la campana de gases por 3 semanas a temperatura ambiente, los extractos fueron llevados a sequedad para posteriores ensayos⁵⁵.

3.8 Análisis Físico-Químico.

3.8.1 pH.

Para la medición del pH, se utilizó el potenciómetro digital, lo cual se colocó el electrodo en el extracto de cada una de las diferentes especies de algas marinas.

3.8.2 °Brix.

Se utilizó el refractómetro para la medición del % de °Brix. Se coloca una gota de extracto de algas en el sensor del equipo para realizar la lectura, luego se anota los valores que arroja el equipo.

3.8.3 Índice de Refracción.

Se utiliza el refractómetro, el procedimiento es tal como se determinó el porcentaje de °Brix. Se anotan los valores y se procede a limpiar el equipo.

3.9 Tamizaje Fitoquímico

Para el tamizaje, se realizaron diferentes ensayos para la determinación de metabolitos en extracto acuoso y metanólico⁵⁴.

3.9.1 Ensayos en extracto acuoso y extracto metanólico.

➤ *Alcaloides*

○ *Ensayo de Dragendorff*

Se toma 2ml de extracto y se le añade 1 gota de HCl concentrado, luego se calienta suavemente por 5 minutos hasta llegar a acidez, con respecto a la solución acuosa ácida se procedió con el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, se considera (+) si hay presencia de opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado⁵⁴.

○ *Ensayo de Mayer*

Se realiza de la forma descrita con anterioridad, hasta la obtención de la solución ácida, se añade una pizca de NaCl en polvo, se agitó y filtro, luego se agregó 2 gotas de solución de Mayer, se considera (+) si hay presencia de opalescencia, (++) turbidez definida, (+++) precipitado⁵⁴.

○ *Ensayo de Wagner*

Se realiza de la forma escrita inicialmente hasta la obtención de solución ácida, se añade 2 gotas de reactivo de Wagner, y la obtención de resultados se procede de la misma forma descrita en los dos ensayos anteriores⁵⁴.

➤ *Flavonoides*

○ *Ensayo de Shinoda*

Se diluye 1ml de HCl concentrado y un pedazo de cinta de magnesio metálico, luego de la reacción por el lapso de 5 minutos, se añadió 1ml de alcohol amílico, se mezclan las fases luego se pone en reposo hasta que sus fases se puedan separar, el ensayo es considerado positivo, cuando se torna de color amarillo, naranja, rojo intenso o carmelita en la fase del alcohol amílico⁵⁴.

➤ ***Fenoles y Taninos***

○ ***Ensayo de Cloruro Férrico***

Se añade acetato de sodio a una alícuota del extracto de la muestra para poner neutralizar, colocar 3 gotas de solución de tricloruro Férrico al 5% en solución fisiológica, para la determinación del ensayo positivo se dará las siguientes reacciones:

- Coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general
- Coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos
- Coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos⁵⁴.

➤ ***Saponinas***

○ ***Ensayo de Espuma***

A la muestra se diluye, 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 -10 minutos, se considera positivo si aparece espuma en la parte superior del extracto de más de 2 mm de altura y debe ser persistente por más de 2 minutos⁵⁴.

➤ ***Azúcares Reductores***

○ ***Ensayo de Fehling***

Se añade 2 ml de reactivo de Fehling y se calienta en baño maría durante 5-10 minutos, se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparición de precipitado rojo⁵⁴.

➤ ***Estructuras Polisacáridos***

○ ***Ensayo de mucílagos***

Se toma una alícuota de aproximadamente 2 ml del extracto acuoso y se enfrió en el refrigerados a 0-5 °C, se considera positivo si la solución tiene una consistencia gelatinosa⁵⁴.

3.10 Actividad tóxica o letal

El nivel de concentración tóxica o letal de los extractos obtenidos, se evaluará mediante bioensayos lo cual se utilizará como bioindicadores los crustáceos de *A. Salina* y el nematodo *C. Elegans*^{21,36,37,56}.

3.10.1 Organismos modelos utilizados como bioindicadores

➤ *Ensayo con Artemia Salina*

3.10.1.1.1 *Obtención de las larvas de Artemia Salina*^{8,25}.

Los quistes de *Artemia* se obtuvieron en la casa comercial MascotaModa, situada en la ciudad de Quito. Se trasladó la muestra hasta la Universidad Técnica de Machala para su posterior uso. Para la eclosión de los huevos se colocó en un recipiente con agua de mar previamente filtrada al vacío, con temperatura ambiente por 48 horas bajo un sistema de luz continua. Pasado este tiempo se recolectó los crustáceos y se los trasladó a los pocillos mediante una pipeta Pasteur. Con ayuda de un estereomicroscopio se observó la presencia de larvas en cada recipiente⁴⁰.

3.10.1.1.2 *Ensayo de letalidad*^{21,34,40-42}.

Este ensayo consiste en colocar un promedio de 10 a 15 larvas en 4 concentraciones de los extractos (1000, 100, 10 y 1 ug/mL) durante 24h a temperatura ambiente. Se preparan las placas de 24 pozos, se añade 1,5 mL de agua de mar suplementada con extracto de levadura (6mg/mL), luego se transfieren las larvas a cada pozo. Después de las 24h, se cuenta el número de microorganismos muertos y se calcula el porcentaje de mortalidad. Se consideraron las larvas muertas ya que no poseen movimiento durante varios segundos de observación al estereomicroscopio⁴⁰.

➤ *Ensayo de mortalidad Caenorhabditis elegans cepa N2*

El nemátodo fue adquirido en el laboratorio de toxicología ambiental, ubicado en la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala. Para la realización del ensayo con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* cp. N2

se debe seguir un protocolo para la preparación del medio como se establece a continuación^{50,57,58,59,60}.

3.10.1.1.3 *Sincronización.*

Para la realización de la sincronización se debe verificar que el plato tenga suficientes huevos, luego con el medio K y una varilla de vidrio pasar los huevos y gusanos a un tubo de 15 ml, centrifugar por 2 minutos a 2200 rpm, después se deja reposar aproximadamente 5 minutos en hielo, se procede a eliminar el sobrante si alterar el pellet, adicionar 10ml de solución Bleach, suavemente agitar durante unos 6 minutos, volver a centrifugar, para rápidamente eliminar sobrenadante hasta 2ml, agregar de 13-15 ml de k medio y agitar, centrifugar, dejar reposar nuevamente por 5 minutos en hielo o refrigeración, eliminar el sobrenadante hasta 2ml, agregar de 6-8 ml de k medio, centrifugar, dejar reposar 5 minutos en hielo o refrigeración, eliminar el sobrenadante hasta 2ml, colocar en una caja Petri, con *E. coli* OP50 para cultivar^{46,57}.

3.10.1.1.4 *Ensayo de letalidad*⁵⁹⁻⁶¹.

Para el ensayo de mortalidad se debe utilizar nemátodos en fase L4, se prepara las soluciones de estudio, para colocarlos en platos de 96 pocillos, contar los nematodos de *C. elegans* N2 mediante la colocación de 3 gotas de 2 ml en una placa de vidrio para sacar el promedio y colocar en cada dilución, se debe calcular el volumen requerido para colocar aproximadamente 10 nematodos, colocar el volumen calculado en cada pocillo, se debe realizar un control y réplicas por cada muestra, a lo cual transcurridas las 24 horas se debe contar el número de nematodos vivos y muertos en cada pocillo, lo cual se debe sacar el promedio para cada tratamiento⁵⁷.

CAPITULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Parámetros de calidad

Tabla 6 Parámetros fisicoquímicos de la droga seca

PARÁMETROS	<i>Centroceras Clavulatum</i> X / S	<i>Hypnea Spinella</i> X / S	<i>Kappaphykus Alvarezii</i> X / S	<i>Padina Pavónica</i> X / S	<i>Spatoglossum Schröderi</i> X / S
% Humedad residual	9,92 / 0,02	6,66 / 0,03	10,95 / 0,03	9,78 / 0,02	9,77 / 0,02
% Cenizas Totales	54,92 / 0,04	60,13 / 0,11	60,11 / 0,07	48,19 / 0,01	53,49 / 0,27

Elaborado: Autoras

En la tabla 6 se describen los parámetros fisicoquímicos (humedad y cenizas) realizados a cada una de las cinco especies de algas marinas. Los porcentajes de humedad residual (secado de estufa 105°C) se establecen según la farmacopea española 2da edición, donde el valor máximo permitido es 14%,

Los valores de humedad residual de la droga seca de las cinco especies de algas, presentan un porcentaje que oscila entre 6,66 a 10,95 (± 1 que es su desviación), en donde se puede evidenciar que estas especies de algas están dentro de los parámetros antes mencionados. Estos resultados permiten disminuir riesgos de proliferación de bacterias, haciendo que las muestras sean idóneas para un correcto análisis. Cabe recalcar que las muestras estudiadas, carecen de antecedentes históricos en estudios publicados por lo que este trabajo es un inicio de partida de comparación en futuros estudios.

Por otro lado, Los valores de cenizas totales, están en un rango de 60,13 a 48,19%. La especie que posee mayor contenido de cenizas es *Hypnea Spinella* (60,13%), y la especie con menor contenido es *Padina Pavónica* (48,19%). Estos resultados son

similares al estudio realizado por Burbholder en 1871, “Nutritive Constituents of some Caribbean Marine Algae”. Se justifica que el contenido de cenizas en porcentajes superiores a lo especificados por la Farmacopea Española 2da edición (no más del 10%) por ser específico de las especies de algas que son acuáticas y absorben sales de cloruro de sodio y otros minerales, tal como hace referencia Etcheverria y López (1982) en el Estudio químico de *Macrocystis Pyrifera (L) Ag. Constituyentes inorgánicos y orgánicos*. Por ello se hace necesarios estudios más precisos para establecer el tipo de minerales y su grado de toxicidad que no sea perjudiciales para la salud y poder utilizarla para elaboración de productos alimenticio, medicamentosos. Se explica por ser muestras recolectadas en las playas están sujetas a la contaminación ambiental.

Tabla 7 Parámetros de calidad de los extractos acuosos y metanólicos

PARÁMETROS	pH		°Brix		Índice de refracción	
	MEOH X / S	H2O X / S	MEOH X / S	H2O X / S	MEOH X / S	H2O X / S
<i>Centroceras Clavulatum</i>	6,36 / 0,005	6,85 / 0,01	2,23 / 0,01	4,08 / 0,01	1,336 / 0,0005	1,338 / 0,001
<i>Hypnea Spinella</i>	6,32 / 0,01	6,43 / 0,005	0,06 / 0,005	2,77 / 0,01	1,331 / 0,0005	1,337 / 0,0005
<i>Kappaphycus Alvarezii</i>	5,90 / 0,005	6,49 / 0,01	2,89 / 0,01	3,69 / 0,01	1,334 / 0,001	1,338 / 0,001
<i>Padina Pavónica</i>	5,99 / 0,005	6,99 / 0,01	1,22 / 0,005	4,23 / 0,01	1,334 / 0,001	1,339 / 0,001
<i>Spatoglossum Schröderi</i>	5,99 / 0,005	7,06 / 0,01	1,22 / 0,005	3,22 / 0,01	1,334 / 0,001	1,337 / 0,001

Elaborado: Autoras

En la tabla 7 se describen los parámetros de calidad (pH, °Brix, Índice de refracción) de los extractos de algas marinas con menstuo acuoso y alcohólico (metanol).

Se observa los resultados obtenidos de pH de las cinco especies de algas que en extracto metanólico es ligeramente ácido (5,90-6,36), mientras que en extracto acuoso los valores pasan a ser neutro (6,43-7,06). Comportamiento que se explica debido a la presencia de metabolitos propios de cada especie, como es el caso de alcaloides que forman sales solubles en agua indicando su naturaleza polar.

Los °Brix miden la concentración de azúcar presente en los extractos. En la tabla 7 se observa que, en extracto metanólico existe menor concentración de azúcares (0,06% a 2,89%) a diferencia del extracto acuoso (2,77 a 4,23%). Esto se debe a que existe mayor solubilidad de azúcares en extractos acuosos.

En el índice de refracción se observa que en extracto metanólico (1,336 a 1,339), los valores obtenidos son menores en cuanto al extracto acuoso (1,331 a 1,338), notándose que el rango de diferencia en ambos menstuos es mínimo.

Comparando los resultados alcanzados en el extracto metanólico con los valores del extracto acuoso. Se observa que en los tres parámetros analizados (pH, °Brix, índice de refracción), existen valores mayores en el extracto acuoso de las cinco especies de algas marinas. Cabe indicar que no existe información reportada hasta la actualidad para correlacionar estos resultados, debido a la poca investigación en este campo y especies.

4.2 Tamizaje Fitoquímico

Tabla 8 Tamizaje fitoquímico

ENSAYOS	<i>Centroceras Clavulatum</i>		<i>Hypnea Spinella</i>		<i>Kappaphykus Alvarezii</i>		<i>Padina Pavónica</i>		<i>Spatoglossum Schröderi</i>	
	MEOH	H2O	MEOH	H2O	MEOH	H2O	MEOH	H2O	MEOH	H2O
Dragendorff (Alcaloides)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Mayer (Alcaloides)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Wagner (Alcaloides)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
Cl₂Fe (Taninos)	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++
Shinoda (Flavonoides)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Fehling (Az. Reductores)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Espuma (Saponinas)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mucilagos (Polisacáridos)		-		-		-		-		-
Principios Amargos		-		-		-		-		-
Catequinas	-		-		-		-		-	
Resinas	-		-		-		-		-	
Baljet (Cumarinas)	+		+		+		+		+	
Liebermann- Buchard (Triterpenos)	-		-		-		-		-	
Ninhidrina (Aminoácidos)	-		-		-		-		-	
Borntrager (Quinonas)	-		-		-		-		-	
Kedde (Gluc. Cardiotónicos)	-		-		-		-		-	
Antocianidina	-		-		-		-		-	

(+) Existe presencia de metabolitos, (-) ausencia de metabolitos.

Elaborado: Autoras

En la tabla 8, se observa el resultado del ensayo (tamizaje fitoquímico) realizado a cada una de las cinco muestras de algas marinas en extractos acuosos y metanólicos.

Existe presencia de alcaloides en la mayoría de los extractos de algas (a excepción de la especie *Centroceras Clavulatum*). Según el estudio del perfil químico y biológico de la especie *Centroceras Clavulatum*⁶², se requiere el uso de menstruos específicos como ácidos penta y hexadecanoicos con el fin de corroborar la presencia de alcaloides en este tipo de algas. Para el análisis de compuestos fenólicos como taninos y flavonoides dio positivo únicamente en dos especies de algas marinas *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schroederi*. Considerando la presencia de estos metabolitos, estas algas pueden poseer propiedades anti-proliferativas²³.

La mayoría de estas especies de algas poseen propiedades similares y no hay diferencias considerables entre ellas. Todas las especies reportaron positivo para los metabolitos de cumarinas. A diferencia, de los ensayos que dieron como resultado negativo fueron mucílagos, catequinas, triterpenos, aminoácidos, quinonas, glucósidos cardiotónicos. Además, se observa presencia de azúcares reductores en las cinco especies de algas estudiadas, lo que concuerda con los resultados del ensayo de °Brix en extracto acuoso.

4.1 Bioensayos de mortalidad con organismos modelos.

Tabla 9 Ensayo de mortalidad con *Artemia salina*

Especies	Concentración (ug/ml)	% Mortalidad	CL50 (ug/ml)	Categoría*
Centroceras Clavulatum	0	0	511,233	Ligeramente tóxico (500-1000ug/ml)
	1000	90		
	100	20		
	10	10		
	1	6,66		
Hypnea Spinella	0	0	496,488	Moderadamente tóxico (100-500ug/ml)
	1000	80		
	100	36,66		
	10	46,66		
	1	0		
Kappaphycus Alvarezii	0	0	665,607	Ligeramente tóxico (500-1000ug/ml)
	1000	80		
	100	20		
	10	0		
	1	0		

Padina Pavónica	0 1000 100 10 1	0 90 63,33 26,66 0	369,834	Moderadamente tóxico (100-500ug/ml)
Spatoglossum Schröderi	0 1000 100 10 1	0 83,33 26,66 13,33 3,33	566,184	Ligeramente tóxico (500-1000ug/ml)

*CYTED (1995). **Elaborado:** Autoras

En la tabla 9, se reporta la concentración letal media (CL50) de cada una de las especies de algas marinas, usando como indicador nauplios de *Artemia salina*.

El porcentaje de mortalidad se analizó después de las primeras 24 horas de inicio del ensayo, en donde se observó el número de nauplios muertos en cada una de las concentraciones preparadas (1000, 100, 10, 1ppm). Con estos valores se calculó el porcentaje de mortalidad y concentración letal media (CL50) usando el programa estadístico Probit, con límite de confianza es del 95%.

Se observó que en la concentración de 1000ug/ml existe mayor porcentaje de mortalidad (83,33 al 90%), a diferencia a las demás concentraciones, que los valores son menores como por ejemplo en 100ug/ml los valores fluctúan entre 20 a 63,33%, en la concentración de 10ug/ml los rangos de mortalidad son de 10 a 46,66%, y por último la concentración de 1ug/ml se reportan entre 0 a 6,66%.

A cada una de las especies se las clasificó en relación a la toxicidad según las normas CYTED (1995) que se detallan en la tabla 9. Por ello las especies *Hypnea Spinella* y *Padina Pavónica* fueron categorizadas como moderadamente tóxicas porque se encuentran en un rango de 100 a 500 ug/ml. Por otra parte, las especies *Centroceras Clavulatum*, *Kappaphykus Alvarezii* y *Spatoglossum Schroederi* se consideran como ligeramente tóxicas porque oscilan en el rango de 500 a 1000 ug/ml.

Con los valores obtenidos en este ensayo se considera que estas especies de algas poseen sustancias bioactivas. Es decir, son beneficiosas para el ser humano porque se sugiere que poseen actividad antitumoral y antioxidante

Tabla 10 Ensayo de mortalidad con *Caenorhabditis elegans* N2.

Especies	Concentración (ug/ml)	% Mortalidad	CL50 (ug/ml)	Categoría
Centroceras Clavulatum	0	0	330,262	Moderadamente tóxicas (100-500ug/ml)
	1000	93,33		
	100	80		
	10	6,66		
	1	0		
Hypnea Spinella	0	0	397,401	
	1000	83,33		
	100	70		
	10	33,33		
	1	0		
Kappaphykus Alvarezii	0	0	465,719	
	1000	86,66		
	100	63,33		
	10	0		
	1	0		
Padina Pavónica	0	0	248,019	
	1000	96,66		
	100	73,33		
	10	30		
	1	0		
Spatoglossum Schröderi	0	0	375,697	
	1000	93,33		
	100	40		
	10	26,66		
	1	10		

Elaborado: Autoras

En la tabla 10, en cambio se muestra la concentración letal media (CL50) de cada una de las especies de algas marinas, usando como indicador el nemátodo *Caenorhabditis elegans* N2.

El proceso del ensayo es similar al que se realizó con nauplios de *Artemia salina*, usando las mismas concentraciones y número de organismos para realizar la posterior comparación entre los dos organismos modelos. En la tabla 10 se observa que en las concentraciones de 1000ug/ml y 100ug/ml de cada una de las especies de algas presentan mayor porcentaje de mortalidad con relación a las demás concentraciones.

De igual manera como en el ensayo con *Artemia salina* cada una de las especies se las clasificó en relación a la toxicidad según las normas CYTED (1995), categorizando a las cinco especies de algas marinas como moderadamente tóxicas debido a que los resultados obtenidos de estas especies oscilan entre 100 a 500ug/ml.

Tabla 11 Cuadro comparativo de resultados de toxicidad CL50 (ug/ml)

Modelos experimentales	<i>Centroceras Clavulatum</i>	<i>Hypnea Spinella</i>	<i>Kappaphycus Alvarezii</i>	<i>Padina Pavónica</i>	<i>Spatoglossum Schröderi</i>
<i>Artemia salina</i>	511,233	496,488	665,607	369,834	566,184
<i>Caenorhabditis elegans</i>	330,262	397,407	465,719	248,019	375,697

Elaborado: Autoras

La tabla 11 indica los valores de CL50 obtenidos con *Artemia Salina* y *Caenorhabditis elegans* N2 en cada una de las muestras de algas marinas.

De las cinco especies analizadas, *Hypnea Spinella* y *Padina Pavónica* poseen valores menores a 500ug/ml en ambos bioindicadores, clasificándolas como especies moderadamente tóxicas.

A diferencia de las otras especies de algas marinas en donde el rango de toxicidad varía entre moderadamente tóxico a ligeramente tóxico, esto se debe que, entre los dos bioindicadores utilizados para este ensayo, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* N2 demostró mayor sensibilidad a la prueba.

Las cinco especies de algas marinas estudiadas obtuvieron valores de CL50 inferiores a 1000ug/ml considerando a estas especies como fuentes portadoras de componentes bioactivos según lo indica CYTED, 1995. Es importante continuar con la investigación para conocer la concentración de sustancias bioactivas y que componentes químicos que le brindan el nivel de importancia científica a cada una de las especies de algas marinas.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Las muestras de algas *Centroceras Clavulatum*, *Hypnea Spinella*, *Kappaphycus Alvarezii*, *Padina Pavónica*, *Spatoglossum Schröderi* fueron evaluadas su calidad siguiendo los parámetros de la farmacopea española segunda edición. Las especies analizadas cumplieron con el % de humedad (menor a 14%) y en cenizas totales los valores reportados fueron alrededor del 50% propios de las especies.

En el tamizaje fitoquímico, se concluyó que los metabolitos presentes en las cinco especies de algas fueron azúcares reductores y cumarinas. En algunas especies (se reportó además alcaloides, saponinas, taninos y flavonoides).

El ensayo con *Artemia Salina* demostró que las especies *Hypnea Spinella* y *Padina Pavónica* son moderadamente tóxicas, y las especies *Centroceras Clavulatum*, *Kappaphycus Alvarezii* y *Spatoglossum Schroederi* se consideran ligeramente tóxicas. El ensayo con *Caenorhabditis elegans N2* indicó que las cinco especies de algas marinas analizadas se clasificaron como especies moderadamente tóxicas.

Terminado el ensayo de toxicidad, se concluye que los valores de CL50 de las cinco especies de algas marinas analizadas son menores a 1000ug/ml considerándolas como componentes bioactivas.

CAPITULO V

RECOMENDACIONES

- Se sugiere profundizar la investigación de especies de algas existentes en nuestro Ecuador.
- Analizar la presencia de minerales en cada una de estas especies.
- Determinar si las especies existentes en Ecuador poseen propiedades antimicrobianas.
- Se sugiere realizar estudios comparativos sobre algas marinas presentes en Ecuador con especies existentes en otros países.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Pesca, I. N. de. Internacional Bio Power Corporation Algas Marinas de Las Costas de La Republica Del Ecuador. *Botánica Mar.* **1994**, 156.
- (2) Poza, A. M.; Fernández, C.; Gauna, M. C.; Parodi, E. R. Biochemical Properties and Culture Optimization of *Leathesia Marina* (Phaeophyceae). *Algal Res.* **2018**, 33 (May), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.015>.
- (3) Robledo, D.; Freile-Pelegri, Y. In Vitro Cytotoxic and Antiproliferative Activities of Marine Macroalgae from Yucatán , Mexico. *Ciencias Mar.* **2009**, 35 (4), 345–358.
- (4) Dumay, J.; Morançais, M. *Seaweed in Health and Disease Prevention*; 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00009-9>.
- (5) Lloret, J. Ecosistemas Marinos Y Salud Humana Riesgos Y Beneficios Procedentes Del Mar. *Mediterr. económico* **2015**, 27, 179–197.
- (6) Whitehouse, L. N. A.; Lapointe, B. E. Comparative Ecophysiology of Bloom-Forming Macroalgae in the Indian River Lagoon, Florida: *Ulva Lactuca*, *Hypnea Musciformis*, and *Gracilaria Tikvahiae*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **2015**, 471, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.06.012>.
- (7) FAO. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura Sobre El Estado Del Mundo. **2018**, 250.
- (8) Lühn, S.; Grimm, J. C.; Alban, S. Simple and Rapid Quality Control of Sulfated Glycans by a Fluorescence Sensor Assay - Exemplarily Developed for the Sulfated Polysaccharides from Red Algae *Delesseria Sanguinea*. *Mar. Drugs*

2014, 12 (4), 2205–2227. <https://doi.org/10.3390/md12042205>.

- (9) Guiry, M. D. & Centroceras clavulatum (C. Agardh) http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=731&sk=0&from=results (accessed Jan 6, 2019).
- (10) Conde, F. Centroceras Clavulatum Montagne (Ceramiaceae, Rhodophyta) En El Mediterraneo. **1981**, 7–11.
- (11) Quiroz-González, N.; León-Álvarez, D.; Rivas-Acuña, M. G. Biodiversidad de Algas Rojas Marinas (Rhodophyta) En Tabasco, México. *Acta Bot. Mex.* **2018**, No. 123, 103–120. <https://doi.org/10.21829/abm123.2018.1253>.
- (12) Carvache, K. R. Diversidad, Abundancia y Distribución de Las Macroalgas En La Zona Intermareal Rocoso En Las Playas de Salinas, La Libertad y Ballenita (Península de Santa Elena – Ecuador Octubre – Noviembre 2009), 2012.
- (13) AlgaeBase Org. Hipnea espinella (C. Agardh) Kützing http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=2727 (accessed Jan 6, 2019).
- (14) Radulovich, R.; Umanzor, S. *Algas Tropicales Cultivo y Uso Como Alimento 2013 (Tropical Seaweeds: Cultivation and Use as Food) Integrated Seaweed Hatchery and Selective Breeding Technologies for Scalable Offshore Seaweed Farming View Project Giant Kelp Restoration in Baja California*; 2013.
- (15) Díaz, R. T. A.; Chabrillón, M.; Cabello-Pasini, A.; Gómez-Pinchetti, J. L.; Figueroa, F. L. Characterization of Polysaccharides from Hypnea Spinella (Gigartinales) and Halopithys Incurva (Ceramiaceae) and Their Effect on RAW

- 264.7 Macrophage Activity. *J. Appl. Phycol.* **2011**, 23 (3), 523–528.
<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9622-7>.
- (16) Juan, T.; Gómez, L. Adaptaciones Morfológicas y Crecimiento de *Grateloupia Dichotoma* e *Hypnea Spinella* (Rhodophyta) Bajo Condiciones de Cultivo Intensivo. *Dep. Biol. Univ. Las Palmas Gran Canaria 35017, Las Palmas Gran Canaria* **2007**, 23.
- (17) Guiry, M. D. *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=2811&fbclid=IwAR1cd0JRqSDPYFT9WBP0o_xmefV-ECnP6dNThwBSKtXGWb6WsX65ZmkCDl8 (accessed Jan 6, 2019).
- (18) Chan, S. W.; Mirhosseini, H.; Taip, F. S.; Ling, T. C.; Tan, C. P. Comparative Study on the Physicochemical Properties of κ -Carrageenan Extracted from *Kappaphycus Alvarezii* (Doty) Doty Ex Silva in Tawau, Sabah, Malaysia and Commercial κ -Carrageenans. *Food Hydrocoll.* **2013**.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.010>.
- (19) Hayashi, L.; Reis, R. P. Cultivation of the Red Algae *Kappaphycus Alvarezii* in Brazil and Its Pharmacological Potential. *Rev. Bras. Farmacogn. Brazilian J. Pharmacogn.* 22 (4), 748–752. <https://doi.org/10.1590/S0102>.
- (20) Barrios, J. E.; Bolaños, J.; López, R. Blanqueamiento de Arrecifes Coralinos Por La Invasión de *Kappaphycus Alvarezii* (Rhodophyta) En Isla Cubagua, Estado Nueva Esparta, Venezuela. *Inst. Ocean. Venez. Univ. Oriente* **2007**, 46 (2), 147–152.
- (21) Brito, L. L.; Segnini, de M. I. B.; Crescente, O. Actividad Citotóxica de

Extractos Orgánicos de Macroalgas Marinas Del Oriente de Venezuela. *Bol. Inst. Ocean. Venez.* **2012**, *51* (1), 53–58.

- (22) Club D'Immerció Biológica. Padina Pavonica https://www.cibsub.cat/bioespecie_es-padina_pavonica-32235 (accessed Jan 6, 2019).
- (23) Báez, J. C. Padina (Padina pavonica) http://www.malaga.es/es/turismo/naturaleza/ds-0/tp-0/bs-padina/lis_pg-1/lis_cd-10015/padina-padina-pavonica (accessed Jan 6, 2019).
- (24) Garzoli, L.; Poli, A.; Prigione, V.; Gnani, G.; Varese, G. C. Peacock's Tail with a Fungal Cocktail: First Assessment of the Mycobiota Associated with the Brown Alga Padina Pavonica. *Fungal Ecol.* **2018**, *35*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.05.005>.
- (25) Al-Enazi, N. M.; Awaad, A. S.; Zain, M. E.; Alqasoumi, S. I. Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activities of Laurencia Catarinensis, Laurencia Majuscula and Padina Pavonica Extracts. *Saudi Pharm. J.* **2018**, *26* (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.11.001>.
- (26) Usoltseva, R. V.; Anastyuk, S. D.; Ishina, I. A.; Isakov, V. V.; Zvyagintseva, T. N.; Thinh, P. D.; Zadorozhny, P. A.; Dmitrenok, P. S.; Ermakova, S. P. Structural Characteristics and Anticancer Activity in Vitro of Fucoidan from Brown Alga Padina Boryana. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *184*, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.071>.
- (27) Biológica, C. D. Spatoglossum Schroederi https://www.cibsub.cat/bioespecie-spatoglossum_solieri-70876 (accessed Jan 6, 2019).

- (28) Menezes, M. M.; Nobre, L. T. D. B.; Rossi, G. R.; Almeida-Lima, J.; Melo-Silveira, R. F.; Franco, C. R. C.; Trindade, E. S.; Nader, H. B.; Rocha, H. A. O. A Low-Molecular-Weight Galactofucan from the Seaweed, *Spatoglossum Schröderi*, Binds Fibronectin and Inhibits Capillary-like Tube Formation in Vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 1067–1075. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.119>.
- (29) Atalaya, M. R. Estudio Del Sistema de Polisacáridos Del Alga Parda *Dictyota Dichotoma* y Su Actividad Antiviral, Universidad Nacional de la Plata, 2015.
- (30) Ngo, D. H.; Kim, S. K. Sulfated Polysaccharides as Bioactive Agents from Marine Algae. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.036>.
- (31) Dolphqwrv, P. G. H.; Hilflhqwhv, P.; Frpsrxqg, O.; Phwkrgv, H. W. Extracción de Sustancias Asistida Por Ultrasonido (EUA). <https://doi.org/0379-3962>.
- (32) GAMALIEL ENRIQUE MEJIA MONTERROZA. Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos En La Costa de Caribe Colombiana y Posibles Fuentes de Contaminación. 2015.
- (33) Lo Nostro, P.; Ninham, B. W.; Carretti, E.; Dei, L.; Baglioni, P. Specific Anion Effects in *Artemia Salina*. *Chemosphere* **2015**, *135*, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.080>.
- (34) Bernarda García-ocón ; Rosalía Díaz-torres ; José Alberto Mendoza Espinoza. Importancia Del Bioensayo de *Artemia Salina*. *Rev. Educ. y Divulg. la Ciencia, Tecnol. e Innovación, Universidad Autónoma La Ciudad México* **2009**.

- (35) Valenciana, G. Artemia Salina. Un Crustáceo Muy Salado.
- (36) Amat, F. Biología de Artemia. *Inf.Tecn.Inst.Inv.Pesq.* **1985**, 126–127.
- (37) Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Lè, P.; Tackaert, W.; Versichele, D. Manual para el cultivo y uso de Artemia en acuicultura.
- (38) Ruiz, O. *Caracterización de Diversas Poblaciones de Artemia Desde El Punto de Vista de Su Composición En Ácidos Grasos y de Sus Patrones Moleculares.*; 2008.
- (39) Pino Pérez, O.; Jorge Lazo, F. Artemia Bioassay: Useful Working Tool for Ecotoxicologists and Chemists of Natural Products. *Rev. Protección Veg.* **2010**, 25 (1), 34–43.
- (40) Fidalgo, L. M.; Ramos, I. S. Evaluación de La Toxicidad de Extractos de Plantas Cubanas Con Posible Acción Antiparasitaria Utilizando Larvas de Artemia Salina L. **2009**, 61 (3), 254–258.
- (41) Argota, G.; Carhuapoma, M.; Ciencias, F. De; Universidad, B.; Palma, R. Toxicidad de Agentes Antiparasitarios , Antimicrobianos e Insecticidas Sobre Larvas Del Camarón Salino Artemia Franciscana (Crustacea : Artemiidae). **2016**.
- (42) Lhullier, C.; Horta, P. A.; Falkenberg, M. Avaliação de Extratos de Macroalgas Bênticas Do Litoral Catarinense Utilizando o Teste de Letalidade Para Artemia. *Rev. Bras. Farmacogn. (Brazilian J. Pharmacogn.* **2006**, 16 (2), 158–163. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200005>.
- (43) Riestra, V.; Riestra, V.; Argota, G.; Carhuapoma, M.; Ciencias, F. De;

- Universidad, B.; Palma, R. Toxicidad de Agentes Antiparasitarios , Antimicrobianos e Insecticidas Sobre Larvas Del Camarón Salino Artemia Franciscana (Crustacea : Artemiidae). **2016**.
- (44) Palmisano, N. J.; Meléndez, A. Autophagy in *C. Elegans* Development. *Dev. Biol.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.009>.
- (45) Ruszkiewicz, J. A.; Pinkas, A.; Miah, M. R.; Weitz, R. L.; Lawes, M. J. A.; Akinyemi, A. J.; Ijomone, O. M.; Aschner, M. C. *Elegans* as a Model in Developmental Neurotoxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, 354 (October 2017), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.016>.
- (46) Lynne, D.; Valencia, P. Y. *Caenorhabditis Elegans* Como Organismo Modelo Para Estudiar Enfermedades Mitocondriales Asociadas a Defectos En La Modificación Del Trna. *Cent. Investig. Príncipe Felipe* **2015**, 232.
- (47) Favier, A.; Elsen, J.-M.; De Givry, S.; Legarra, A. Optimal Haplotype Reconstruction in Half-Sib Families. *Proc. WCB* **2010**, 20. <https://doi.org/10.22490/24629448.2080>.
- (48) Guerrero, M. de J. Analisis Genético de La Locomoción Reversa En *Caenorhabditis Elegans*, Universidad Autónoma de Querétaro, 2014.
- (49) Tejeda, L.; Olivero, J. *Perfil Toxicológico de Los Sedimentos Del Río Magdalena Usando Como Modelo Biológico Caenorhabditis Elegans*; 2016.
- (50) Aguilera, J. C. R. *Caenorhabditis Elegans*, Un Espejo de 959 Células. **2006**, No. 2002, 61–63.
- (51) Wormatlas. A database featuring behavioral and structural anatomy of

Caenorhabditid elegans <http://www.wormatlas.org/> (accessed Jan 6, 2019).

- (52) Ardiel, E. L.; Rankin, C. H. Cross-Referencing Online Activity with the Connectome to Identify a Neglected but Well-Connected Neuron. *Current Biology*. May 2015, pp R405–R406. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.043>.
- (53) Husson, S. J.; Gottschalk, A.; Leifer, A. M. Optogenetic Manipulation of Neural Activity in C. Elegans: From Synapse to Circuits and Behaviour. *Biology of the Cell*. June 2013, pp 235–250. <https://doi.org/10.1111/boc.201200069>.
- (54) Miranda, M. Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Productos Naturales. In *Universidad de la Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos*; 2012; pp 1–50.
- (55) Benalcazar, N. E. C. Plan Nutricional y La Rutina de Ejercicios Considerando La Edad, Peso y El Tiempo Disponible Para La Actividad Física. **2015**, 19.
- (56) Pérez, O. P.; Lazo, F. J. Ensayo de Artemia: Útil Herramienta de Trabajo Para Ecotoxicólogos y Químicos de Productos Naturales. *CENSA* **2010**, 22 (1), 34–43.
- (57) Porta de la Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., Cerón, J. Caenorhabditis Elegans Methods: Synchronization and Observation. **2012**.
- (58) Kronberg, M. F.; Clavijo, A. M.; Moya, A.; Heredia, O.; Eduardo, A. Utilización Del Nematodo Caenorhabditis Elegans En Ensayos de Toxicidad de Muestras de Agua. *2do. ENCUENTRO Investig. EN Form. EN Recur. HÍDRICOS* **2014**, <https://www.ina.gob.ar/legacy/ifrh-2014/Eje2/2.19>.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (59) Gonzalez, Victor; Romero, Cristhian; Dominguez, Ricardo; Benitez, D. C. Elegans

Como Organismo Modelo En Estudios de Toxicidad Ambiental En Agua y Sedimentos. **2017**, *91*, 399–404.

- (60) Fontrodona, L.; Villanueva, A.; Cerón, J. BASIC Caenorhabditis Elegans Métodos : Sincronización y Observación. **2012**, 1–9.
- (61) Baretino Grediaga, A. Estudio En C. Elegans Del Papel de Los Genes de La Vía de Apoptosis Como Mediadores de Longevidad. **2015**, 2014–2015.
- (62) Rocha, O. P.; De Felício, R.; Rodrigues, A. H. B.; Ambrósio, D. L.; Cicarelli, R. M. B.; De Albuquerque, S.; Young, M. C. M.; Yokoya, N. S.; Deboni, H. M. Chemical Profile and Biological Potential of Non-Polar Fractions from Centroceras Clavulatum (C. Agardh) Montagne (Ceramiales, Rhodophyta). *Molecules* **2011**, *16* (8), 7105–7114. <https://doi.org/10.3390/molecules16087105>.

ANEXOS

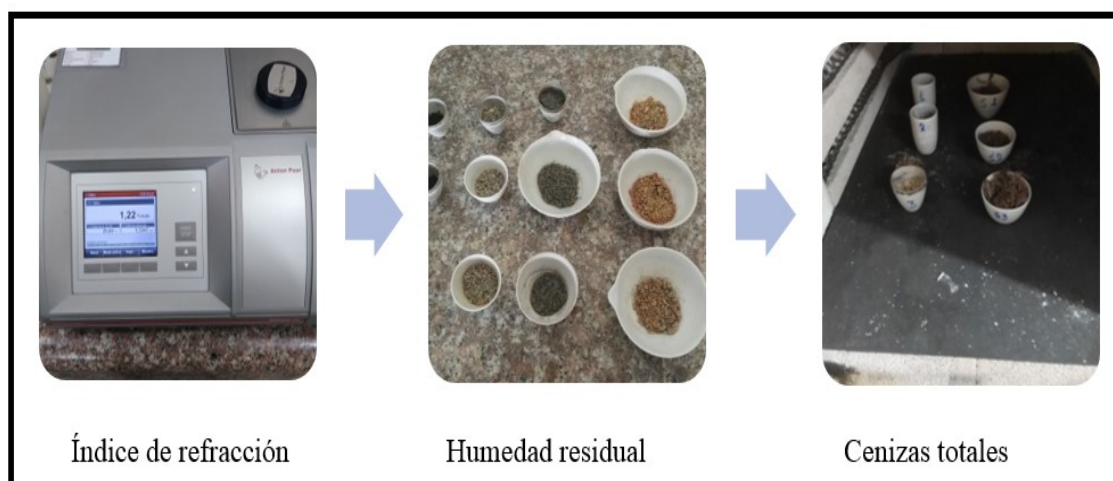
Anexo 1

Ilustración 3 Proceso para obtener las muestras de algas



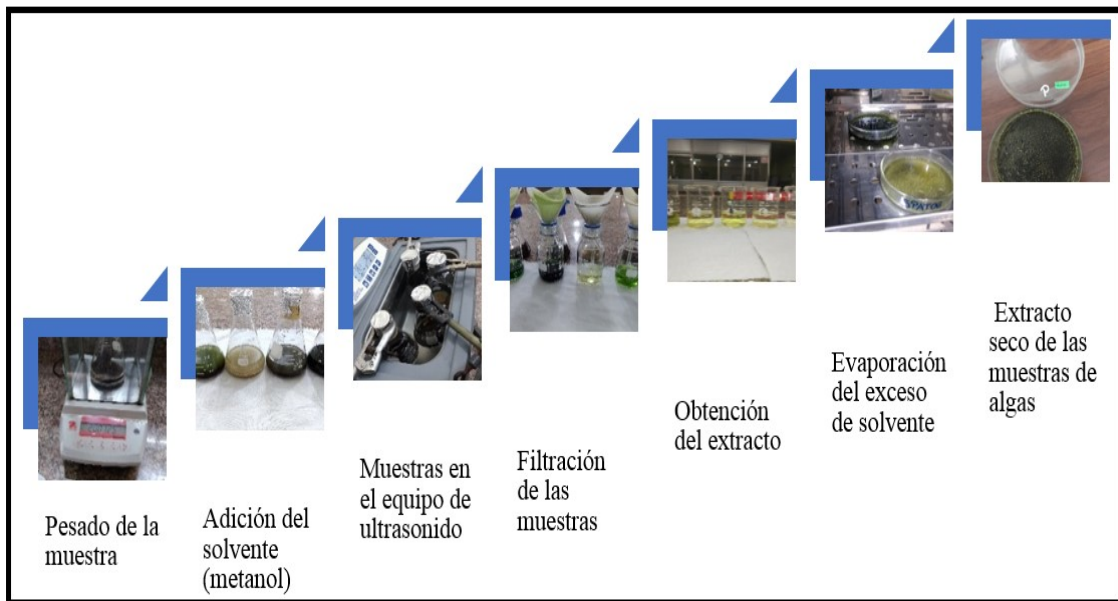
Anexo 2

Ilustración 4 Parámetros de calidad realizados a las muestras de algas



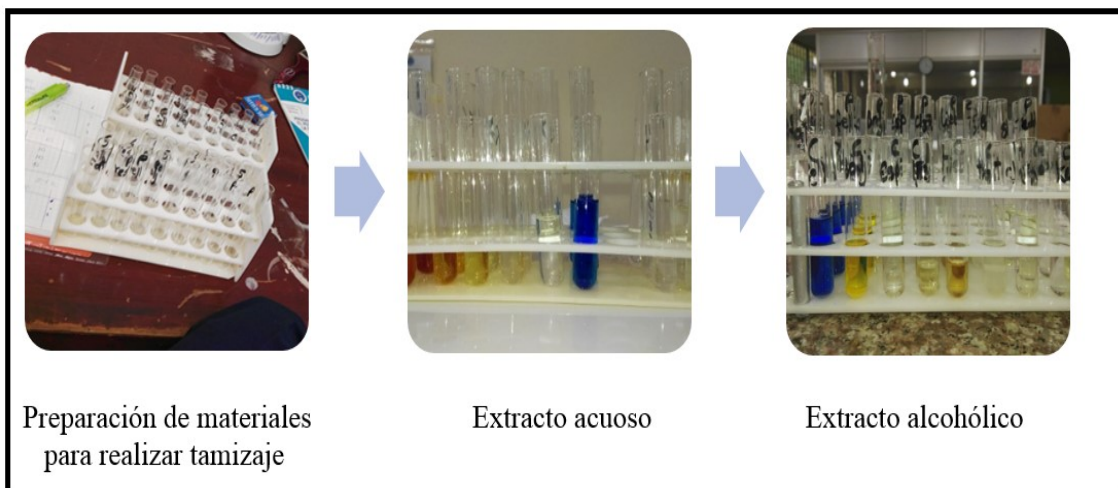
Anexo 3

Ilustración 5 Preparación del extracto seco



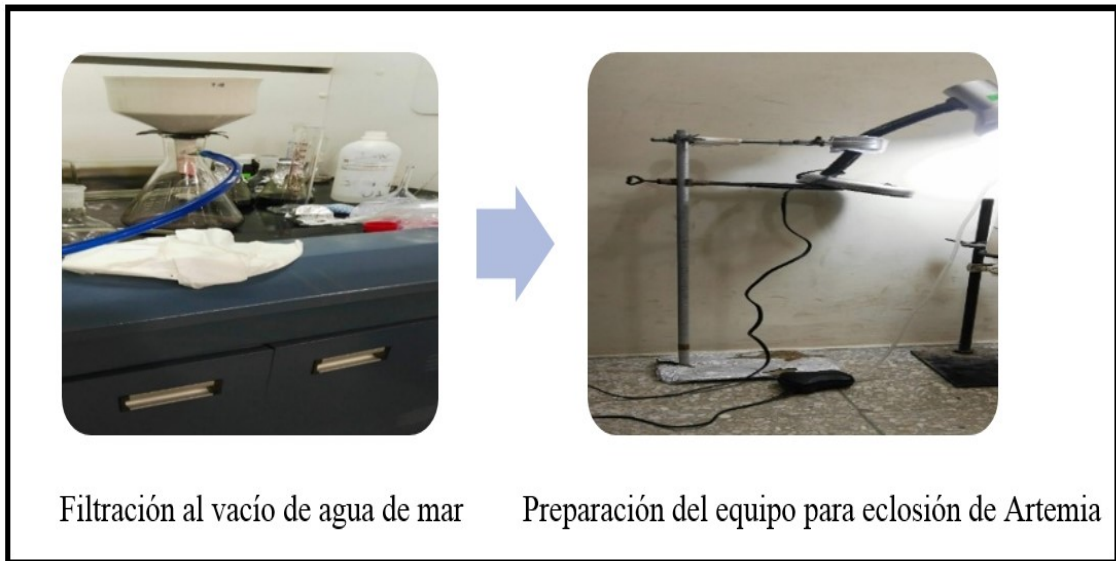
Anexo 4

Ilustración 6 Tamizaje fitoquímico a las muestras de algas marinas



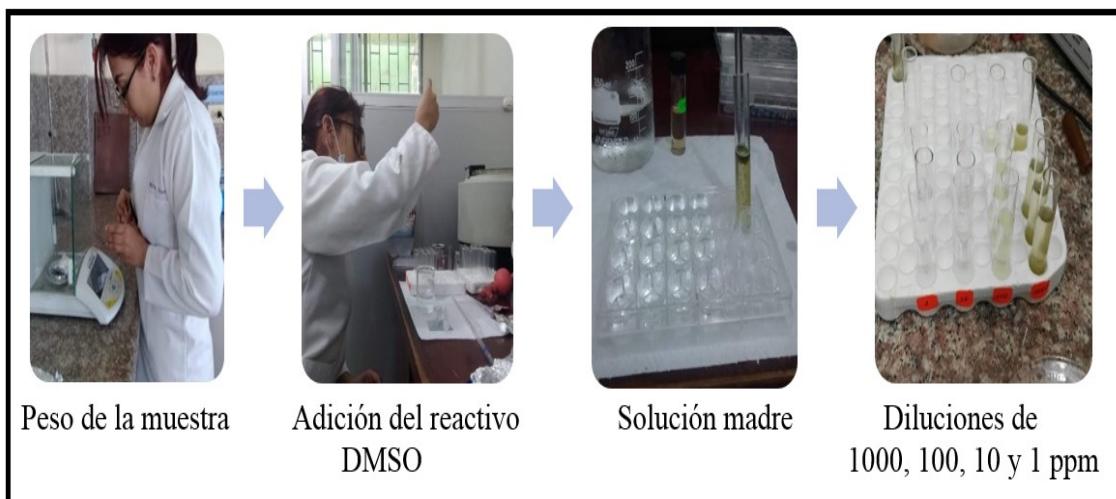
Anexo 5

Ilustración 7 Obtención de nauplios de *Artemia Salina*



Anexo 6

Ilustración 8 Preparación de la solución madre



Anexo 7

Ilustración 9 Ensayo con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* N2

