



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

**DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y ELEMENTOS TRAZA EN
MACROALGAS DE BAHÍA MAGDALENA, BAJA CALIFORNIA
SUR, MÉXICO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

PAOLA ALEJANDRA TENORIO RODRÍGUEZ

La Paz, B.C.S., Febrero del 2012

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13: 00 horas del día 14 del Mes de febrero del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Defensas antioxidantes y elementos traza en macroalgas de Bahía Magdalena, Baja California Sur, México”

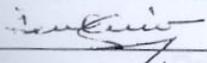
Presentada por el alumno:

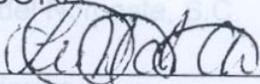
Paola Alejandra Tenorio Rodríguez

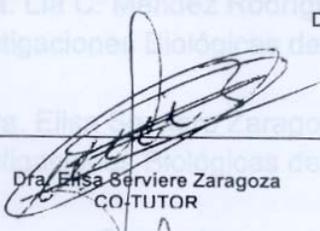
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología marina**

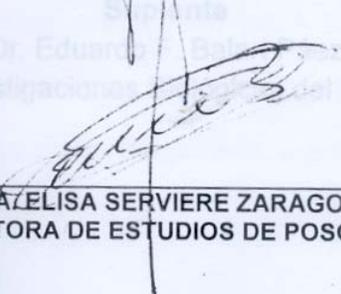
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dra. Tania Zenteno Savin
DIRECTOR DE TESIS


Dra. Lia C. Mendez Rodriguez
CO-TUTOR


Dra. Elisa Serviere Zaragoza
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis

Dra. Tania Zenteno-Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-tutor

Dra. Lía C. Méndez Rodríguez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Co-tutor

Dra. Elisa Serviere Zaragoza
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Tania Zenteno-Savín
Dra. Lía C. Méndez Rodríguez
Dra. Elisa Serviere Zaragoza

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Tania Zenteno-Savín
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Lía C. Méndez Rodríguez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Elisa Serviere Zaragoza
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Suplente

Dr. Eduardo F. Balart Páez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

RESUMEN

Los elementos traza se encuentran en el medio marino de forma natural, y varios de éstos son componentes esenciales de los organismos. Sin embargo, los elementos traza pueden actuar como promotores en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la vegetación marina. Con el objetivo de evaluar el sistema antioxidante y el efecto de los elementos traza en las macroalgas de Bahía Magdalena se determinó el contenido de plomo (Pb), cadmio (Cd), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y selenio (Se), antioxidantes no enzimáticos (vitamina C y polifenoles), así como la actividad de las principales enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasa (GST), y glutatión reductasa (GR)), y los niveles de los marcadores de daño oxidativo (TBARS y carbonilos protéicos) en nueve especies de macroalgas marinas y una especie de pasto marino. Las macroalgas rojas: *Gracilaria vermiculophylla*, *Gracilaria textorii*, *Hypnea cervicornis*, las macroalgas verdes: *Ulva lactuca*, *Caulerpa sertularioides*, *Codium amplivesiculatum*, *Codium cuneatum*; la macroalga café *Dyctiota flabellata*, y el pasto marino *Zostera marina* fueron colectadas en noviembre del 2009, febrero, abril y junio del 2010. Durante el verano se observó una mayor actividad de las enzimas SOD y GPx así como mayor contenido de polifenoles en todas las especies ($p \leq 0.05$). En la zona más somera del estero (La Estufa) durante el verano se encontró mayor actividad de las enzimas SOD y GPx en comparación con los sitios con mayor profundidad en *G. vermiculophylla*. Las concentraciones de Cu, Fe y Cd se correlacionaron positivamente con los marcadores de daño oxidativo en todas las especies de macroalgas colectadas. Estos resultados sugieren que el sistema antioxidante de las macroalgas es consecuencia de la interacción de las condiciones ambientales

de cada sitio, las condiciones propias de cada temporada, así como de la diferencia entre grupos taxonómicos.

Palabras clave: antioxidantes, Bahía Magdalena, macroalgas

VoBo
Director de tesis

Dra. Tania Zenteno Savín

ABSTRACT

Trace metals occur naturally in the marine environment, and several of them are essential molecules for organisms. However, trace metals can promote the generation of reactive oxygen species (ROS) in marine vegetation. The objective of this work was to evaluate the antioxidant system and the effects of trace metals in macroalgae from Bahia Magdalena. The concentrations of lead (Pb), cadmium (Cd), copper (Cu), zinc (Zn), iron (Fe) and selenium (Se), non-enzymatic antioxidants (vitamin C and polyphenols), as well as the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), and the levels of oxidative damage (TBARS and protein carbonyls) in nine macroalgae species and one species of seagrass were quantified. Red macroalgae *Gracilaria vermiculophylla*, *Gracilaria textorii*, *Hypnea cervicornis*, green macroalgae: *Ulva lactuca*, *Caulerpa sertularioides*, *Codium amplivesiculatum*, *Codium cuneatum*; brown macroalgae: *Dyctiota flabellata*, and the seagrass *Zostera marina* were collected in November 2009, February, April and June 2010. The activities of SOD and GPx and the polyphenols content were significantly higher during summer in all macroalgae ($p \leq 0.05$). In this season, *G. vermiculophylla* collected in the shallow site (La Estufa) had higher activities of SOD and GPx than in the other two sites. The concentration of Cu, Fe and Cd were positively correlated with oxidative damage biomarkers in all species. These results suggest that the antioxidant system in macroalgae is a consequence of the interaction between environmental conditions in the sampling sites, seasonality, and differences between taxonomic groups.

Keys words: antioxidants, Bahia Magdalena, macroalgae

DEDICATORIA:

A mis papas: Josafat e Irma

A mis hermanos: Sandra y Josaphat

y a la más pequeña de la familia: Isabella

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). En especial a todo el personal de Posgrado por brindar un excelente ambiente de trabajo y por las facilidades otorgadas. A CONACYT por la beca otorgada para la realización de estudios de maestría.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Tania Zenteno Savín por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo, el apoyo incondicional, los jalones de oreja, y sobre todo por su amistad y paciencia!!! A la Dra. Lia C. Méndez Rodríguez y Dra. Elisa Serviere, por todas sus correcciones, sugerencias y comentarios que enriquecieron el documento de tesis. Un especial agradecimiento a la Dra. Elisa que financió parte de las salidas de campo.

A los técnicos Horacio Bervera León y Jorge Angulo Calvillo del área de buceo y embaraciones del CIBNOR por su colaboración en el campo y su apoyo en la colecta de muestras. A los laboratorios de Salud Ambiental y Biomedicina, Bioquímica Fisiológica y de Espectrofotometría de Absorción Atómica donde se me permitió realizar los análisis bioquímicos. Particularmente, un agradecimiento a los técnicos Norma Olgún Monroy, Orlando Lugo Lugo, Baudilio Acosta Vargas, Griselda Peña Armenta y Roberto Hernández Herrera por su apoyo logístico y técnico en el laboratorio. A la M.C. Alejandra Mazariegos del laboratorio de macroalgas del CIBNOR por su apoyo tanto en campo como en la identificación de las especies de macroalgas colectadas. Especialmente, quisiera agradecer al Laboratorio de Toxicología de Vida Silvestre de la Universidad de Alaska Fairbanks , al Dr. Todd O'Hara y la técnico Maggie Castellini por su apoyo en el procesamiento de las muestras para la determinación de Se.

Al grupo de Salud Ambiental y Biomedicina del CIBNOR, por su apoyo y comentarios constructivos en la realización de este trabajo: Vannesa, Orlando,

Norma, Lluvia, Patricia, Angelica, Marce, Juan Carlos, Ramón, Mónica y Roberto. También un agradecimiento al centro de cómputo de posgrado, a Horacio Sandoval por la ayuda técnica con las computadoras. Al personal de la biblioteca: Ana Maria, Esther Ojeda y Sussy, por su disponibilidad y ayuda en la búsqueda de libros y artículos.

A mis compañeros de generación, pero especialmente muchísimas gracias a mis más más favoritos amigos del lado divertido de la maestría: Mario “le rush”, Alejandro “vampi”, Juan Carlos “el jota”, Saul “la ñora” Daniel “Gaylor”. Fue un gusto estudiar y conbeber con ustedes!! Gracias a Paty, Karina, Celeste, Jorge, Migue, Bambino, Cristal, Mau, Karol, Cris, Raul. Roberto nuevamente a ti!! por el alojamiento en estos meses y bueno por ser mi amigo, hermano y estar siempre pendiente de mi! con tu muy particular estilo.

Finalmente, pero no menos importante agradezco a mis papis y hermanos asi de todo corazón, por su confianza, por su apoyo moral, emocional y hasta económico en los últimos meses! y aunque suene un poco ilógico y a lo mejor hasta incorrecto a mi consentido Lupin por llenar de alegría mis días.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. MACROALGAS MARINAS	1
1.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).....	3
1.3. SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	5
2. ANTECEDENTES	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	13
4.1. OBJETIVO GENERAL	13
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	13
5. HIPÓTESIS	14
6. MATERIAL Y MÉTODO	14
6.1. ÁREA DE ESTUDIO	14
6.1. TRABAJO DE CAMPO	17
6.2. TRABAJO DE LABORATORIO.....	17
6.2.1. ELEMENTOS TRAZA.....	17
6.2.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	18
6.2.3. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	21
6.2.4. DAÑO OXIDATIVO	22
6.2.5. PROTEÍNAS TOTALES.....	23
6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
7. RESULTADOS	25
7.1. ESPECIES COLECTADAS.....	25
7.2. ELEMENTOS TRAZA.....	25

7.2.1 VARIACIÓN TEMPORAL EN LA CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN MACROALGAS MARINAS.....	25
7.3. ENZIMAS ANTIOXIDANTES	31
7.4. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	43
7.5. DAÑO OXIDATIVO	48
7.6. CORRELACIONES ENTRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE Y LOS METALES TRAZA	56
7.7. ANÁLISIS FACTORIAL.....	58
8. DISCUSIÓN	59
8.1 VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL EN LA CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN MACROALGAS MARINAS.....	59
8. 2. SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	62
8.3. CORRELACIONES ENTRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE Y ELEMENTOS TRAZA.....	67
9. CONCLUSIONES	69
10. LITERATURA CITADA.....	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en presencia de elementos traza.....4
- Figura 2.** Sistemas de producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ERO).....6
- Figura 3.** Zona de muestreo. Estero Banderitas (24° 15'- 25° 20' N y 112° 15' W) localizado en el complejo lagunar Bahía Magdalena-Almejas. A; La Estufa, B; El Conchalito, C; La Boca.....16
- Figura 4.** Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD) y B) glutatión S-transferasa (GST) en tres especies de macroalgas rojas (*Hypnea cervicornis*, H.c; *Gracilaria textorii*, G.t; *Gracilaria vermiculophylla*, G.v) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....33
- Figura 5.** Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) glutatión reductasa (GR) y B) glutatión peroxidasa (GPx) en tres especies de macroalgas rojas. (*Hypnea cervicornis*-H.c, *Gracilaria textorii*- G.t, *Gracilaria vermiculophylla*-G.v) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....34
- Figura 6.** Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD) y B) glutatión S-transferasa (GST) en cuatro especies de macroalgas verdes. (*Codium amplivesiculatum*-C.a, *Codium cuneatum*-C.c, *Caulerpa sertularioides*-C.s, *Ulva lactuca*-U.l) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....37
- Figura 7.** Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) glutatión reductasa (GR) y B) glutatión peroxidasa (GPx) en cuatro especies de macroalgas verdes. (*Codium amplivesiculatum*-C.a, *Codium cuneatum*-C.c, *Caulerpa sertularioides*-C.s, *Ulva lactuca*-U.l) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....38

- Figura 8.** Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD), B) glutatión S-transferasa (GST), C) glutatión reductasa (GR), y D) glutatión peroxidasa (GPx) en *Dyctiota flabellata* colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a febrero del 2010.....40
- Figura 9.** Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD), B) glutatión S-transferasa (GST), C) glutatión reductasa (GR), y C) glutatión peroxidasa (GPx) en el pasto marino, *Zostera marina*, colectado en La Boca, Bahía Magdalena, Baja California Sur.....42
- Figura 10.** Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg^{-1} de proteína) y B) carbonilos proteícos (nmol mg^{-1} de tejido) en tres especies de macroalgas rojas (*Hypnea cervicornis*-H.c, *Gracilaria textorii*- G.t, *Gracilaria vermiculophylla*-G.v) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....49
- Figura 11.** Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg^{-1} de proteína) y B) carbonilos proteícos (nmol mg^{-1} de tejido) en cuatro especies de macroalgas verdes (*Codium amplivesiculatum*-C.a, *Codium cuneatum*-C.c, *Caulerpa sertularioides*-C.s, *Ulva lactuca*-U.l) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....51
- Figura 12.** Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg^{-1} de proteína) y B) carbonilos proteícos (nmol mg^{-1} de tejido) en *Dyctiota flabellata* colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a febrero del 2010.....53
- Figura 13.** Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg^{-1} de proteína) y B) carbonilos proteícos (nmol mg^{-1} de tejido) en el pasto marino, *Zostera marina*, colectado en La Boca, Bahía Magdalena, Baja California Sur, de febrero a junio del 2010.....55
- Figura 14.** Proyección gráfica del resultado del análisis multivariado de análisis factorial.....58

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Variación estacional de la temperatura y oxígeno disuelto en en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....	88
TABLA II. Listado de macroalgas y pasto marino recolectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....	27
Tabla III. Concentración de elementos traza (mg kg^{-1} peso seco) en macroalgas y pasto marino por sitio de estudio y mes de colecta.....	30
Tabla IV. Contenido de vitamina C (mg g^{-1} de tejido) en macroalgas y pasto marino colectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....	46
Tabla V. Contenido de polifenoles (μg de equivalentes de ácido gálico g^{-1} de tejido) en macroalgas y pasto marino colectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.....	48
Tabla VI. Coeficientes de correlación de Pearson entre los elementos traza (mg kg^{-1}) y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; GST, glutatión-S-transferasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa), los niveles de antioxidantes no enzimáticos, y los niveles de daño oxidativo (PC, carbonilos protéicos; TBARS, lípidos peroxidados) para (a) todas las especies, (b) macroalgas verdes, y (c) macroalgas rojas colectadas en Bahía Magdalena de noviembre del 2009 a junio del 2010.....	58
Tabla VII. Coeficientes de correlaciones extraídas del análisis de factores para todas las variables analizadas.....	89

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MACROALGAS MARINAS

Las macroalgas son importantes componentes de los ecosistemas marinos contribuyendo con un poco más del 5% de la producción primaria (Mann, 1973). Las diversas especies de macroalgas de acuerdo a sus características se han agrupado tradicionalmente bajo el rango taxonómico de División. Algunas de las características en las que se basan los criterios para la agrupación de las macroalgas son: caracteres citológicos (niveles de organización), bioquímicos (pigmentos, composición de la pared celular) y reproductivos (ciclos vitales y estructuras reproductivas) (Bold y Wynne, 1985; Dawes, 1998). La mayoría de las especies se encuentran agrupadas dentro de las divisiones Chlorophyta (macroalgas verdes), Rhodophyta (macroalgas rojas) y Phaeophyta (macroalgas café) (Lobban y Wynne, 1981; Bold y Wynne, 1985; Dawes, 1998).

En México, la mayor diversidad y biomasa algal se encuentra en las lagunas costeras de la costa occidental de la Península de Baja California (Casas-Valdez et al., 2000). Las lagunas costeras son consideradas como cuerpos acuáticos con comunicación permanente o semipermanente con el mar; el encuentro entre las dos masas de agua, cada una con características diferentes, causa fenómenos físico-químicos particulares, creando áreas de gran productividad primaria y secundaria (Barnes, 1980; Klump y Martens, 1981). Las macroalgas y pastos marinos son unidades fundamentales de estos ecosistemas costeros, ya que proporcionan hábitat, alimento y refugio a una gran cantidad de especies que incluyen peces, ballenas, aves marinas y tortugas (SEMARNAP-INE, 2000).

En los sistemas costeros se observa una zonificación vertical en la distribución de las macroalgas. Esta zonificación se da en función de las características propias de cada grupo taxonómico, y de la capacidad que tengan para responder a los cambios en las condiciones que las rodean.

Las macroalgas que se distribuyen en la zona submareal se encuentran bajo condiciones relativamente constantes de temperatura, salinidad, concentración de carbono inorgánico y otros nutrientes. Sin embargo, en la zona intermareal los organismos están expuestos a fluctuaciones constantes y condiciones estresantes, como la exposición a elevados niveles de radiación solar, cambios en la salinidad, variación en los regímenes de temperatura y eventos de desecación (Pearson y Davison, 1994; Aguilera et al., 2001; Bischof et al., 2002; Dring, 2005). Estas fluctuaciones en las condiciones ambientales pueden influir directamente en la respuesta metabólica de las macroalgas y afectar a sus poblaciones (Orduña-Rojas et al., 2002; Lesser, 2006; Zubia et al., 2007). Se sugiere que las macroalgas han desarrollado una serie de estrategias a nivel celular que les permiten protegerse y minimizar los efectos dañinos de los factores ambientales. Si los mecanismos de defensa no son lo suficientemente efectivos, puede haber efectos negativos en el crecimiento, la reproducción, productividad e incluso la estructura de la comunidad de macroalgas (Aguilera et al., 1999; Aguilera et al., 2001). Para evitar esto, el sistema antioxidante desempeña un papel vital. El sistema antioxidante puede variar tanto cuantitativamente como cualitativamente entre grupos taxonómicos y especies; sin embargo, pocos estudios abordan el tema. El objetivo de este trabajo fue evaluar el sistema antioxidante y la presencia de metales traza en algunas macroalgas de importancia ecológica de Bahía Magdalena. Con la finalidad de aportar información para estudios futuros, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes y el contenido de elementos traza y antioxidantes no enzimáticos por grupo taxonómico, especie, estación y sitio.

1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

Todo organismo aeróbico requiere oxígeno para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Durante este proceso se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ERO tienen funciones de señalización

celular en procesos como la muerte celular, señalización hormonal y respuestas al estrés abiótico (D'Autréaux y Toledano, 2007). Sin embargo, una sobreproducción de ERO puede tener un efecto tóxico, ya que las ERO son capaces de iniciar reacciones en cadena resultando en daño oxidativo a nivel celular y de tejidos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Okamoto et al., 2001; Pinto et al., 2003.).

La formación de ERO en el organismo puede ocurrir por fuentes endógenas o exógenas. De manera endógena, la formación de ERO en las células vegetales ocurre principalmente en el cloroplasto durante el proceso de la fotosíntesis. En condiciones fotosintéticas, los niveles de oxígeno (O_2) aumentan y varios intermediarios de la cadena de transporte electrónico se encuentran reducidos, aumentando el potencial de transferencia de energía y electrones (Niyogi, 1999; Bischof et al., 2002). Lo anterior da lugar a la formación de varias ERO, entre las que se incluye el oxígeno singulete (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (HO^{\cdot}), siendo esta última la ERO más tóxica puesto que su reactividad favorece la interacción con cualquier grupo electrofílico ubicado en su proximidad (Asada, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999). Las ERO también pueden generarse en las mitocondrias a través de la cadena respiratoria. En la mitocondria, el NADH y la ubiquinona reducida son capaces de transferir electrones al O_2 , generando $O_2^{\cdot-}$. Ésta es la fuente más importante de ERO en células animales; sin embargo, su contribución en las células vegetales es menos relevante (Bartoli et al., 2004).

La presencia de elementos traza también puede incrementar la formación de ERO. Varios elementos traza ocurren naturalmente en el medio marino y son componentes importantes en los organismos al actuar como micronutrientes. Elementos como el cobre (Cu), zinc (Zn) y hierro (Fe) son esenciales en la fisiología de las macroalgas, teniendo un papel importante en la fotosíntesis (Dawes, 1998). Sin embargo, elementos como el plomo (Pb), el cadmio (Cd) o el mercurio (Hg) son considerados tóxicos, debido a que se les desconoce una función biológica (Allan, 1997; Pinto et al., 2003; Michalak, 2006).

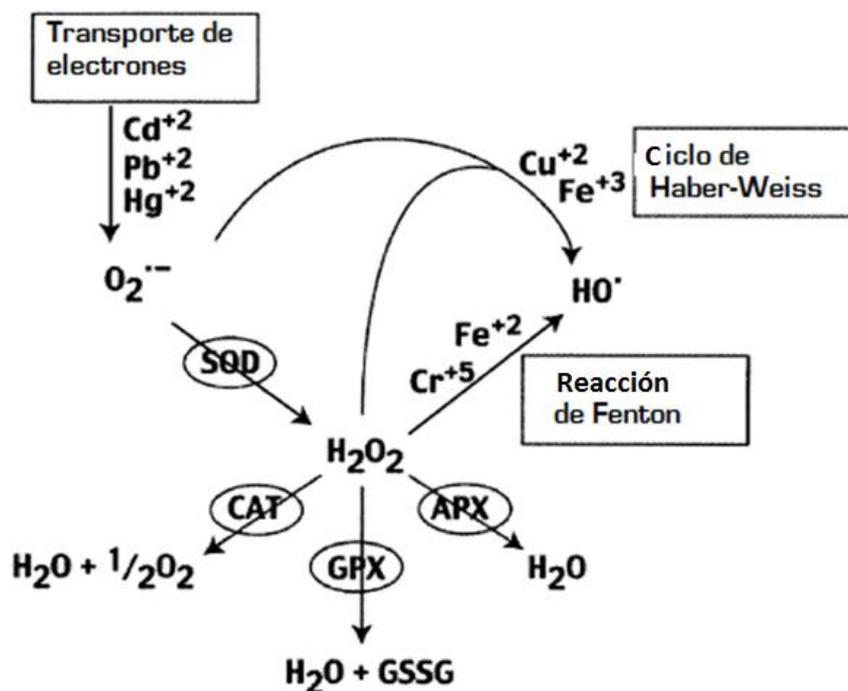


Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en presencia de elementos traza. $O_2^{\cdot-}$ = radical superóxido, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, HO^{\cdot} = radical hidroxilo, H_2O = agua, SOD= superóxido dismutasa, CAT=catalasa, GPX= glutatión peroxidasa, APX= ascorbato peroxidasa, GSSG=glutatión oxidado (Modificado de Pinto et al., 2003).

Si bien varios elementos traza actúan como micronutrientes, por encima de cierto umbral de concentración éstos pueden ser tóxicos para los organismos. Desde el punto de vista toxicológico la presencia de elementos traza está asociada a varios mecanismos generadores de ERO (Fig. 1). Metales de transición como el Fe y el Cu participan en el ciclo de Haber-Weiss produciendo HO^{\cdot} a partir de la reacción entre $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Pinto et al., 2003). Elementos como el Cd, Pb y Hg, que no tienen capacidad redox, pueden incrementar el estado oxidante en la célula al reducir la concentración de glutatión (GSH) o al inhibir la actividad antioxidante de

algunas enzimas (Stohs y Bagchi, 1995). Finalmente, elementos como el cromo (Cr) pueden generar HO^{\bullet} a partir de H_2O_2 a través de la reacción de Fenton (Fig. 1) (Dietz et al., 1999; Pinto et al., 2003; Michalak, 2006).

1.3. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos aeróbicos poseen un sistema antioxidante para balancear la producción de ERO y atenuar el posible daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los antioxidantes son moléculas que están presentes en bajas concentraciones en relación con el compuesto oxidable, y tienen como función inhibir o retrasar los procesos oxidativos (Halliwell y Gutteridge, 1999). De acuerdo a su naturaleza, las moléculas que integran el sistema antioxidante se puede dividir en dos grupos, antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 1999; Rodríguez et al., 2001).

Las enzimas antioxidantes catalizan reacciones químicas utilizando sustratos que a su vez reaccionan con las ERO (Halliwell y Gutteridge, 1999). Cada enzima posee afinidad hacia una o varias ERO. Entre las principales enzimas antioxidantes en plantas y macroalgas se incluyen la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11), glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2), glutatión S-transferasa (GST, EC2.5.1.18) y glutatión peroxidasa (GPx, EC1.11.1.9) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

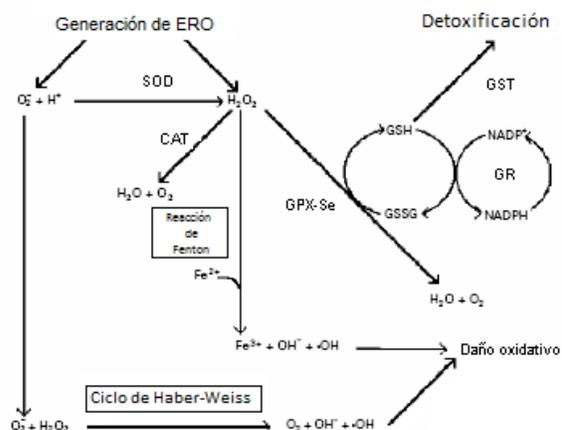


Figura 2. Sistemas de producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ERO). O_2 =oxígeno molecular, $O_2^{\cdot-}$ = radical superóxido, H^+ = ion hidrógeno, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, HO^{\cdot} = radical hidroxilo, H_2O = agua, SOD= superóxido dismutasa, CAT=catalasa, GPX-Se= glutatión peroxidasa, GST= glutatión S-transferasa, GR= glutatión reductasa, GSH= glutatión reducido, GSSG= glutatión oxidado, NADPH= dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido, NADP⁺= dinucleótido de nicotidamida y adenina fosfato (Modificado de Storey, 1996).

La enzima SOD es considerada como la primera línea de defensa en contra de las ERO, cataliza la dismutación del anión $O_2^{\cdot-}$ para generar H_2O_2 y O_2 (McCord y Fridovich, 1969). En plantas se han identificado tres isoenzimas de SOD que difieren entre sí en el grupo prostético metálico ligado a la enzima. El H_2O_2 generado por la SOD y otras vías (e.g. reacción de Mehler) es eliminado por enzimas hidroperoxidasas como la GPx (Folh  y Günzler, 1984). Esta enzima se encuentra preferentemente en el citosol y la matriz mitocondrial, teniendo al selenio (Se) como centro activo (Ahmad y Pardini, 1988). La GPx elimina los hidroperóxidos transformando el glutat n reducido (GHS) en glutat n disulfuro

oxidado (GSSG) (Folh  y Günzler, 1984; Ahmad y Pardini, 1988). La enzima GST es la encargada de detoxificar compuestos xenobióticos catalizando la reacción con el grupo –SH del GSH, neutralizando de esta forma sus sitios electrofílicos y generando productos más solubles en agua (Habig y Jacoby, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1999). La GR es una flavoenzima que se encarga de regenerar el GSH a partir de la reducción del GSSG utilizando como fuente de electrones a la coenzima NADPH (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Además de los antioxidantes enzimáticos, la célula vegetal dispone de un conjunto de moléculas de bajo peso molecular con función antioxidante. Estos antioxidantes no enzimáticos también regulan y contrarrestan a las ERO cediéndoles un electrón y dando lugar a la formación de especies menos reactivas. Estos compuestos pueden ser de naturaleza tanto hidrosoluble como liposoluble. El acido ascórbico, el glutatión y varios compuestos fenólicos pertenecen al grupo de antioxidantes de naturaleza hidrosoluble, mientras que los tocoferoles y carotenoides se categorizan como antioxidantes liposolubles (Chaudière y Ferrari-Iliou, 1999; Halliwell y Gutteridge, 1999; Michalak 2006).

El  cido L-ascórbico (AA) o vitamina C se considera un antioxidante muy eficiente; en los tejidos vegetales se localiza en el citosol, cloroplasto, vacuola y mitocondria. La acción antioxidante del AA se debe a que éste puede reaccionar directamente con $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , y 1O_2 . En la reducción del $O_2^{\cdot-}$ se forma H_2O_2 y dehidroascorbato (DHA) (Reacción 1). Al reaccionar con $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} y H_2O_2 se forma agua y DHA como producto (Reacción 2) (Padh, 1990; Buettner y Jurkiewicz, 1996; Halliwell y Gutteridge, 1999).



La vitamina C también es capaz de regenerar a la vitamina E mediante la reducción del radical tocoferoxilo transfiriendo un electrón (Sharma y Buettner, 1993).

Por otro lado, los polifenoles o compuestos fenólicos son compuestos secundarios productos del metabolismo de la célula vegetal. Sus propiedades como antioxidantes están relacionadas con su capacidad para quelar metales, inhibir a la lipoxigenasa e inactivar ERO como $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} y radicales peroxilo, mediante la donación de un protón (Rice-Evans et al., 1997; Michalak, 2006).

El sistema antioxidante es capaz de balancear la producción de las ERO; sin embargo, cuando este sistema se ve sobrepasado por una excesiva producción de ERO o por una deficiencia de los antioxidantes (e. g. desnutrición) inicia una serie de reacciones en cadena que dañan lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN, e incluso pueden promover la muerte celular. A esta pérdida del balance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros se le denomina estrés oxidativo (Sies, 1986; Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las macroalgas marinas, al ser organismos sésiles, se encuentran expuestas a una gran variedad de factores ambientales que varían en escala temporal y espacial. La variación en los niveles de radiación solar y/o la combinación de otros factores, incluyendo la distribución vertical de las macroalgas, pueden favorecer la generación de ERO. Los organismos fotosintéticos dependiendo de la profundidad en la que se distribuyan han desarrollado una serie de estrategias fisiológicas (e.g. fotoaclimatación y fotoprotección) que les permiten contrarrestar el daño oxidativo resultado de estos factores ambientales. En macroalgas distribuidas en zonas intermareales las estrategias incluyen reducción en la tasa fotosintética, disminución de pigmentos accesorios (e.g. clorofilas) e incremento en la actividad de enzimas antioxidantes. Al parecer la presencia del sistema antioxidante en las macroalgas es esencial en los mecanismos de aclimatación

en respuesta a la intensidad y variación de factores ambientales a nivel espacial y temporal.

2. ANTECEDENTES

La mayoría de los trabajos publicados sobre elementos traza en macroalgas y pastos marinos se enfocan en procesos de bioacumulación y el uso de éstas como bioindicadores de contaminación (Muse et al., 1999; Stengel et al., 2004; Salgado et al., 2005; Villares et al., 2005). En estos trabajos se menciona que si bien las características ecológicas y morfológicas de cada especie se asocian a la capacidad para incorporar y bioacumular elementos traza, el origen taxonómico determina la disponibilidad de sitios activos en la pared celular. Son pocos los trabajos que abordan los efectos deletéreos que pueden tener los elementos traza en la fisiología de las macroalgas (Collén et al., 2003). En Bahía Magdalena, el área de estudio en que se desarrolló el presente trabajo, se observa una variación estacional en el contenido de elementos traza y elementos mayores en macroalgas marinas, así como entre las especies de la División Rhodophyta, Chlorophyta y Phaeophyta; Fe y el Cu son los elementos que se destacaron por su contenido en la mayoría de las especies (Rodríguez-Meza, 2004; Riosmena-Rodríguez et al., 2009). Los autores atribuyen estos resultados al aporte natural del material de erosión de las rocas metamórficas y surgencias costeras, así como a las características propias de cada grupo taxonómico.

Se ha relacionado la presencia de metales en el ambiente con el incremento en la producción de ERO y el estrés oxidativo en macroalgas (Contreras et al., 2005; Collén et al., 2003; Pinto et al., 2003; Pereira et al., 2008). La exposición a concentraciones subletales de Cu^{+2} y Cd^{+2} en *Gracilaria tenuistipitata* (0.2 y 1 ppm, respectivamente) en condiciones de laboratorio aumenta la actividad de CAT, APX y SOD e incrementa el contenido de β - caroteno y luteína (Collén et al., 2003). Sin embargo, los niveles de peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas también fueron mayores en comparación con los controles y sugieren un

efecto tóxico diferencial de los metales ya que el Cu^{+2} causó mayor daño oxidativo que el Cd^{+2} en la misma especie (Collén et al., 2003). Pereira et al. (2009) reportaron un incremento en la actividad de CAT, GPx, GR y el contenido de GSH en la macroalga verde *Ulva* sp. asociado a los niveles máximos de Cu, Ni y Mn en verano y otoño en la costa oeste de Portugal; sin embargo, la respuesta antioxidante no fue suficiente para evitar el estrés oxidativo, ya que los mayores niveles de peroxidación de lípidos fueron reportados en estas mismas temporadas. Varios grupos de investigación se han enfocado en el estudio de las adaptaciones fisiológicas y metabólicas que presentan las macroalgas para contrarrestar la sobreproducción de ERO y el estrés oxidativo inducido por la combinación de varios factores ambientales (Aguilera et al., 2002; Lohrmann et al., 2004; Nissa et al., 2004; Pereira et al., 2009). La actividad de las enzimas antioxidantes ha sido detectada y reportada para numerosas especies de macroalgas café: *Fucus* spp. (Collén y Davison, 1999a), *Laminaria saccharina*, *Desmarestia acuelata* (Aguilera et al., 2002), macroalgas verdes *Ulva rigida* (Collén y Pedersen, 1996) y macroalgas rojas *Devaleraea ramentacea*, *Palmaria palmata* (Aguilera et al., 2002), *Chondrus crispus* y *Mastocarpus stellatus* (Collén y Davison, 1999b; Lohrmann et al., 2004). Las enzimas antioxidantes SOD, APx, CAT, y GR, así como metabolitos de bajo peso molecular, incluyendo el AA, polifenoles, β -caroteno y α -tocoferol, han sido reconocidos como importantes antioxidantes en macroalgas y pastos marinos (Collén y Davison, 1999b; Aguilera et al., 2002; Collén et al., 2003).

Diversos estudios relacionan los indicadores de estrés oxidativo con los patrones de distribución vertical. Las macroalgas distribuidas en la zona intermareal están expuestas a condiciones cambiantes y estresantes, tales como alta radiación, desecación, salinidad, y temperaturas. El exceso de irradiación sobreexcita las clorofilas del fotosistema II (FSII) permaneciendo en estado triplete durante un tiempo, incrementando la posibilidad de reaccionar con el O_2 lo que favorece la inversión de spin que da origen al $^1\text{O}_2$ (Asada, 1999; Golding y Johnson, 2003). La formación de ERO por cambios en la salinidad resulta de la variación en el

potencial hídrico afectando la distribución de iones y la permeabilidad de las membranas celulares (D'Autréaux y Toledano, 2007). Estos factores ambientales aumentan la producción de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 en las macroalgas que habitan la zona intermareal y, a la par, se observa una mayor actividad de las enzimas antioxidantes (e.g. SOD, APx, GR) y un incremento en el contenido de carotenos y polifenoles que en aquellas distribuidas a mayor profundidad, donde las condiciones ambientales son más estables (Burritt et al., 2002; Nissa et al., 2004; Pearson y Davison, 1994).

La radiación solar (visible y ultravioleta (UV)) y el incremento de ésta en el verano resultan en la generación de ERO en macroalgas y pastos marinos (Aguilera et al., 2002; Dummermuth et al., 2003; Rosa et al., 2002). Aguilera et al. (2002) reportaron cambios en la concentración de algunos pigmentos fotosintéticos, así como la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GR en seis especies de macroalgas en relación a la variación estacional en el régimen de radiación solar y en los niveles de macronutrientes en Kongsfjord, Noruega. Durante el verano, la mayoría de las especies presentaron mayor actividad antioxidante, como resultado del incremento en la actividad fotosintética y en la producción de ERO (Aguilera et al., 2002). En las macroalgas rojas *Mastocarpus stellatus* y *Chondrus crispus* se observaron variaciones estacionales en la concentración y actividad de varias moléculas antioxidantes, con un incremento en la actividad de SOD, APx y GR durante el invierno en respuesta a temperaturas cercanas al punto de congelación (1.1-4.1°C) (Lohrmann et al., 2004). La respuesta antioxidante y, por ende, la capacidad de detoxificar ERO también puede estar asociada a factores biológicos incluyendo especie, morfología e historia de vida de cada organismo (Aguilera et al., 2002; Lohrmann et al., 2004). Lohrman et al. (2004), al analizar las diferencias en la respuesta antioxidante entre *C. crispus* y *M. stellatus*, reportan una mayor actividad de SOD y APx, y en general de todas las enzimas antioxidantes durante el invierno en *C. crispus*; mientras que *M. stellatus* presenta mayor actividad enzimática durante el verano, así como mayor contenido de AA en comparación con *C. crispus*. Estas

diferencias las asocia a las diferencias morfológicas entre las dos especies, así como a la presencia de otros compuestos que les confieren resistencia contra las adversidades ambientales como es la presencia de crioprotectores. Por otro lado, la senescencia se ha relacionado con niveles altos de peroxidación de lípidos, resultado de la degradación de varias macromoléculas; acompañada por un aumento en la actividad de SOD, APX y CAT (Chakrabarty et al., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Bahía Magdalena, como parte del complejo lagunar Bahía Magdalena-Almejas, es considerada como uno de los sistemas lagunares más importantes del noroeste de México, debido a la alta productividad biológica. La vegetación marina en esta zona desempeña un papel importante al proporcionar hábitat y alimento a diversas especies incluyendo cuatro especies de tortugas marinas, aves y varias especies de peces de interés comercial. Si bien existen un par de estudios sobre la bioacumulación de elementos traza en las macroalgas marinas de este sistema (Rodríguez-Meza, 2004; Riosmena-Rodríguez et al., 2010), se desconoce el efecto que estas concentraciones pudieran tener en las macroalgas a nivel fisiológico. El estudio de la interacción del contenido de elementos traza con el sistema antioxidante en relación a factores bióticos y abióticos en macroalgas ayudará a comprender y elucidar la función de los metabolitos (enzimas y compuestos antioxidantes de interés comercial) encargados de proteger a estos organismos contra una sobreproducción de ERO. Siendo que las macroalgas son la base de la cadena alimenticia, es posible que la cantidad y variedad de los elementos traza, vitaminas y antioxidantes presentes en éstas, sean transferidas a los niveles tróficos superiores contribuyendo, de alguna forma, al estado de salud del ecosistema. Aunado a lo anterior, las macroalgas actualmente están siendo utilizadas como fuentes directas de alimento y antioxidantes para consumo humano en otras partes del planeta. Dado el potencial uso comercial de estos recursos en la región es importante obtener información acerca de la dinámica del sistema antioxidante.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variación temporal y espacial del sistema antioxidante y elementos traza en macroalgas y pasto marino en Bahía Magdalena.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la variación temporal en la concentración de elementos traza (Se, Zn, Fe, Cu, Cd, y Pb) en las macroalgas y pasto marino en Bahía Magdalena.
- Analizar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), y glutatión reductasa (GR) en macroalgas y pasto marino de Bahía Magdalena en diferentes épocas del año.
- Determinar y establecer valores referenciales en el contenido de antioxidantes no enzimáticos (ácido ascórbico y polifenoles) en macroalgas y pasto marino en Bahía Magdalena.
- Cuantificar los niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) y carbonilos protéicos como indicadores del daño producido por especies reactivas de oxígeno (ERO) en las macroalgas y pasto marino en Bahía Magdalena.
- Evaluar la relación de la concentración de elementos traza en el contenido de antioxidantes no enzimáticos y la actividad de los antioxidantes enzimáticos entre las distintas especies de macroalgas y pasto marino.

5. HIPÓTESIS

Si la variación en las condiciones ambientales promueve la inducción del sistema antioxidante en las macroalgas, entonces la variabilidad espacio-temporal en las condiciones ambientales, así como en la concentración de elementos traza, se verá reflejada en la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de los antioxidantes no enzimáticos en macroalgas y pasto marino en Bahía Magdalena.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ÁREA DE ESTUDIO

El complejo lagunar de Bahía Magdalena-Almejas se localiza en la costa occidental del Océano Pacífico. Esta región comprende una área semidesértica, la cual se caracteriza por un clima muy seco, semiárido y con lluvias en verano. Bahía Magdalena está protegida por dos islas que sirven de barrera, Isla Margarita (Sureste) e Isla Magdalena (Noroeste). Esta laguna al presentar valores de temperaturas y salinidad más altos que los encontrados en el Océano Pacífico se considera como una cuenca de evaporación con una situación antiestuarina durante todo el año (Álvarez-Borrego et al., 1975). La salinidad siempre es mayor de 34 ups y las máximas temperaturas superficiales del mar se presentan durante el verano y principios de otoño con un intervalo entre 25 y 30°C; las temperaturas más bajas se presentan a principios de primavera con un intervalo que va de 18 a 21°C (Lluch-Belda et al., 2000). Bahía Magdalena presenta zonas con gran cantidad de pastos marinos (*Zostera marina* y *Ruppia maritima*) (Sánchez-Rodríguez, 1989).

El complejo lagunar de Bahía Magdalena-Almejas, de acuerdo a sus condiciones morfológicas, se puede dividir en tres zonas diferenciadas: zona noroeste o zona de canales, zona central denominada específicamente Bahía Magdalena y zona

sureste o también llamada Bahía Almejas. La zona noroeste y la zona central se comunican a través del Canal de San Carlos, el cual tiene una profundidad de 12 metros (Álvarez-Borrego et al., 1975). La zona noroeste está compuesta por esteros, lagunas y canales cuya profundidad promedio es de 3.5 m aproximadamente. Al ser zonas de menor profundidad, presentan gradientes hidrológicos con valores máximos de salinidad y temperatura en los sitios más distantes de las bocas (Lluch-Belda et al., 2000 Koch et al., 2007). Los sitios de muestreo se localizan dentro del Estero Banderitas, el estero más grande de toda la zona con un área de casi 42 km² precisamente en la parte noroeste del complejo lagunar (Lluch-Belda et al., 2000). Las mareas influyen de manera similar a todo el complejo lagunar, con mareas mixtas semidiurnas con dos pleamares y dos bajamares (24.8 h). La pleamar media superior es de 0.83 m y cerca de 1.5 m en la pleamar máxima (Obeso-Nieblas et al., 1999). Las mareas más amplias se dan en invierno y las más bajas en verano. Por otro lado, la frecuencia de lluvia es baja, ya que es ausente en primavera e inicio de verano. La mayor precipitación, originada por depresiones ciclónicas, se observa a partir de septiembre (Mendoza-Salgado y Lechuga-Devéze, 1996). En términos generales, en el complejo lagunar los vientos dominantes son del noroeste en todo el año (Mendoza-Salgado y Lechuga-Devéze, 1996). Si bien el impacto antropogénico hasta el momento no ha sido evaluado a detalle en Bahía Magdalena, el sistema no está exento de una posible afectación en sus niveles naturales. Debido a su alta productividad biológica, Bahía Magdalena es considerada como una de las zonas pesqueras más importantes de la región, en donde la demanda de los recursos pesqueros es considerable y las actividades turísticas han presentado un incremento en años recientes. Adyacente al área de estudio se localiza la población en crecimiento de Puerto San Carlos, en el cual se encuentra una termoeléctrica e instalaciones de una empresa enlatadora de sardina y atún (Guzmán, 1998).

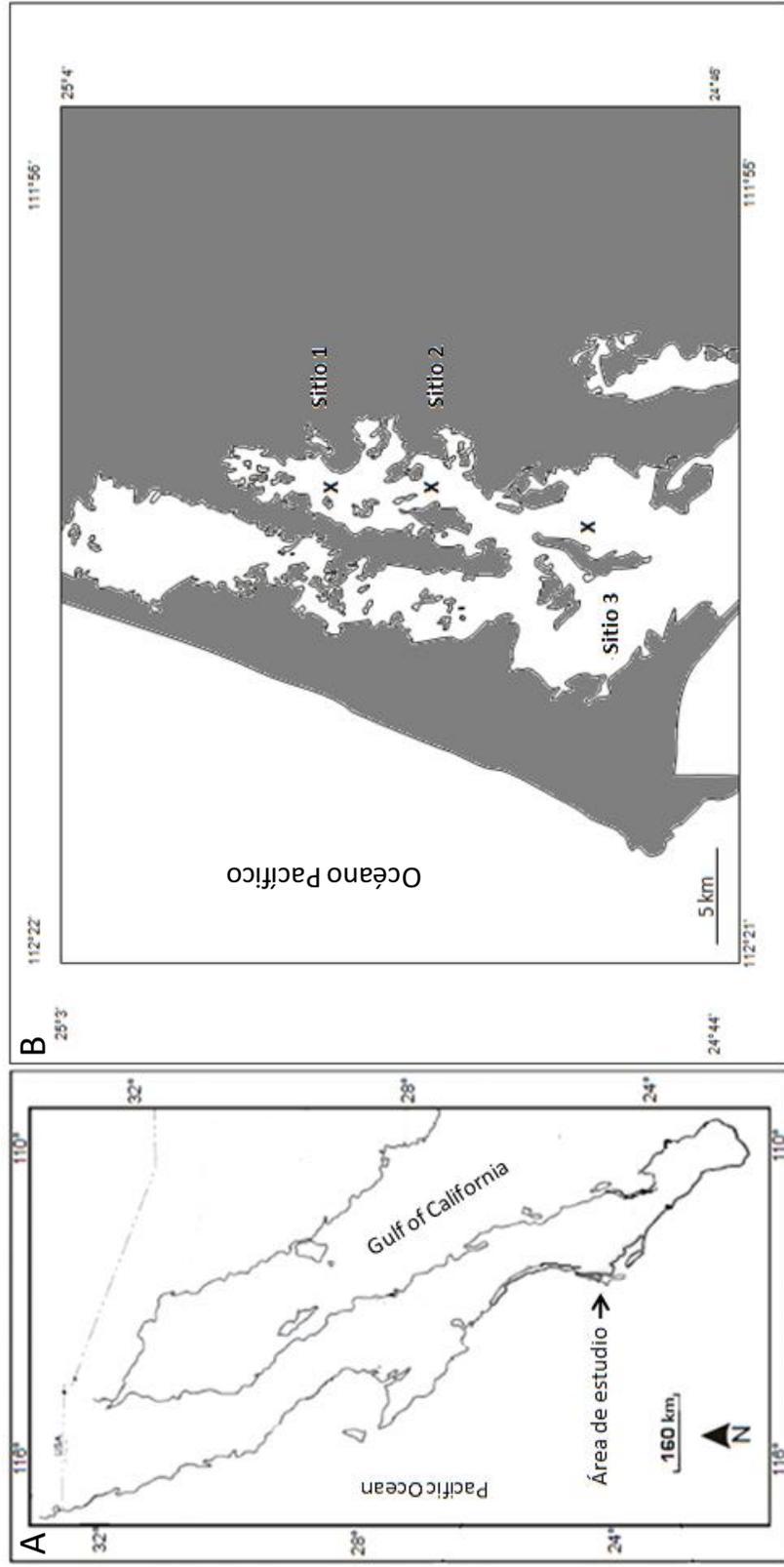


Figura 3.A) Zona de muestreo. B) Estero Banderitas ($24^{\circ} 15' - 25^{\circ} 20' N$ y $112^{\circ} 15' W$) localizado en el complejo lagunar Bahía Magdalena-Almejas. Sitio 1; La Estufa, Sitio 2: El Conchalito, Sitio 3: La Boca.

6.2 TRABAJO DE CAMPO

Las muestras de macroalgas se recolectaron en el Estero Banderitas durante noviembre del 2009 y febrero, abril y junio del 2010. Las macroalgas se seleccionaron con base en su relevancia ecológica, al formar parte de los recursos alimenticios de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) en esta zona. El estero se dividió en tres sitios de acuerdo a su gradiente de profundidad: La Boca (~12 m), El Conchalito (~7m) y La Estufa (~1 m), de mayor a menor profundidad, respectivamente. La búsqueda de las macroalgas se hizo mediante recorridos en una embarcación con motor fuera de borda buscando sitios con abundancia en macroalgas y pastos marinos. En cada uno de los sitios, la colecta se hizo con ayuda de equipo SCUBA y de manera manual. Los puntos de colecta se presentan en la Figura 3. Las macroalgas se guardaron en bolsas de plástico negras, se mantuvieron en frío en hieleras para su transportación al CIBNOR. En cada sitio de colecta se tomó la temperatura superficial, la concentración de oxígeno disuelto, y la profundidad en la que se tomaron los ejemplares (Tabla I).

6.3 TRABAJO DE LABORATORIO

Las macroalgas fueron identificadas a nivel especie en el laboratorio de macroalgas, con ayuda de claves taxonómicas de Abbot y Hollenberg (1976) y observación de su morfología externa, interna y reproductiva mediante un microscopio óptico en el Laboratorio de Macroalgas Marinas del CIBNOR. Las muestras se limpiaron con agua marina para retirar epifitas y arena.

6.3.1 ELEMENTOS TRAZA

Para la determinación de las concentraciones de los elementos traza (Pb, Cd, Cu, Zn, Fe y Se), las muestras de macroalgas y pasto marino fueron secadas en un horno a una temperatura constante de 60°C durante 48 horas. Una vez secas, éstas fueron molidas y guardadas en bolsas de papel a temperatura ambiente

hasta su análisis. Se pesaron aproximadamente 0.5 g de cada muestra, así como del estándar TORT-2 (hepatopáncreas de langosta, Consejo Nacional de Investigación, Canadá). Para el proceso de digestión, las muestras y el estándar se colocaron en matraces donde se mezclaron con 5 mL de ácido nítrico (HNO_3) al 70% y 2 mL de H_2O_2 ; además, se utilizó un matraz conteniendo sólo HNO_3 y H_2O_2 como blanco. Los matraces se colocaron dentro de un horno de microondas (CEM MARS 5x, Matthews, NC, USA) con temperatura y presión controladas hasta disolver la materia orgánica en su totalidad. Una vez terminada la hidrólisis, los matraces se aforaron a 50 mL para su posterior análisis utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (GBC Avanta, Australia). Cada muestra se analizó por triplicado y se obtuvo un valor promedio de absorción con el software Avanta versión 1.33. Con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones de metales en mg kg^{-1} en peso seco (ps) de muestra.

La determinación de Se se realizó en el Laboratorio de Toxicología de Vida Silvestre en la Universidad de Alaska Fairbanks. Se tomaron 2 mL (aproximadamente 2 g) del producto de la primera digestión, a los cuales se les adicionó 3 mL de agua destilada y 5 mL de HCl 37% (OmniTrace). Para la siguiente digestión se utilizó un horno de microondas (Perkin Elmer Multiwave 300 Microwave Sample Preparation System, Anton Para, Austria, Europa). La muestra digerida se envasó en viales de plástico y se aforó con agua destilada a 20 mL. La concentración se determinó utilizando un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer Instruments, Shelton, CT, USA) mediante el sistema de flujo de inyección (Flow Injection Analysis System 100, (FIAS 100)) con automuestreador. Los resultados se expresaron como mg kg^{-1} en peso seco (ps) de muestra.

6.3.2 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Previo a la determinación de la actividad enzimática, 0.28 g de cada muestra de macroalgas y pasto marino fueron homogenizados en frío con 1 mL de solución

amortiguadora de fosfato de potasio (50 mM pH 7.0) conteniendo 1% polivinilpirrolidona (PVP), 1 mM PMSF y 0.25% Triton X-100. Los extractos fueron centrifugados a $15,292 \times g$ durante 10 minutos a 4°C (Collén et al., 2003; Nissa et al., 2004). El precipitado fue desechado y el sobrenadante utilizado inmediatamente para los análisis correspondientes. La actividad de las enzimas antioxidantes fue determinada por medio de espectrofotometría (Beckman-Coulter Du 800, Fullerton, CA, USA). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Superóxido Dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

Para cuantificar la actividad de SOD se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de $\text{O}_2^{\cdot-}$ el cual, en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) es reducido formando un producto llamado formazán cuyo cambio es detectado por espectrofotometría a 560 nm; la reducción del NBT es inhibida por la SOD (Suzuki, 2000). En una celda de plástico se mezcló la solución de trabajo (solución amortiguadora sodio-carbonato 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), xantina oxidasa (0.1 U mL^{-1} en sulfato de amonio 2 M) y solución para homogenizar (blanco) o la muestra. El cambio en la absorbancia fue registrado cada 30 segundos durante 5 minutos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm. La actividad enzimática se expresó en unidades de SOD mg^{-1} proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la reacción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ con el NBT.

Glutación Peroxidasa (GPx) (EC 1.11.1.9)

La GPx cataliza la reacción del H_2O_2 con GSH; el análisis de la actividad de GPx se basa en el decremento continuo de NADPH al mantener constantes los niveles de GSH (Folheé y Günzler, 1984). Todas las soluciones y las muestras fueron colocadas en hielo, a excepción de la solución amortiguadora de fosfatos (500 mM) la cual se mantuvo a temperatura ambiente. Se mezcló en una celda de

cuarzo solución amortiguadora de fosfatos, solución de EDTA (50 mM), solución de azida de sodio (NaN_3) (20 mM), GR (15 U mL^{-1}), NADPH (1.5 mM) y agua desionizada fría. La absorbancia fue registrada a 340 nm. A la celda anteriormente preparada, se le agregó GSH (250 mM), la muestra y solución de H_2O_2 (10mM). Se registró el cambio en la absorbancia a 340 nm cada 3 segundos durante 40 segundos. La actividad enzimática se expresó como U GPx mg^{-1} proteína. Una unidad de actividad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida $1 \mu\text{mol}$ de NADPH min^{-1} .

Glutación S-Transferasa (GST) (EC 2.5.1.18)

La actividad de GST se determinó a partir de la aparición de tioéter glutación dinitrobenzeno como producto de la reacción entre GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig y Jakoby, 1981). Todas las muestras y las soluciones se mantuvieron en hielo. En una celda de cuarzo se mezcló la solución de corrida (solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, GSH 10 mM, EDTA 60 mM), solución de CDBN (10 mM) y la muestra. Se registró la absorbancia a 340 nm cada 30 segundos durante 6 minutos. La actividad enzimática se expresó como U GST mg^{-1} proteína. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de $1 \mu\text{mol}$ del producto min^{-1} .

Glutación Reductasa (GR) (EC 1.6.4.2)

La actividad de la enzima GR se determinó monitoreando la oxidación de NADPH por GSSG a 340 nm (Goldberg y Spooner, 1987). Todas las soluciones y las muestras fueron colocadas en hielo, a excepción de la solución amortiguadora de fosfatos (500 mM) la cual se mantuvo a temperatura ambiente. Se mezcló en una celda de cuarzo solución amortiguadora de fosfatos, solución de EDTA (50 mM), NADPH (2 mM), agua desionizada, la muestra, GSSG (10 mM) y se registró el cambio en la absorbancia durante 60 segundos a 340 nm. La actividad enzimática

se expresó como U GR mg^{-1} proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un $1\ \mu\text{mol}$ de GSSG min^{-1} .

6.3.4 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Fenoles totales

La concentración de fenoles totales se determinó a partir de su capacidad para reaccionar con agentes oxidantes produciendo compuestos de coloración azul en proporción al número de grupos hidroxilo en la molécula. Se utilizó el método descrito por Singleton y Rossi (1965) adaptado a microplaca. Un gramo de muestra fresca fue homogenizada en tubos ámbar con 1 mL de mezcla de agua:metanol:acetona (2:3:5). Los tubos fueron colocados en un baño de agua a 65°C con agitación por una hora. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó durante 10 minutos a $15,292 \times g$ a temperatura ambiente. Se preparó una curva estándar con una solución de ácido gálico ($1\ \text{mg mL}^{-1}$) en un rango de concentración de $0\text{-}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$. En cada pozo se mezcló la muestra o el ácido gálico (curva estándar), el reactivo de Folin-Ciocalteu, solución de Na_2CO_2 al 2% y solución de NaOH al 0.4%. Se dejó incubar en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente, y se leyó a una longitud de onda de 750 nm en un analizador semiautomático (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlandia). Los resultados se calcularon a partir de la absorbancia de las muestras y de la curva estándar. Los valores se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE) en mg g^{-1} de peso fresco de macroalga o pasto marino.

Ácido ascórbico (Vitamina C)

Para cuantificar la concentración de vitamina C se utilizó el método descrito por Ledezma-Gairard (1965) y Carbajal et al. (1997) con modificaciones, utilizando la técnica de HPLC. Para la extracción se pesó 0.1 g de muestra liofilizada en tubos Eppendorf®, y se homogenizó con 1 mL de solución de extracción (ácido metafosfórico 3%, EDTA 1:1 v/v) en un baño de hielo. Una vez homogenizada la

muestra, se dejó reposar durante 45 minutos en la oscuridad a 4°C. Posteriormente, la muestra fue centrifugada durante 15 minutos a $23,985 \times g$ a 4°C. El sobrenadante fue recuperado a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm (VWR International, USA). El extracto filtrado, previo a la inyección en el equipo, se mantuvo en oscuridad y en hielo hasta su análisis. 10 μL de muestra o de la curva estándar fueron inyectados a una columna C18 Hypersil BDS (5 μm por 250 mm * 4.5 mm de diámetro interno), y usando un sistema de fases de separación por gradiente (fase A: agua a pH de 2.4 ± 0.1 con H_2SO_4 ; fase B: acetonitrilo 100% grado HPLC) con un flujo de 1 mL min^{-1} . Éste se monitoreó mediante un detector de matriz de fotodiodos a 245 nm, con un tiempo de retención de 6.7 minutos. La curva de calibración se construyó con AA en un rango de concentración de 5.0-200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Los resultados se calcularon a partir de la curva de calibración y se expresaron en mg AA g^{-1} de peso fresco.

6.3.5 DAÑO OXIDATIVO

Peroxidación de lípidos (TBARS)

La concentración de malondialdehído (MDA) se mide como indicador de la peroxidación de los lípidos en la membrana celular para evaluar el daño por estrés oxidativo. Los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS por sus siglas en inglés) formando un pigmento rosa cuya absorción máxima se observa a 532-535 nm (Persky et al. 2000). Se preparó una curva estándar con solución 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) en un rango de 0-5 nmoles. En tubos eppendorf se colocó la muestra, y se incubó en un baño de agua a 37°C con agitación junto con la curva estándar durante 15 minutos. Una vez concluido este tiempo, los tubos fueron colocados en un baño de hielo adicionando a cada tubo ácido tricloroacético (TCA 1 M) para detener la reacción. Inmediatamente, se le adicionó a cada tubo solución de TBA al 1%. Los tubos fueron colocados en un baño de agua a 90°C con agitación por 10 minutos, y posteriormente se introdujeron en un baño de hielo. Finalmente, fueron centrifugados a $955.8 \times g$ a 4°C durante 10

minutos. El sobrenadante recuperado se leyó en un lector de microplaca (Microlab 300, Vital Scientific, Holanda) a 532 nm. Los resultados se calcularon a partir de la curva estándar y se expresaron en nanomoles de TBARS mg^{-1} de proteína.

Carbonilos protéicos

La cuantificación de los niveles de carbonilos protéicos se basó en la técnica de Levine et al. (1990) y Stadman y Levine (2000). Los grupos carbonilos se conjugan con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), y son precipitados con TCA (20%), obteniendo la absorbancia máxima entre 340 y 410 nm. 100 mg de muestra fueron homogenizados en ácido sulfosalicílico al 5%; posteriormente se dividió el homogenizado en cuatro alícuotas iguales y fueron centrifugadas durante 5 minutos a $17,947 \times g$ a 4°C . El sobrenadante fue desechado. A dos de estas alícuotas se les agregó DNPH (10 mM), y a las dos restantes se les agregó HCl (2 M) para utilizarlas como blanco. Los tubos fueron agitados e incubados durante una hora a temperatura ambiente; agitando durante 40 segundos cada 15 minutos. Al término del período de incubación se adicionó TCA (20 %) y los tubos se centrifugaron por 5 minutos a $17,947 \times g$. El sobrenadante fue desechado. El precipitado fue lavado con etanol: acetato de etilo (1:1), y nuevamente se centrifugó por 5 minutos a $17,947 \times g$; el procedimiento se repitió dos veces. Finalizados los lavados, se les adicionó guanidina (6 M) a los tubos, se agitaron, y se incubaron en un baño de agua durante 15 minutos a 37°C , y posteriormente fueron centrifugados a $17,947 \times g$ por 5 minutos. Los sobrenadantes recuperados se midieron en un espectrofotómetro, haciendo un barrido entre 340 y 410 nm, la absorbancia máxima fue registrada. Los resultados se expresaron como μmoles de carbonilos protéicos mg^{-1} de tejido.

6.3.6 PROTEINAS TOTALES

Se calculó la cantidad de proteínas solubles en los extractos de algas para estandarizar los resultados de las actividades enzimáticas. Se utilizó el kit comercial Bio-Rad, siguiendo el método descrito por Bradford (1976) adaptado a

microplaca. Este método se basa en que el colorante azul de Coomassie reacciona con los residuos de amino ácidos básicos presentes en la muestra. Se preparó una curva estándar con albumina sérica bovina en un rango de concentración de 0.005 a 0.2 mg mL⁻¹. En cada pozo de una microplaca se mezcló agua destilada, colorante de Bradford y la muestra o albumina (curva estándar). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 590 nm en un analizador semiautomático. Los resultados se expresan en mg de proteína mL⁻¹ de homogenizado.

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos son presentados como medias \pm error estándar. Previo a los análisis estadísticos, los datos fueron sometidos a pruebas de bondad de ajuste, incluyendo la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, y el análisis de homogeneidad de varianzas de Barlett (Zar, 1999). Al no cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se procedió a transformar los datos utilizando la fórmula de logaritmo natural, \ln (Zar, 1999). Los datos que no cumplieron la normalidad y homogeneidad de varianza con la transformación logarítmica fueron analizados en sus unidades originales utilizando estadística no paramétrica. Para detectar diferencias significativas entre especies, sitios y estaciones se aplicaron las pruebas paramétricas de varianza de una vía (ANOVA) y t de Student, y las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney (Zar, 1999). En caso de detectar diferencias, se aplicaron pruebas *post hoc* para comparaciones múltiples de Tukey y U de Mann Whitney (Zar, 1999). Las pruebas de correlación de Pearson fueron utilizadas para evaluar el tipo de relación de cada uno de los antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) con la concentración de elementos traza en las macroalgas y pasto marino. Se utilizó el análisis multivariado de análisis por factores (AF) para estudiar la estructura de correlación de las variables en el conjunto de datos. Se consideró $p \leq 0.05$ como

nivel de significancia estadística. Los análisis se realizaron utilizando los paquetes SYSTAT® Ver 12.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA), STATISTICA 9.0 y Excel ©.

7. RESULTADOS

7.1 ESPECIES COLECTADAS

Se colectaron un total de 9 especies de macroalgas y una de pasto marino en Bahía Magdalena entre noviembre del 2009 y junio del 2010. Las especies de macroalgas y pasto marino identificadas, así como los meses y sitios de colecta se observan en la Tabla II. La división Chlorophyta presentó el mayor número de especies, representada por cuatro especies, seguida de la división Rhodophyta con tres especies. Las divisiones Phaeophyta y Magnoliophyta estuvieron representadas por sólo una especie. La especie que presentó una mayor distribución en la zona, y a lo largo del estudio, fue *Gracilaria vermiculophylla*. La mayor diversidad de macroalgas se encontró en junio.

7.2 ELEMENTOS TRAZA

7.2.1 VARIACIÓN TEMPORAL EN LA CONCENTRACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA EN MACROALGAS MARINAS

Se determinó la concentración de los elementos traza Pb, Cd, Cu, Zn, Fe y Se en 35 muestras de macroalgas y pasto marino. La concentración de elementos (mg kg^{-1} de peso seco) en macroalgas colectadas en los diferentes meses y sitios de muestreo se resume en la Tablas II y III. Las macroalgas verdes presentaron mayor concentración de Pb, Fe y Cd en febrero, de Cu y Se en junio, y de Zn en abril. En el grupo de las macroalgas rojas, la mayor concentración de Cd y Cu se presentó en noviembre, mientras que las máximas concentraciones de Se se presentaron en febrero; la mayor concentración de Pb, Zn y Fe se observó en junio. En el pasto marino, las concentraciones máximas de los elementos Pb, Cd, Cu, Se y Zn se encontraron en el mes de abril en comparación con febrero y junio.

Tabla II. Listado de especies de macroalgas y pasto marino recolectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.

Grupo	Especie	2009- 2010	La Estufa	Conchalito	Boca
Rhodophyta	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	noviembre	-	X	X
		febrero	X	X	X
		abril	X	X	-
		junio	X	X	X
	<i>Gracilaria textorii</i>	noviembre	-	X	-
		febrero	-	X	X
		abril	-	X	-
	<i>Hypnea cervicornis</i>	junio	-	-	X
		noviembre	-	X	-
		febrero	-	-	-
		abril	-	X	-
		junio	-	X	X
Chlorophyta	<i>Caulerpa sertularioides</i>	noviembre	-	X	-
		febrero	-	-	-
		abril	X	X	-
	<i>Codium amplivesiculatum</i>	junio	X	-	X
		noviembre	-	-	-
		febrero	-	-	-
	<i>Codium cuneatum</i>	abril	-	-	X
		junio	-	-	X
		noviembre	-	-	-
		febrero	X	X	-
		abril	X	X	-
		junio	X	-	X
	<i>Ulva lactuca</i>	noviembre	-	-	X
		febrero	-	-	-
		abril	-	-	X
junio		-	-	X	
noviembre		-	X	-	
Phaeophyta	<i>Dyctiota flabellata</i>	febrero	X	X	X
		abril	X	X	-
		junio	-	-	-
Magnoliophyta	<i>Zostera marina</i>	noviembre	-	-	-
		febrero	-	-	X
		abril	-	-	X
		junio	-	-	X

(-) especies ausentes en la fecha de muestreo.

En el grupo de las macroalgas verdes la concentración promedio de Pb fue de 3.84 mg kg^{-1} . El valor máximo observado correspondió a *C. cuneatum* en el Conchalito en febrero (15.64 mg kg^{-1}). Dentro del grupo de las macroalgas rojas la concentración promedio de Pb fue de 1.85 mg kg^{-1} ; *G. vermiculophylla* en junio en La Estufa presentó el valor máximo de este elemento. En el pasto marino la concentración promedio de Pb fue de 0.52 mg kg^{-1} , el máximo valor se encontró en abril con una concentración de 1.51 mg kg^{-1} .

La concentración promedio de Zn para el grupo de macroalgas verdes fue de 17.99 mg kg^{-1} . En febrero, *C. cuneatum* colectada en La Estufa presentó el máximo valor de este elemento. En las macroalgas rojas el promedio de concentración para este elemento fue de 13.48 mg kg^{-1} , la especie *G. vermiculophylla* presentó la máxima concentración en El Conchalito en abril. En el pasto marino la concentración promedio de Zn fue de 13.49 mg kg^{-1} ; el máximo valor se encontró en abril con una concentración de 17.27 mg kg^{-1} .

La concentración promedio de Fe en el grupo de las macroalgas verdes fue de $452.47 \text{ mg kg}^{-1}$. Para *C. cuneatum* la mayor concentración de Fe ($1118.49 \text{ mg kg}^{-1}$) se observó en febrero en el Conchalito. En las macroalgas rojas el promedio de concentración para este elemento fue de $193.20 \text{ mg kg}^{-1}$; *H. cervicornis* en noviembre en El Conchalito exhibió la mayor concentración de este elemento ($470.58 \text{ mg kg}^{-1}$). En el pasto marino la concentración promedio de Fe fue de 122.8 mg kg^{-1} , el máximo valor se encontró en abril con una concentración de $178.59 \text{ mg kg}^{-1}$.

Las macroalgas verdes tuvieron una concentración promedio de Cu de 2.59 mg kg^{-1} , mientras que la mayor concentración se observó en *C. sertularioides* en La Estufa durante el mes de junio con un valor de 12.06 mg kg^{-1} . El grupo de las macroalgas rojas exhibió una concentración promedio de $1.18 \text{ mg Cu kg}^{-1}$; *G. vermiculophylla* presentó la mayor concentración ($3.10 \text{ mg Cu kg}^{-1}$) en El Conchalito en noviembre. En el pasto marino la concentración promedio de Cu fue

de 2.04 mg kg^{-1} , el máximo valor se encontró en abril con una concentración de 4.68 mg kg^{-1} .

Para el Se la concentración promedio en las macroalgas verdes fue de 0.23 mg kg^{-1} ; *C. sertularioides* presentó la mayor concentración de este elemento (0.73 mg kg^{-1}) en El Conchalito en junio. Dentro del grupo de las macroalgas rojas el promedio de concentración de Se fue de 0.14 mg kg^{-1} ; *H. cervicornis* exhibió el máximo valor (0.17 mg kg^{-1}) en noviembre en La Boca. En el pasto marino la concentración promedio de Se fue de 0.07 mg kg^{-1} , el máximo valor se encontró en abril con una concentración de 0.074 mg kg^{-1} .

Finalmente, para Cd en el grupo de las macroalgas verdes la concentración promedio fue de 0.47 mg kg^{-1} ; el máximo valor se observó en febrero en *C. cuneatum* en el Conchalito. Dentro del grupo de macroalgas rojas la concentración promedio de Cd fue de 0.70 mg kg^{-1} ; el máximo valor se observó en *G. textorii* en El Conchalito en abril. En el pasto marino la concentración promedio de Cd fue de 1.12 mg kg^{-1} , el máximo valor se encontró en abril con una concentración de 2.51 mg kg^{-1} .

Tabla III. Concentración de elementos traza (mg kg⁻¹ peso seco) en macroalgas y pasto marino recolectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.

	Pb				Cd				Cu				
	N	F	A	J	N	F	A	J	N	F	A	J	N
LA ESTUFA													
Clorophyta													
<i>C. cuneatum</i>	*	*	8.43	9.22	*	*	< LD	< LD	*	*	3.06	0.89	*
<i>C. sertularioides</i>	*	*	< LD	< LD	*	*	< LD	< LD	*	*	0.18	12.06	*
Rhodophyta													
<i>G.vermiculophylla</i>	*	3.16	< LD	6.90	*	< LD	< LD	< LD	*	0.79	0.90	1.83	*
EL CONCHALITO													
Clorophyta													
<i>C. cuneatum</i>	*	15.64	3.05	*	*	3.76	1.78	*	*	2.18	0.16	*	*
<i>C. sertularioides</i>	0.06	*	0.31	8.10	< LD	*	0.31	1.59	*	< LD	0.74	5.77	7.27
Rhodophyta													
<i>G.vermiculophylla</i>	2.22	*	< LD	*	< LD	*	0.56	*	3.10	*	0.90	*	8.11
<i>G. textorii</i>	*	< LD	< LD	*	*	< LD	2.44	*	*	0.87	0.73	*	*
<i>H. cervicornis</i>	*	*	< LD	*	*	*	0.36	*	*	*	1.05	*	*
Phaeophyta													
<i>D. flabellata</i>	*	8.80	*	*	*	4.33	*	*	*	2.01	*	*	*
LA BOCA													
Clorophyta													
<i>C. cuneatum</i>	*	*	*	5.10	*	*	*	< LD	*	*	*	2.42	*
<i>C. sertularioides</i>	*	*	*	5.01	*	*	*	< LD	*	*	*	4.76	*
<i>U. lactuca</i>	3.26	*	0.65	1.13	< LD	*	< LD	< LD	1.71	*	4.70	0.67	25.06
<i>C. amplivesiculatum</i>	*	*	< LD	1.02	*	*	< LD	< LD	*	*	2.09	2.40	*
Rhodophyta													
<i>G.vermiculophylla</i>	*	*	*	1.13	*	*	*	< LD	*	*	*	0.74	*
<i>G. textorii</i>		1.51	*	2.82	*	1.48	*	1.77	*	1.50	*	1.82	*
<i>H. cervicornis</i>	4.30	*	*	*	1.68	*	*	*	0.81	*	*	*	7.88
Magnoliophyta													
<i>Z. marina</i>	*	< LD	1.51	< LD	*	0.43	2.51	0.45	*	0.62	4.68	0.85	*

Tabla III. Continuación.

	Zn				Fe				Se			
	N	F	A	J	N	F	A	J	N	F	A	J
LA ESTUFA												
Chlorophyta												
<i>C. cuneatum</i>	*	*	43.55	6.41	*	*	122.80	447.76	*	*	*	*
<i>C. sertularioides</i>	*	*	10.72	18.85	*	*	262.18	354.69	*	*	0.20	0.15
Rhodophyta												
<i>G.vermiculophylla</i>	*	4.58	8.31	12.26	*	152.86	410.98	291.63	*	0.24	0.03	*
EL CONCHALITO												
Chlorophyta												
<i>C. cuneatum</i>	*	17.98	12.22	*	*	1118.40	344.18	*	*	*	0.22	*
<i>C. sertularioides</i>	7.27	*	14.79	19.72	511.86	*	208.33	843.68	0.20	*	0.38	0.73
Rhodophyta												
<i>G.vermiculophylla</i>	8.11	*	40.54	*	156.12	*	61.51	*	0.08		0.07	*
<i>G. textorii</i>	*	15.71	8.38	*	*	129.69	50.3	*	*	*	0.11	*
<i>H. cervicornis</i>	*	*	6.95	*	*	*	348.80	*	0.17		0.10	*
Phaeophyta												
<i>D. flabellata</i>	*	14.08	*	*	*	560.11	*	*	*	0.91	*	*
LA BOCA												
Chlorophyta												
<i>C. cuneatum</i>	*	*	*	11.00	*	*	*	205.21	*	*	*	0.16
<i>C. sertularioides</i>	*	*	*	29.52	*	*	*	344.98	*	*	*	0.26
<i>U. lactuca</i>	25.06	*	13.34	19.18	204.54	*	79.52	355.50	0.10	*	0.03	0.21
<i>C. amplivesiculatum</i>	*	*	18.62	16.49	*	*	139.43	887.95	*	*	0.06	0.26
Rhodophyta												
<i>G.vermiculophylla</i>	*	*	*	9.87	*	*	*	68.93	0.07	0.30		0.11
<i>G. textorii</i>	*	22.80	*	16.40	*	92.95	*	84.06	*	*	*	0.19
<i>H. cervicornis</i>	7.88	*	*	*	470.58	*	*	*	*	*	*	
Magnoliophyta												
<i>Z. marina</i>	*	14.39	17.27	8.82	*	98.40	178.59	91.41	*	0.07	0.10	0.04

N, noviembre; F, febrero; A, abril; J, junio. Negritas: valores más altos de cada elemento por mes de colecta. <LD, por abajo del límite de detección. *, muestra no disponible.

7.3. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

División Rhodophyta

Durante el mes de noviembre en el Conchalito se encontró una mayor actividad de SOD en *G. vermiculophylla* en comparación con *G. textorii* y *H. cervicornis* ($p=0.0002$), así como una menor actividad de GST y GPx ($p=0.006$ y $p=0.003$, respectivamente) y una mayor actividad de GR ($p=0.006$) en *H. cervicornis* que en *G. textorii* y *G. vermiculophylla* (Fig. 4A y 5A). La actividad de SOD y GR fue mayor en las muestras de *G. vermiculophylla* colectadas en El Conchalito que en La Boca ($p=0.001$ y $p=0.042$, respectivamente) (Fig. 4A y 5A).

En febrero en El Conchalito no se encontraron diferencias significativas en la actividad de los indicadores de estrés oxidativo entre *G. vermiculophylla* y *G. textorii* (Figs. 4 y 5). En el mismo mes en la Boca, la actividad de SOD, GPx, y GR fue significativamente mayor ($p=0.002$, $p=0.013$, y $p=0.002$, respectivamente) y la de GST fue significativamente menor ($p=0.043$) en *G. textorii* que en *G. vermiculophylla* (Fig. 4A y 5A, B). En *G. vermiculophylla* en febrero la actividad de SOD fue significativamente mayor en La Estufa y en El Conchalito ($p=0.0009$) que en La Boca; la actividad de GST fue significativamente menor en las muestras colectadas en La Estufa que en aquellas colectadas en El Conchalito y La Boca ($p=0.013$). La actividad de GPx fue significativamente menor en los ejemplares de *G. vermiculophylla* colectados en La Boca que en aquellas del Conchalito ($p=0.020$). La actividad de GR fue significativamente mayor en *G. vermiculophylla* en las muestras de La Estufa que en aquellas pertenecientes a los otros dos sitios ($p=0.001$) (Fig. 5B).

En abril en El Conchalito se encontró mayor actividad de GR en *G. vermiculophylla* que en *G. textorii* y en *H. cervicornis* ($p=0.006$) (Fig. 5B). No se encontraron diferencias significativas en las actividades de SOD, GST, y GPx entre especies ($p=0.467$, $p=0.404$, y $p=0.081$, respectivamente). En *G. vermiculophylla* se encontró que la actividad de SOD, GR y GPx fue mayor en el Conchalito que en La Estufa ($p=0.003$, $p=0.015$, y $p=0.026$, respectivamente).

En junio en El Conchalito, la actividad de GPx fue significativamente mayor en *G. vermiculophylla* que en *H. cervicornis* ($p=0.049$); no se detectaron diferencias significativas entre especies para el resto de las enzimas. En este mes en La Boca, la actividad de SOD y GR fue mayor en *H. cervicornis* que en *G. vermiculophylla* y *G. textorii* ($p=0.017$ y $p=0.001$); la actividad de GST fue mayor en *G. textorii* en comparación con las otras dos especies ($p=0.035$) (Figs. 4 y 5). En este mismo mes, la actividad de SOD en *G. vermiculophylla* fue significativamente mayor en La Estufa ($p=0.0005$); mientras que, la actividad de GST y GPx fue menor en el Conchalito que en La Estufa y La Boca ($p=0.005$) (Figs. 4 y 5). En *H. cervicornis* la actividad de GPx y GR fue significativamente mayor en La Boca ($p=0.001$ y $p=0.028$, respectivamente) que en El Conchalito (Fig. 5).

Para evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre el sistema antioxidante de las macroalgas rojas, se hicieron comparaciones en cada uno de los sitios. En el Conchalito, *H. cervicornis* presentó una mayor actividad de GPx en abril ($p=0.0004$), y de GR en el mes de noviembre ($p=0.041$) (Fig. 5). En este mismo sitio, la actividad de GST en *G. textorii* fue significativamente mayor en noviembre en comparación con febrero y abril ($p=0.007$); no se detectaron diferencias en el resto de las enzimas. En La Boca *G. textorii* presentó una mayor actividad de GR en febrero ($p=0.004$); mientras que se detectó mayor actividad de GST y GPx en junio ($p=0.001$ y $p=0.041$) (Figs. 4 y 5).

Las muestras de *G. vermiculophylla* colectadas en La Estufa en junio, presentaron mayor actividad de SOD, GST y GPx que aquellas de febrero y abril ($p=0.00001$, $p=0.00004$, y $p=0.0001$, respectivamente) (Figs. 4 y 5). En El Conchalito, para *G. vermiculophylla* la actividad de SOD fue significativamente mayor en noviembre en comparación con los otros meses de muestreo ($p=0.001$) (Figs. 4 y 5). En La Boca, *G. vermiculophylla* presentó una mayor actividad de SOD y GR en junio en comparación con febrero y noviembre ($p=0.003$ y $p=0.014$, respectivamente); la actividad de GPx fue significativamente menor en febrero en comparación con el resto de los meses muestreados ($p=0.018$) (Figs. 4 y 5).

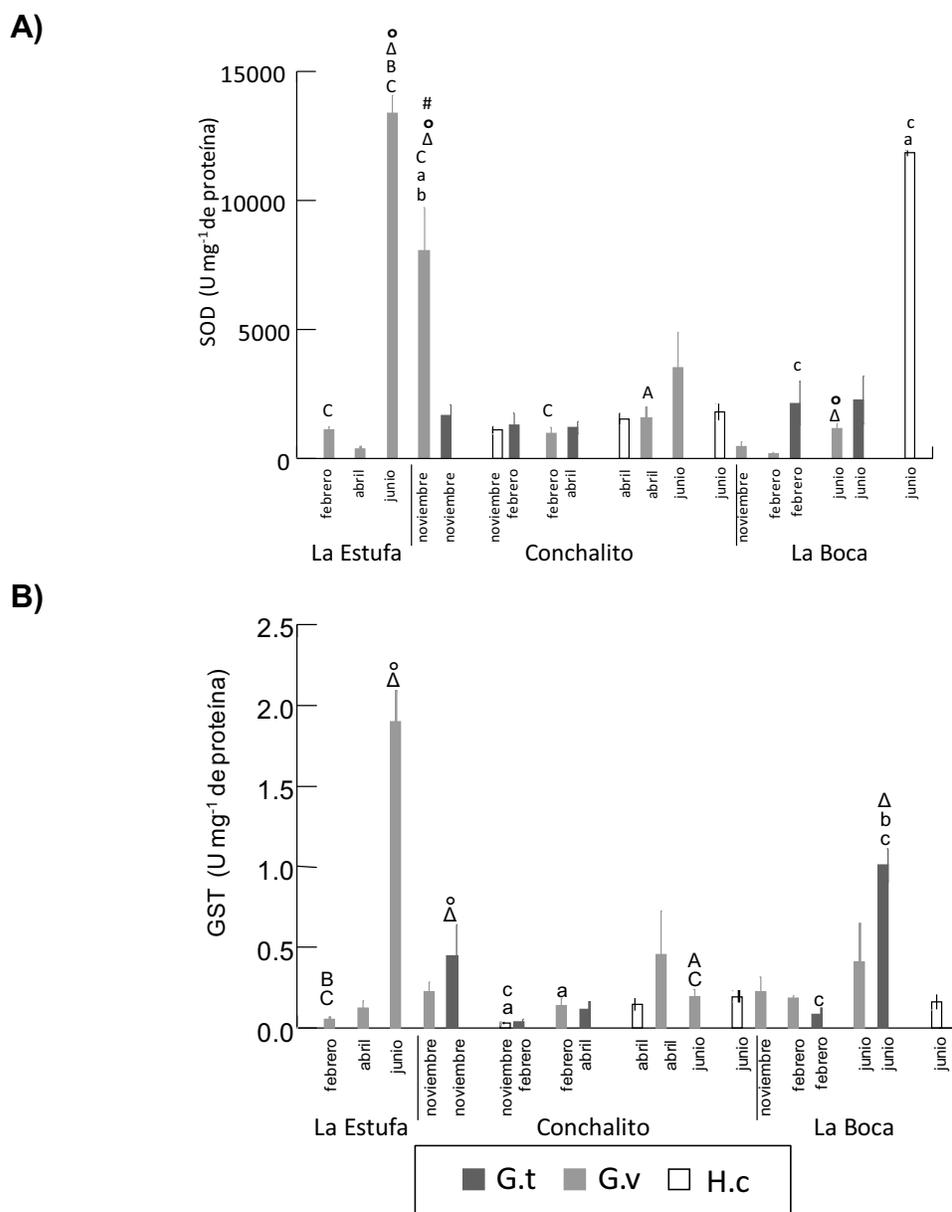


Figura 4. Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD) y B) glutatión S-transferasa (GST) en tres especies de macroalgas rojas (*Hypnea cervicornis*, H.c; *Gracilaria textorii*, G.t; *Gracilaria vermiculophylla*, G.v) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs G.t, (b) vs H.c, (c) vs G.v; letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) (A) vs La Estufa, (B) vs Conchalito, (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre meses de colecta (*) vs noviembre, (Δ) vs febrero, ($^\circ$) vs abril, (#) vs junio.

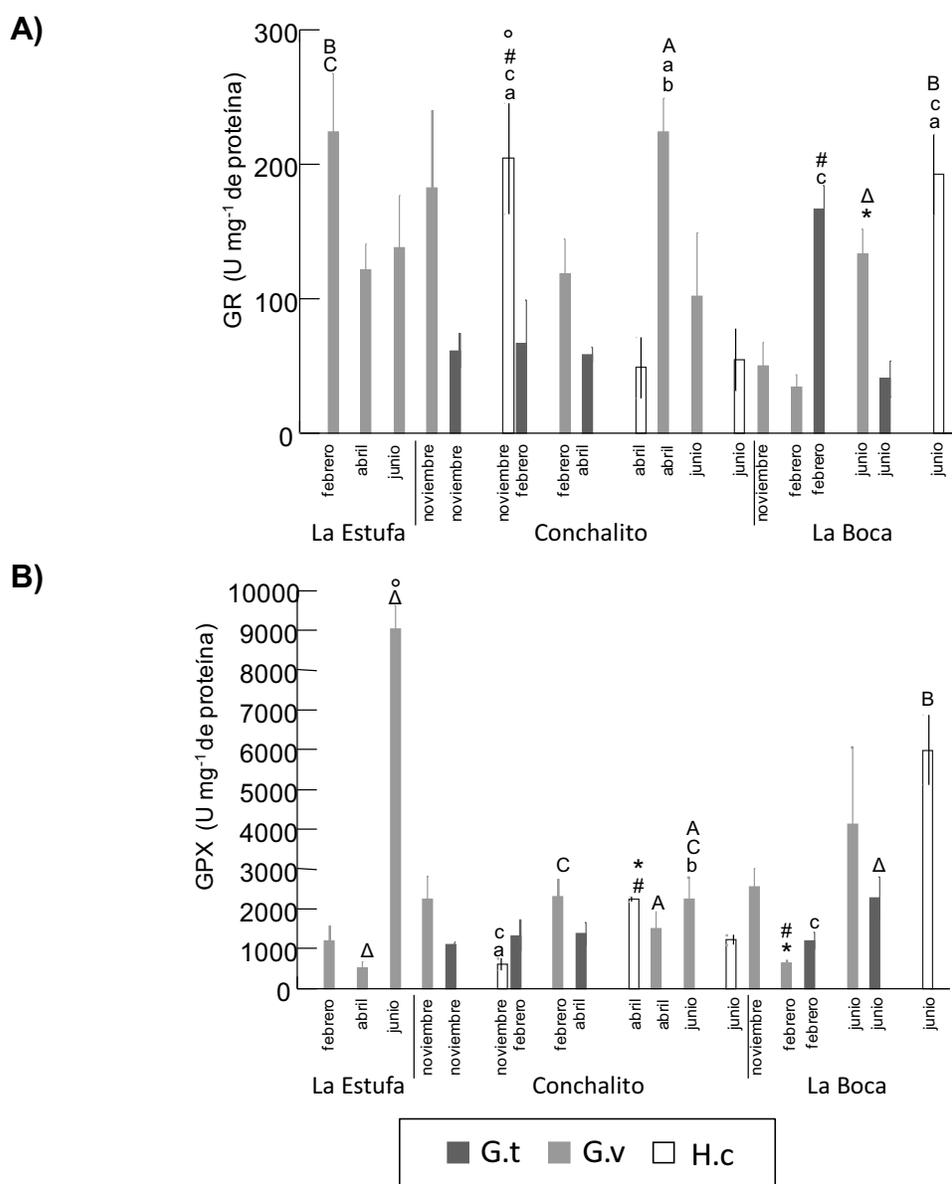


Figura 5. Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) glutatión reductasa (GR) y B) glutatión peroxidasa (GPx) en tres especies de macroalgas rojas (*Hypnea cervicornis*-H.c, *Gracilaria textorii*-G.t, *Gracilaria vermiculophylla*-G.v) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs G.t; (b) vs H.c; (c) vs G.v; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

División Chlorophyta

En febrero la actividad de SOD en *C. cuneatum* fue mayor en las muestras colectadas en La Estufa que en aquellas del Conchalito ($p=0.049$) (Fig. 6A). No se encontraron diferencias significativas en la actividad de GST ($p=0.867$), GPx ($p=0.216$), ni GR ($p=0.935$) entre sitios para esta especie (Figs. 6B y 7).

En abril en la Estufa se detectó mayor actividad de SOD y menor actividad de GPx en *C. cuneatum* que en *C. sertularioides* ($p=0.049$, y $p=0.047$, respectivamente); para el resto de las enzimas no se encontraron diferencias significativas entre especies (Figs. 6 y 7). En el mismo mes en el Conchalito, se detectó mayor actividad de SOD en *C. cuneatum* que en *C. sertularioides* ($p=0.049$), mientras que en la Boca la actividad de SOD, GST, y GPx fue significativamente mayor en *U. lactuca* que en *C. amplivesiculatum* ($p=0.049$, $p=0.0004$, $p=0.005$, respectivamente) (Figs. 6 y 7). En este mismo mes en *C. cuneatum* se encontró que la actividad de SOD, GST y GPx fue mayor en el Conchalito que en la Estufa ($p=0.049$, $p=0.016$, y $p=0.006$, respectivamente); no se encontraron diferencias significativas en la actividad de GR entre sitios ($p=0.929$) (Figs. 6 y 7).

En junio en la Estufa no se encontraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes entre *C. cuneatum* y *C. sertularioides* (Figs. 6 y 7). En La Boca, la actividad de GPx fue significativamente menor ($p=0.00001$), y la actividad de GR fue significativamente mayor en *C. amplivesiculatum* en comparación con *C. cuneatum* y *C. sertularioides* ($p=0.0001$) (Fig. 7B). En este mismo mes en las muestras de *C. cuneatum* la actividad de SOD y GPx fue significativamente mayor en La Estufa que en La Boca ($p=0.049$, y $P=0.025$, respectivamente); no se encontraron diferencias significativas en la actividad de GST, ni de GR ($p=0.541$, $p=0.747$, respectivamente) (Figs. 6 y 7). Para *C. sertularioides* se encontró que la actividad de SOD y GPx fue mayor en La Estufa en comparación con los otros dos sitios ($p=0.0439$, y $p=0.009$, respectivamente) (Figs. 6A y 7B).

Para evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre el sistema antioxidante de las macroalgas verdes, se hicieron comparaciones en cada uno de los sitios. En la Estufa, *C. cuneatum* presentó una mayor actividad de SOD, GST

y GPx en junio en comparación con febrero y abril ($p=0.049$, $p=0.010$, y $p=0.0001$, respectivamente) (Figs. 6 y 7B). En El Conchalito esta misma especie presentó una mayor actividad de SOD, GST, y GPx en abril en comparación con febrero ($p=0.049$, $p=0.021$, y $p=0.009$, respectivamente) (Figs. 6 y 7B). En este mismo sitio la actividad de SOD, GPX y GR en las muestras de *C. sertularoides* fue significativamente mayor en noviembre que en abril y junio ($p=0.0329$, $p=0.001$, y $p=0.005$, respectivamente). En La Boca, *U. lactuca* presentó una mayor actividad de SOD en noviembre que en abril y junio ($p=0.0273$), mayor actividad de GPX en abril que en noviembre y junio ($p=0.0001$) y de GST en abril que en junio y noviembre ($p=0.010$) (Figs. 6 y 7). En este mismo sitio *C. amplivesiculatum* presentó una mayor actividad de GST ($p=0.016$) en junio en comparación con abril, mientras que la actividad de GPx fue mayor en abril en comparación con junio ($p=0.013$) (Fig. 7B).

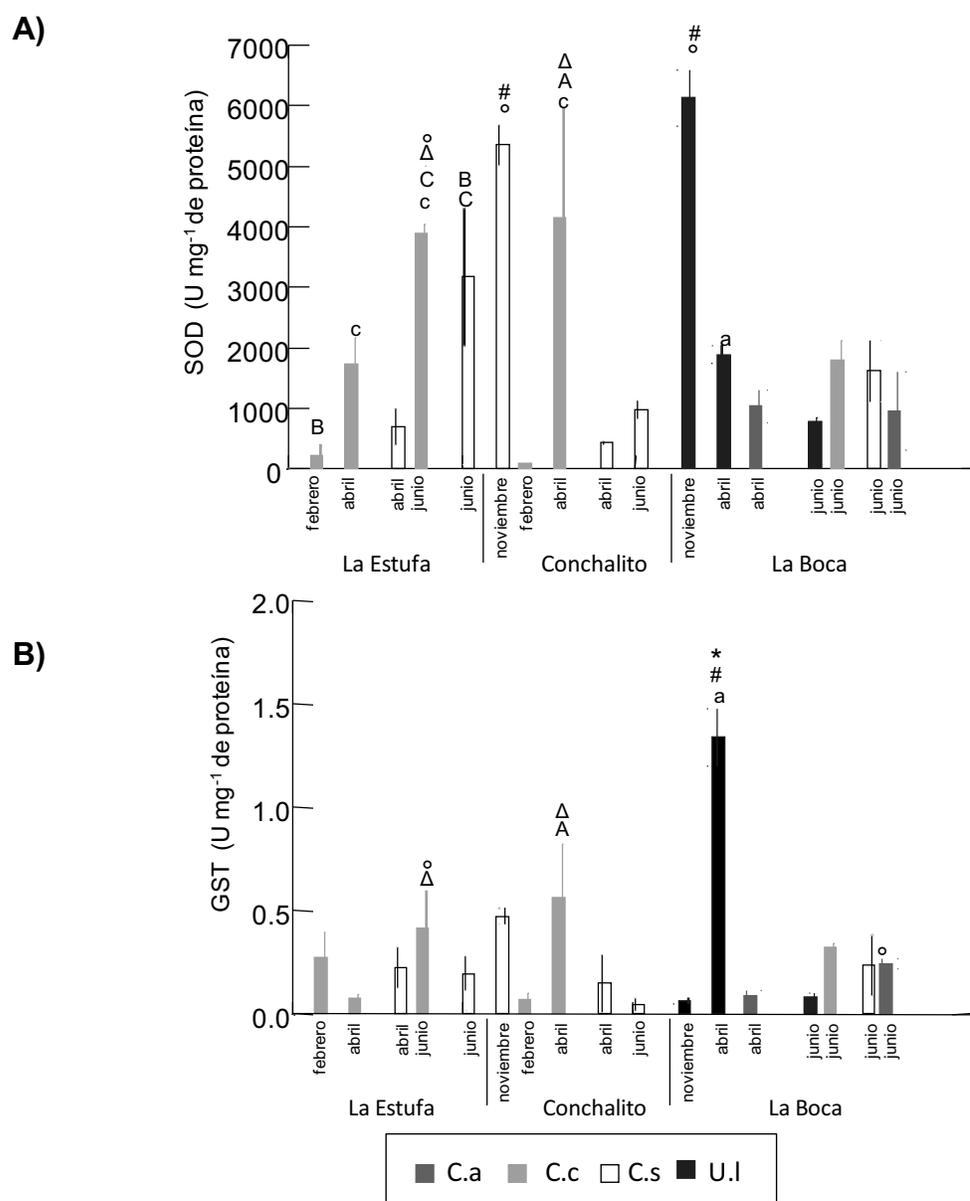


Figura 6. Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD) y B) glutatión S-transferasa (GST) en cuatro especies de macroalgas verdes (*Codium amplivesiculatum*-C.a, *Codium cuneatum*-C.c, *Caulerpa sertularioides*-C.s, *Ulva lactuca*-U.l) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs C.a; (b) vs C.c; (c) vs C.s (d) vs U.l; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

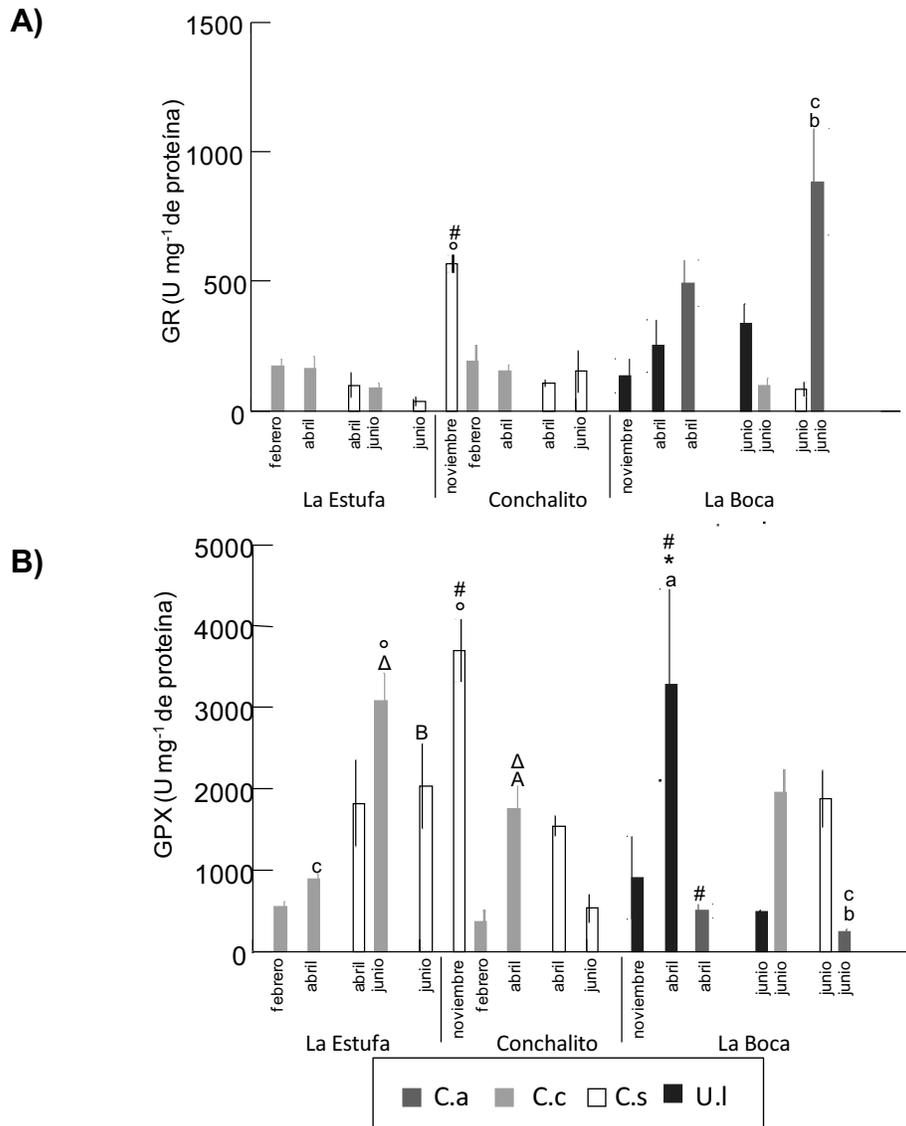


Figura 7. Actividad enzimática (unidades mg^{-1} de proteína) de A) glutatión reductasa (GR) y B) glutatión peroxidasa (GPx) en cuatro especies de macroalgas verdes (*Codium amplivesiculatum*-C.a, *Codium cuneatum*-C.c, *Caulerpa sertularioides*-C.s, *Ulva lactuca*-U.I) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs C.a; (b) vs C.c; (c) vs C.s (d) vs U.I; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

División Phaeophyta

En febrero, la actividad de las enzimas SOD y GPx fue significativamente mayor en las muestras de *D. flabellata* colectadas en La Estufa que en El Conchalito o La Boca ($p=0.001$, $p=0.0004$, respectivamente); la actividad de GR fue significativamente mayor en La Boca que en La Estufa y El Conchalito ($p=0.050$); la actividad de GST fue significativamente menor en El Conchalito en comparación con La Estufa y La Boca ($p=0.007$) (Fig. 8B). Durante abril, no se encontraron diferencias significativas entre sitios de colecta (La Estufa y El Conchalito) en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD ($p=0.990$), GST ($p=0.920$), GR ($p=0.99$), ni GPx ($p=0.787$) en las muestras de *D. flabellata* (Fig. 8).

Al evaluar la variabilidad temporal para *D. flabellata* colectada en El Conchalito, se encontró que las actividades de SOD y GPx fueron significativamente mayores durante los meses de noviembre y abril con respecto a febrero ($p=0.0001$); la actividad de GST fue menor durante febrero en comparación con noviembre ($p=0.016$), mientras que la actividad de GR fue significativamente mayor durante noviembre que en los otros dos meses ($p=0.0001$) (Fig. 8C). En La Estufa, para esta especie, se encontró una mayor actividad de SOD en abril que en febrero ($p=0.025$) (Fig. 8A).

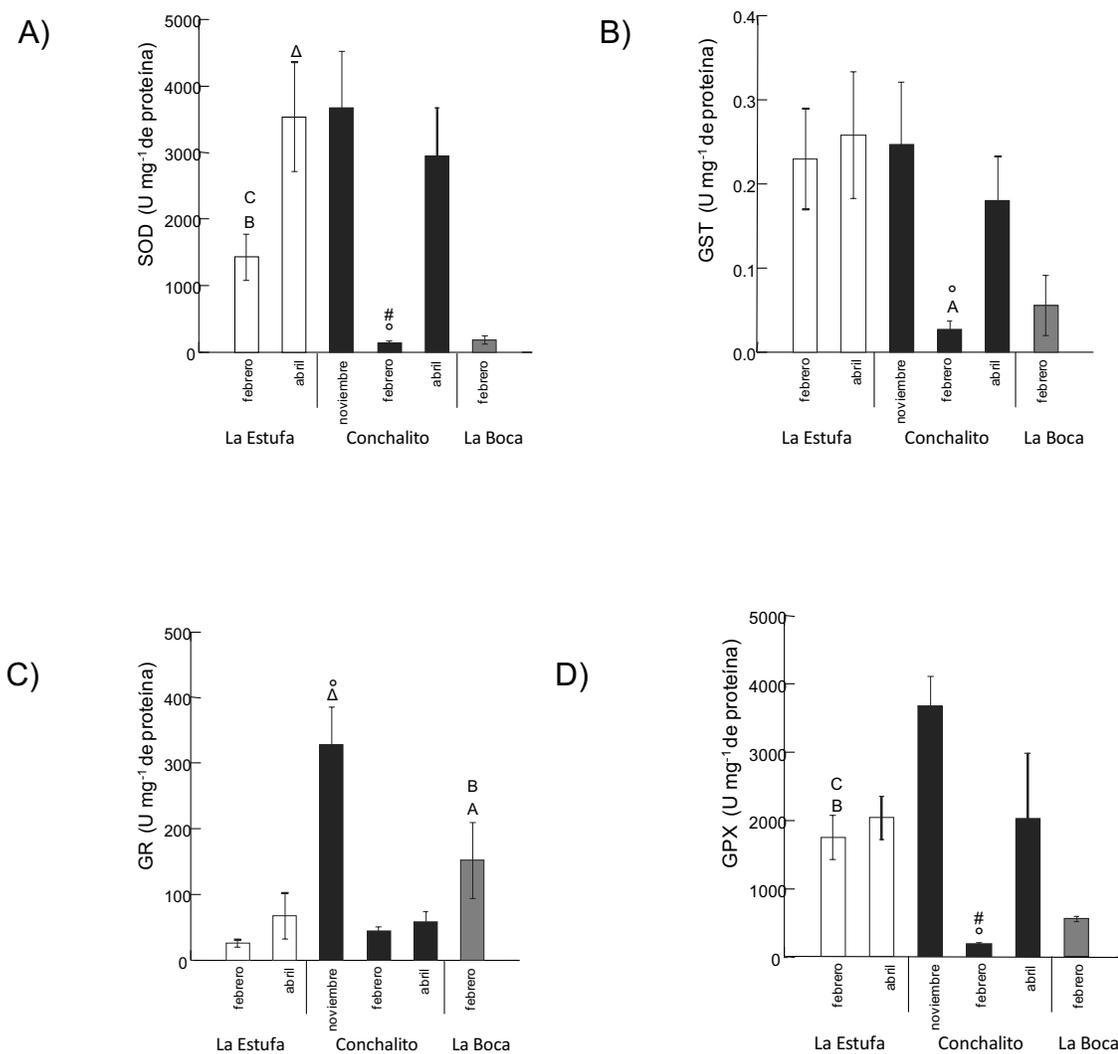


Figura 8. Actividad enzimática (unidades mg⁻¹ de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD), B) glutatión S-transferasa (GST), C) glutatión reductasa (GR), y D) glutatión peroxidasa (GPx) en *Dyctiota flabellata* colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a febrero del 2010. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Letras mayúsculas denotan diferencia significativa (p ≤ 0.05) entre sitios A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa (p ≤ 0.05) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; (°) vs abril; (#) vs junio.

Pasto marino

En el pasto marino *Z. marina* colectado en La Boca se encontró una mayor actividad de las enzimas SOD, GST y GR en junio con respecto a febrero y abril ($p=0.002$, $p=0.048$, $p=0.002$, respectivamente); no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima GPx entre los meses de colecta ($p=0.232$) (Fig. 9).

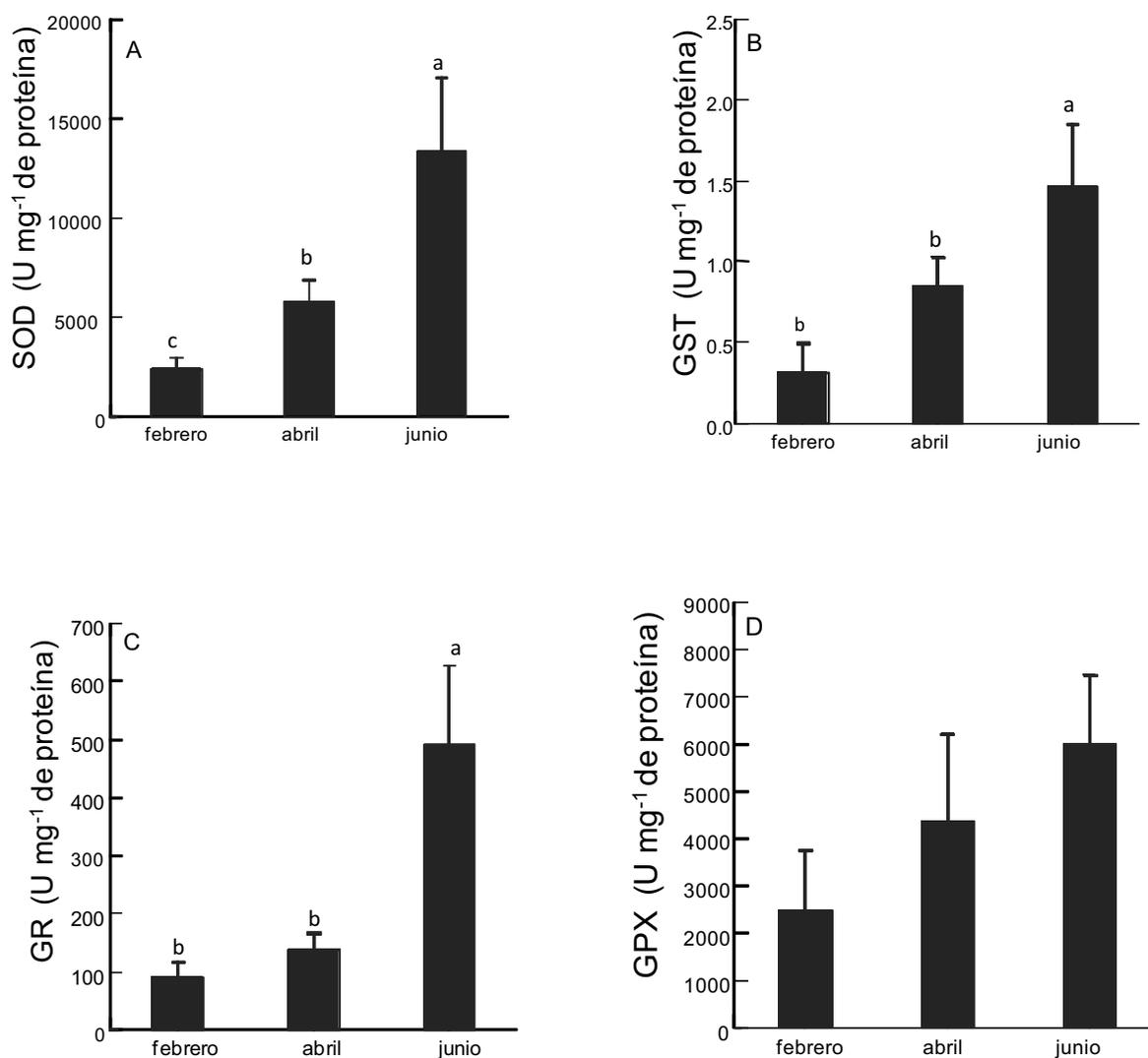


Figura 9. Actividad enzimática (unidades mg⁻¹ de proteína) de A) superóxido dismutasa (SOD), B) glutatión S-transferasa (GST), C) glutatión reductasa (GR), y C) glutatión peroxidasa (GPx) en el pasto marino, *Zostera marina*, colectado en La Boca, Bahía Magdalena, Baja California Sur. Los datos se presentan como media \pm error estándar. Las letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

7.4. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Los valores del contenido de polifenoles y vitamina C en los extractos obtenidos a partir de las muestras de macroalgas y pasto marino colectadas en diferentes sitios y meses de muestreo en Bahía Magdalena se muestran en las Tablas IV yV. El contenido de antioxidantes no enzimáticos analizado en las macroalgas varió de acuerdo al grupo. El contenido de polifenoles en el alga café y en el pasto marino exhibieron los valores más altos con $70.3 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ y $106.7 \mu\text{g GAE g}^{-1}$, respectivamente ($p=0.025$). Las macroalgas verdes tuvieron mayor contenido de vitamina C con una concentración promedio de 2.86 mg g^{-1} en comparación con el resto de los grupos ($p=0.0002$).

División Rhodophyta

Dentro del grupo de las macroalgas rojas, en noviembre en El Conchalito el contenido de polifenoles en *G. vermiculophylla* fue significativamente mayor que en *G. textorii* y *H. cervicornis* ($p=0.0001$). En junio en El Conchalito, el contenido de polifenoles fue mayor en *G. vermiculophylla* en comparación con *H. cervicornis* ($p=0.0007$); de manera similar, en La Boca el contenido de polifenoles fue significativamente mayor en *G. vermiculophylla* en comparación con *G. textorii* y *H. cervicornis* ($p=0.007$) (Tabla V).

Para evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre los antioxidantes no enzimáticos de las macroalgas rojas *G. vermiculophylla* y *G. textorii* se hicieron comparaciones en cada uno de los sitios. El contenido de polifenoles en *G. vermiculophylla* en El Conchalito en junio fue significativamente mayor en comparación con el resto de los meses muestreados (Tabla V). *G. textorii* en el Conchalito presentó los valores más bajos de polifenoles en noviembre en comparación con febrero y abril ($p=0.0001$); en La Boca, esta misma especie tuvo mayor contenido de polifenoles en febrero en comparación con junio ($p=0.0003$).

División Chlorophyta

En el grupo de las macroalgas verdes colectadas en noviembre, febrero y junio no se encontraron diferencias significativas en el contenido de vitamina C entre sitios ni entre especies (Tabla IV). En abril en El Conchalito *C. cuneatum* presentó mayor contenido de vitamina C en comparación con *C. sertularioides* ($p=0.0003$); mientras que en La Boca el contenido de la vitamina C en *C. amplivesiculatum* fue significativamente mayor en comparación con *U. lactuca* ($p=0.000001$). Cabe mencionar que la macroalga verde *C. amplivesiculatum* presentó los valores más altos de vitamina C en comparación con el resto de las especies analizadas (Tabla IV).

Para evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre el contenido de vitamina C de las macroalgas se hicieron comparaciones en cada uno de los sitios cuando los datos lo permitieron. *C. sertularioides* en El Conchalito presentó un mayor contenido de vitamina C en junio en comparación con abril ($p=0.0005$); por otro lado, el contenido de esta vitamina en *U. lactuca* en junio fue significativamente mayor en comparación con abril y noviembre ($p=0.020$) (Tabla IV).

Dentro del grupo de macroalgas verdes, en febrero no se detectaron diferencias en el contenido de polifenoles entre las muestras de *C. cuneatum* colectadas en La Estufa y el Conchalito ($p=0.702$); en abril en la Estufa se encontró un mayor contenido de polifenoles en *C. sertularioides* que en *C. cuneatum* ($p=0.024$). En este mismo mes en La Boca *U. lactuca* presentó menor contenido de polifenoles que *C. amplivesiculatum* ($p=0.041$). Se observó un mayor contenido de polifenoles en *C. sertularioides* en La Estufa que en El Conchalito ($p=0.007$) (Tabla V).

Tabla IV. Contenido de vitamina C (mg g^{-1} de tejido) en macroalgas y pasto marino colectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.

Grupo	Especie	Mes	Vitamina C		
			La Estufa	El Conchalito	La Boca
Rhodophyta	<i>G. vermiculophylla</i>	noviembre	-	1.24 ± 0.77	1.85 ± 0.29
		febrero	1.60 ± 0.04	1.24 ± 0.36	-
		abril	-	-	-
	<i>G. textorii</i>	febrero	-	1.61 ± 0.32	1.24 ± 0.47
		abril	-	1.20 ± 0.44	-
		junio	-	-	-
	<i>H. cervicornis</i>	noviembre	-	1.61 ± 0.13	-
		abril	-	1.19 ± 0.54	-
		junio	-	-	1.05 ± 0.61
Chlorophyta	<i>C. sertularoides</i>	abril	-	$1.39 \pm 0.10^{\#}$	-
		junio	1.65 ± 1.27	2.14 ± 0.02	-
	<i>C. amplivesiculatum</i>	abril	-	-	$8.71 \pm 0.11^{\text{d}}$
		junio	-	-	5.39 ± 3.69
	<i>C. cuneatum</i>	febrero	2.17 ± 0.64	-	-
		abril	$1.0 \pm 0.13^{\text{c}}$	3.77 ± 0.49	-
		junio	1.2 ± 0.29	-	-
	<i>U. lactuca</i>	noviembre	-	-	1.20 ± 0.34
		abril	-	-	1.62 ± 0.05
junio		-	-	$2.17 \pm 0.10^{\text{a}}$	
Phaeophyta	<i>D. flabellata</i>	febrero	-	$2.32 \pm 0.25^{\circ}$	-
		abril	-	1.59 ± 0.04	-
Magnoliophyta	<i>Z. marina</i>	febrero	-	-	1.22 ± 0.56
		abril	-	-	1.92 ± 0.31
		junio	-	-	1.21 ± 0.75

Los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs C.a; (b) vs C.c; (c) vs C.s (d) vs U.l; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) (A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La

Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

En junio, en La Estufa *C. sertularioides* tuvo mayor contenido de polifenoles en comparación con *C. cuneatum* ($p=0.007$). En La Boca, de las cinco especies colectadas *U. lactuca* fue la especie con el menor contenido de polifenoles ($p=0.002$) (Tabla V). En este mismo mes *C. sertularioides* se encontró el mayor contenido de polifenoles en La Estufa en comparación con los otros dos sitios ($p=0.003$) (Tabla V).

Para evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre los antioxidantes no enzimáticos de las macroalgas verdes *C. sertularioides* y *C. amplivesiculatum* se hicieron comparaciones en cada uno de los sitios. *C. sertularioides* colectado en La Estufa en el mes de junio presentó un mayor contenido de polifenoles en comparación con abril ($p=0.0008$); *C. amplivesiculatum* en La Boca en junio presentó mayor contenido de polifenoles en comparación con abril ($p=0.001$).

División Phaeophyta

La macroalga *D. flabellata* presentó mayor contenido de vitamina C en febrero en comparación con abril ($p=0.005$) (Tabla IV). El contenido de polifenoles en la macroalga café *D. flabellata* en abril en El Conchalito fue significativamente mayor en comparación con noviembre y febrero ($p=0.003$).

Pasto marino

En el pasto marino colectado en La Boca en junio se observó un mayor contenido de polifenoles con respecto a febrero y abril ($p=0.001$).

Tabla V. Contenido de polifenoles (μg de equivalentes de ácido gálico g^{-1} de tejido) en macroalgas y pasto marino colectados en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010.

Grupo	Especie	Mes	Polifenoles		
			La Estufa	El Conchalito	La Boca
Rhodophyta	<i>G. vermiculophylla</i>	noviembre	-	47.1 \pm 7.7	44.3 \pm 10.1
		febrero	47.7 \pm 10.0	48.3 \pm 3.8	46.0 \pm 7.3
		abril	38.6 \pm 3.9	36.5 \pm 1.7	
		junio	44.1 \pm 9.7	77.3 \pm 12.1	51.0 \pm 4.8
	<i>G. textorii</i>	noviembre	-	18.3 \pm 2.5	
		febrero	-	48.8 \pm 7.7	55.5 \pm 0.4
		abril	-	43.8 \pm 3.2	
		junio	-	-	28.7 \pm 2.8
	<i>H. cervicornis</i>	noviembre	-	18.4 \pm 0.5	-
		abril	-	39.6 \pm 3.2	-
		junio	-	32.4 \pm 1.8	52.9 \pm 13.0
	Chlorophyta	<i>C. sertularoides</i>	noviembre	-	46.1 \pm 12.5
abril			64.8 \pm 2.3	57.2 \pm 12.6	-
junio			105.9 \pm 9.2	75.9 \pm 5.7	60.2 \pm 10.2
<i>C. amplivesiculatum</i>		abril	-	-	37.7 \pm 2.3
		junio	-	-	60.2 \pm 4.4
<i>C. cuneatum</i>		febrero	50.6 \pm 14.0	46.3 \pm 12.5	-
		abril	35.3 \pm 9.9	41.0 \pm 4.3	-
		junio	58.1 \pm 10.1	-	49.8 \pm 3.5
<i>U. lactuca</i>		noviembre	-	-	26.9 \pm 2.8
		abril	-	-	31.0 \pm 3.1
		junio	-	-	30.9 \pm 7.5
Phaeophyta		<i>D. flabellata</i>	noviembre	-	41.1 \pm 9.5
	febrero		66.4 \pm 16.5	71.8 \pm 8.0	89.9 \pm 4.8
	abril		-	82.4 \pm 10.7	-
Magnoliophyta	<i>Z. marina</i>	febrero	-	-	105.2 \pm 21.4
		abril	-	-	81.4 \pm 9.0
		junio	-	-	133.5 \pm 4.5

Los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs C.a; (b)

vs C.c; (c) vs C.s (d) vs U.I.; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

7.5. DAÑO OXIDATIVO

División Rhodophyta

De las macroalgas rojas colectadas en El Conchalito en noviembre, *H. cervicornis* presentó niveles significativamente más bajos de TBARS en comparación con *G. textorii* y *G. vermiculophylla* ($p=0.036$), mientras que en junio *H. cervicornis* presentó niveles significativamente mayores de TBARS en comparación con *G. vermiculophylla* ($p=0.002$) (Fig. 10A). En La Boca en febrero, *G. textorii* presentó niveles significativamente más altos de carbonilos protéicos en comparación con *G. vermiculophylla* ($p=0.050$) (Fig. 10B). En la Boca en junio *H. cervicornis* presentó niveles significativamente mayores de TBARS en comparación con *G. vermiculophylla* y *G. textorii* ($p=0.032$) (Fig. 10A).

Al evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre los indicadores de daño oxidativo, se observó que la especie *G. textorii* en El Conchalito presentó niveles de TBARS más bajos en abril en comparación con noviembre y febrero ($p=0.0001$) (Fig. 10A). *G. vermiculophylla* en La Estufa presentó valores significativamente mayores de carbonilos protéicos en febrero que aquellos en abril y junio ($p=0.037$) (Fig. 10B). En El Conchalito, los niveles de TBARS en esta misma especie fueron significativamente mayores en noviembre y febrero en comparación con abril y junio ($p=0.015$) (Fig. 10A). Para *G. vermiculophylla* en La Boca, los niveles de TBARS fueron significativamente mayores en junio y noviembre en comparación con febrero ($p=0.018$) (Fig. 10A).

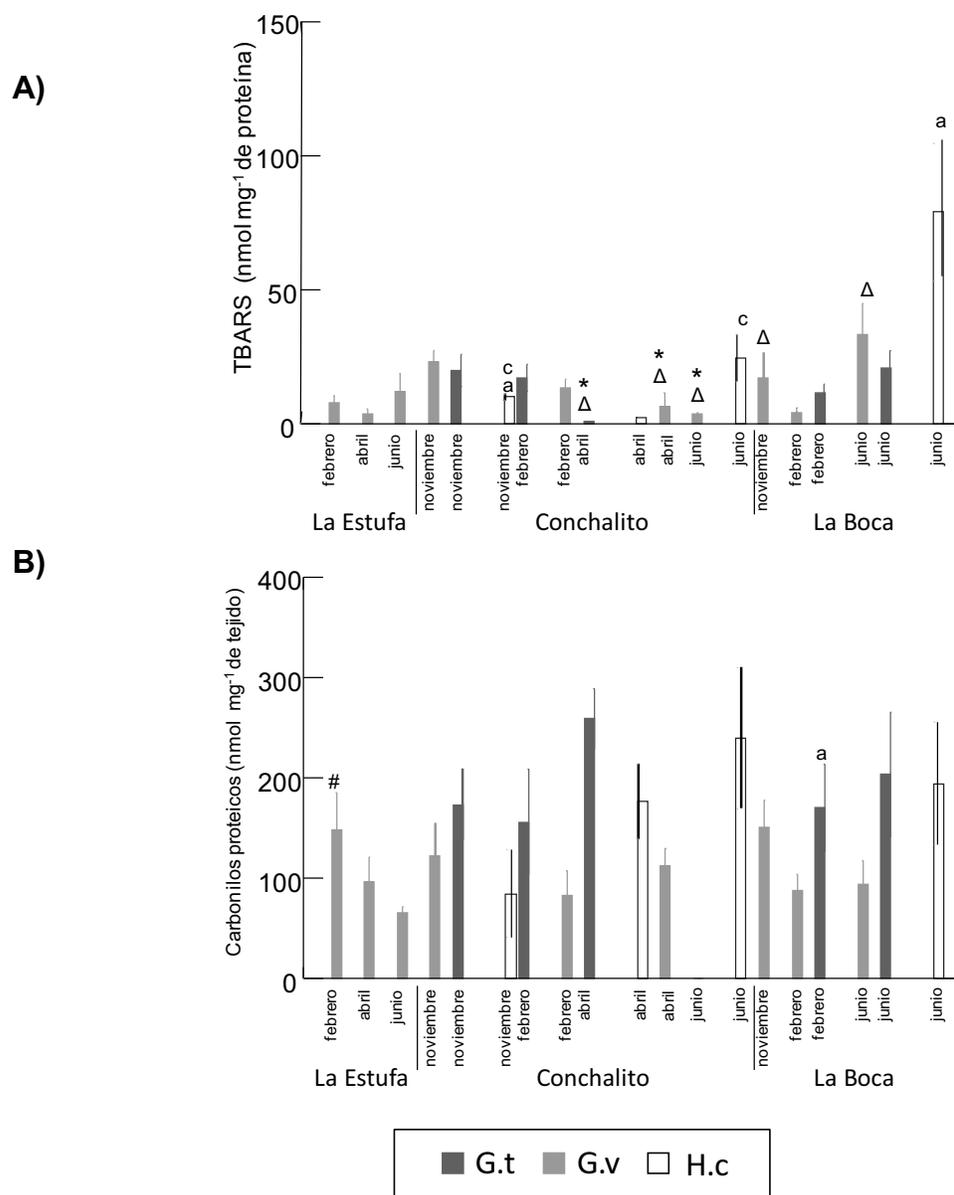


Figura 10. Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg⁻¹ de proteína) y B) carbonilos protéicos (nmol mg⁻¹ de tejido) en tres especies de macroalgas rojas (*Hypnea cervicornis*- H.c, *Gracilaria textorii*- G.t, *Gracilaria vermiculophylla*-G.v) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs G.t; (b) vs H.c; (c) vs G.v; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

División Chlorophyta

En las macroalgas verdes, en el mes de febrero en *C. cuneatum* no se encontraron diferencias entre sitios en los indicadores de daño oxidativo (Fig. 11). En el mes de abril en La Estufa, *C. sertularioides* presentó mayores niveles de TBARS y carbonilos protéicos que *C. cuneatum* ($p=0.004$ y $p=0.049$, respectivamente) (Fig. 11). En este mismo mes en El Conchalito, *C. cuneatum* presentó mayores niveles de carbonilos protéicos que en La Estufa ($p=0.049$) (Fig. 11B). En abril en La Boca, *U. lactuca* presentó valores más altos de TBARS y carbonilos protéicos en comparación con *C. amplivesiculatum* ($p=0.035$ y $p=0.049$, respectivamente) (Fig. 11). En este mismo mes *C. cuneatum* y *C. sertularioides* presentaron los mayores niveles de carbonilos protéicos en El Conchalito y en La Estufa ($p=0.048$ y $p=0.049$, respectivamente) (Fig. 11B).

En junio, en La Estufa no se encontraron diferencias entre especies en los indicadores de daño oxidativo. En La Boca, los niveles de carbonilos protéicos en *U. lactuca* fueron significativamente mayores que en *C. amplivesiculatum*, *C. sertularioides*, y *C. cuneatum* ($p=0.0379$). Las muestras de *C. sertularioides* colectadas en La Estufa presentaron valores más bajos de TBARS que aquellas colectadas en El Conchalito y La Boca ($p=0.048$) (Fig. 11A).

Al evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre los indicadores de daño oxidativo, se observó que la especie *C. sertularioides* en La Estufa presentó mayores niveles de carbonilos protéicos en abril que en junio; sin embargo, se observaron mayores niveles de TBARS en junio que en abril ($p=0.018$ y $p=0.049$, respectivamente) (Fig. 11). Esta misma especie en El Conchalito presentó los valores más altos de TBARS en noviembre y junio en comparación con abril ($p=0.0003$) (Fig. 11). *C. cuneatum* en La Estufa presentó valores más altos de TBARS en junio en comparación con febrero y abril (Fig. 11A). En muestras de esta misma especie colectadas en El Conchalito se observaron valores significativamente mayores de carbonilos protéicos en abril en comparación con febrero ($p=0.049$) (Fig. 11).

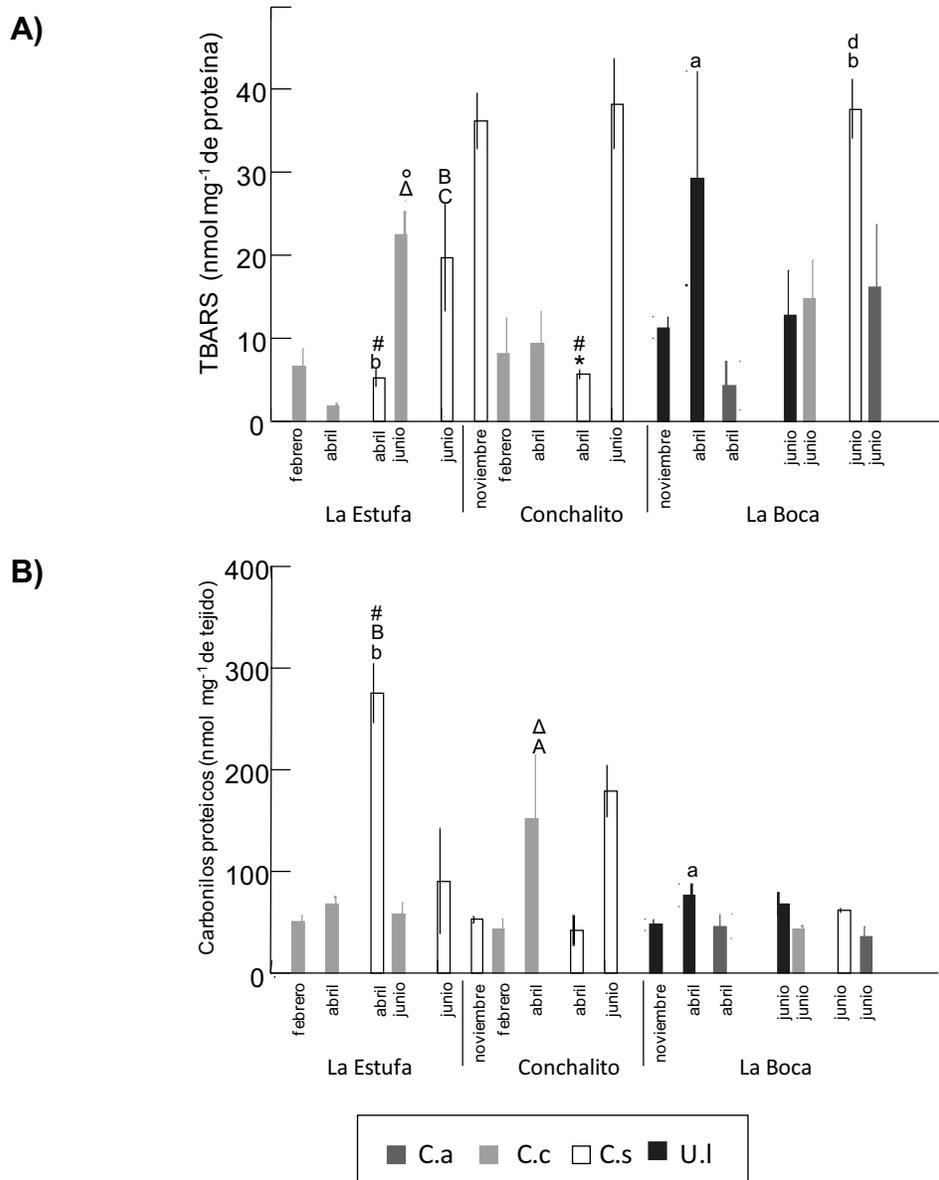


Figura 11. Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg⁻¹ de proteína) y B) carbonilos protéicos (nmol mg⁻¹ de tejido) en cuatro especies de macroalgas verdes (*Codium amplivesiculatum*- C.a, *Codium cuneatum*- C.a, *Caulerpa sertularioides*- C.s, *Ulva lactuca*- U.I) colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a junio del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras minúsculas, denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre especies (mismo sitio) (a) vs C.a; (b) vs C.c; (c) vs C.s (d) vs U.I; letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios (misma especie) A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^\circ$) vs abril; (#) vs junio.

División Phaeophyta

En febrero en La Boca, *D. flabellata* presentó niveles significativamente mayores de carbonilos protéicos en comparación con El Conchalito ($p=0.013$) (Fig. 12B). Al evaluar la significancia de la variabilidad estacional sobre los indicadores de daño oxidativo, los niveles de TBARS en El Conchalito en noviembre fueron significativamente mayores en comparación con febrero y abril ($p=0.0169$) (Fig. 12A).

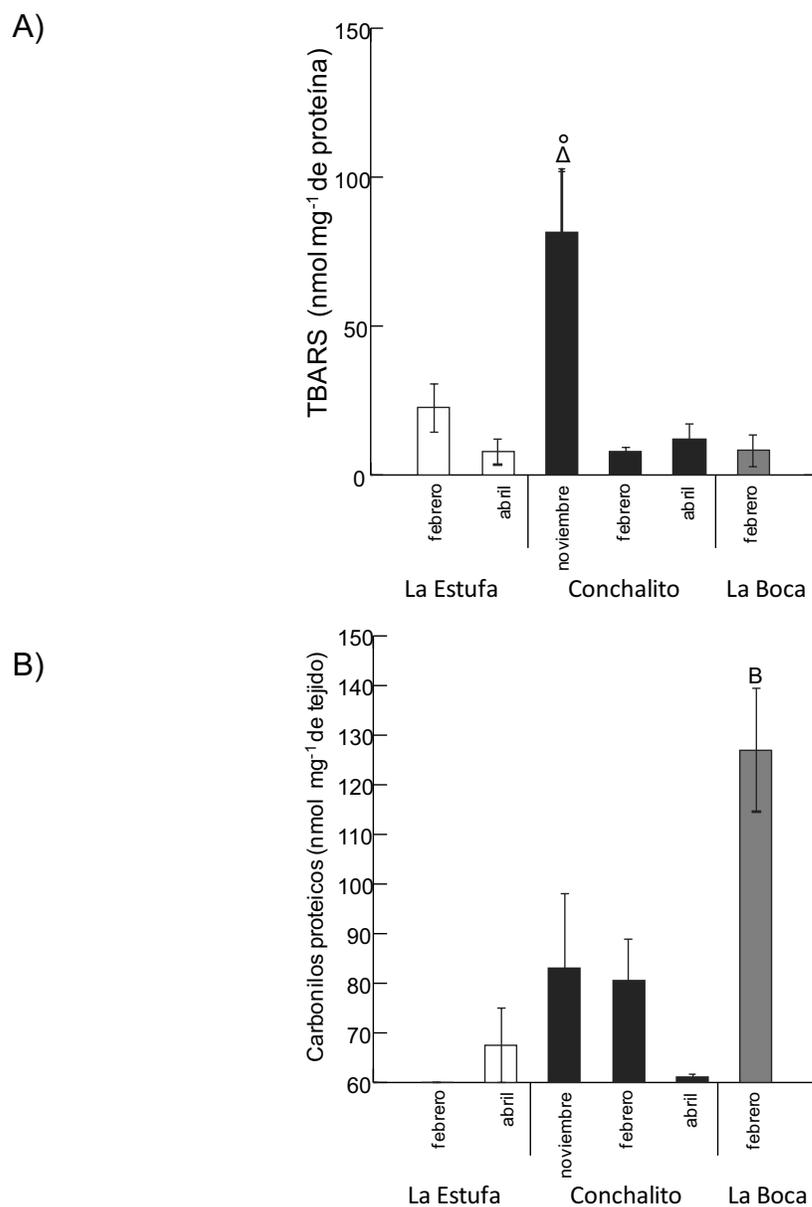


Figura 12. Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg⁻¹ de proteína) y B) carbonilos protéicos (nmol mg⁻¹ de tejido) en *Dycliotea flabellata* colectadas en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, de noviembre del 2009 a febrero del 2010. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Letras mayúsculas denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre sitios A) vs La Estufa; (B) vs Conchalito; (C) vs La Boca, y símbolos denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre meses; (*) vs noviembre; (Δ) vs febrero; ($^{\circ}$) vs abril; (#) vs junio.

Pasto marino

Los niveles de TBARS encontrados en *Z. marina* colectada en La Boca fueron significativamente mayores en junio que en febrero ($p=0.006$) (Fig. 13) No se detectaron diferencias significativas por temporada de colecta en la concentración de carbonilos protéicos en *Z. marina* ($p=0.339$).

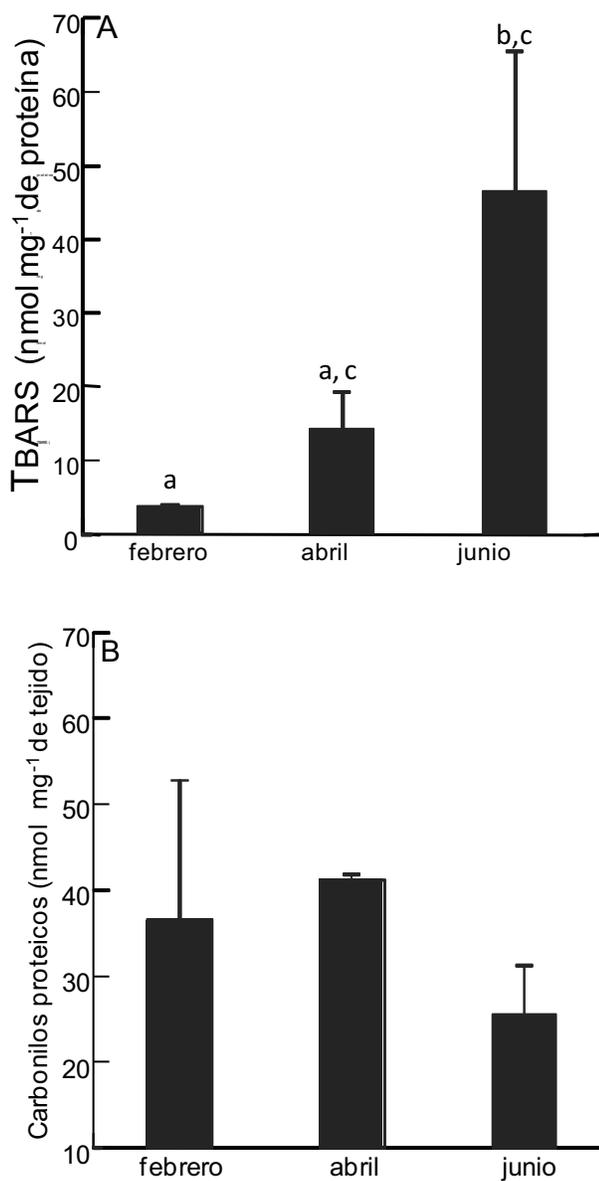


Figura 13. Niveles de A) peroxidación de lípidos (TBARS, nmol mg⁻¹ de proteína) y B) carbonilos protéicos (nmol mg⁻¹ de tejido) en el pasto marino, *Zostera marina*, colectado en La Boca, Bahía Magdalena, Baja California Sur, de febrero a junio del 2010. Los datos se presentan como media ± error estándar. Letras diferentes denotan diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

7.6. CORRELACIONES ENTRE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y LOS ELEMENTOS TRAZA

Combinando todas las especies colectadas, sin importar el grupo ni sitios, la concentración de Cu se correlacionó positivamente con la actividad de la enzima SOD y los niveles de TBARS ($p \leq 0.040$) (Tabla VI). Mientras que el Cd se correlacionó positivamente con los niveles de carbonilos protéicos ($p = 0.045$). El Fe y el Cu se correlacionaron positivamente con los niveles de TBARS ($p = 0.024$ y $p = 0.045$, respectivamente).

Se hicieron correlaciones de acuerdo a la división taxonómica sin considerar sitio ni temporada. Se muestran los valores de correlación entre la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en macroalgas verdes en la Tabla V. El Zn se correlacionó negativamente con la actividad de la enzima GST ($p = 0.026$), mientras que el Fe se correlacionó positivamente con los niveles de TBARS ($p = 0.002$). En el grupo de las macroalgas rojas sólo se encontraron correlaciones positivas entre la concentración de Cu y la actividad de la enzima SOD ($p = 0.003$), y de la concentración de Pb con los niveles de TBARS ($p = 0.010$) (Tabla VI).

Tabla VI. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de los elementos traza (mg kg^{-1}) y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, superóxido dismutasa; GST, glutatión S-transferasa; GPX, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa), los niveles de antioxidantes no enzimáticos, y los niveles de daño oxidativo (PC, carbonilos protéicos; TBARS, peroxidación de lípidos) para (a) todas las especies, (b) macroalgas verdes, y (c) macroalgas rojas colectadas en Bahía Magdalena de noviembre del 2009 a junio del 2010.

(a)

	Pb	Cd	Cu	Zn	Fe	Se
SOD	0.20	-0.21	0.48*	0.11	-0.18	-0.44
GST	-0.27	0.01	0.10	0.19	-0.02	-0.34
GPx	-0.29	0.08	-0.07	-0.20	-0.28	-0.42
GR	0.27	-0.39	-0.05	0.17	0.30	-0.06
PC	-0.17	0.49*	-0.26	-0.38	-0.33	0.11
TBARS	0.47	-0.12	0.48*	0.11	0.53*	0.11
FENOLES	-0.31	-0.13	0.32	0.00	0.14	0.42
VITAMINA C	-0.03	-0.40	0.22	0.22	0.25	-0.01

(b)

	Pb	Cd	Cu	Zn	Fe	Se
SOD	0.02	-0.44	-0.14	-0.01	0.01	-0.36
GST	-0.24	-0.22	-0.30	0.61*	0.53	-0.28
GPx	-0.25	-0.18	-0.34	-0.39	-0.02	-0.28
GR	-0.07	-0.15	-0.42	-0.22	0.30	-0.16
PC	-0.15	0.28	-0.01	-0.06	0.20	0.23
TBARS	0.14	0.14	-0.02	-0.30	0.78*	0.08
FENOLES	-0.26	0.36	0.25	-0.18	0.26	0.55

(c)

	Pb	Cd	Cu	Zn	Fe	Se
SOD	0.42	0.08	0.83*	0.18	-0.30	0.25
GST	-0.15	-0.01	0.18	0.52	-0.56	-0.25
GPx	0.12	-0.13	0.62	0.11	-0.56	0.14
GR	0.32	-0.39	-0.03	0.10	0.10	0.02
PC	-0.19	0.49	0.36	0.02	-0.45	0.36
TBARS	0.77*	-0.32	0.35	0.19	-0.11	0.27
FENOLES	-0.16	-0.45	0.05	0.00	-0.46	-0.02

* Correlación estadísticamente significativa, $p < 0.05$

7.7. ANÁLISIS FACTORIAL

El análisis multivariado permite resumir la información contenida en una serie de variables originales, a través de una serie de dimensiones compuestas o factores con una mínima pérdida de información. A partir del análisis factorial se generaron 2 componentes que explicaron el 45.3% de la varianza de los datos. El análisis factorial arrojó las cargas factoriales de los factores principales, y se consideraron significativos aquellos valores mayores a 0.70 (Anexo II). El factor 1 explicó el 20.8% y se correlacionó significativamente con especies y grupo taxonómico, mientras que la actividad de las enzimas SOD, GST y GPx fueron indicadores significativos para el factor 2, explicando el 24.5% de la varianza.

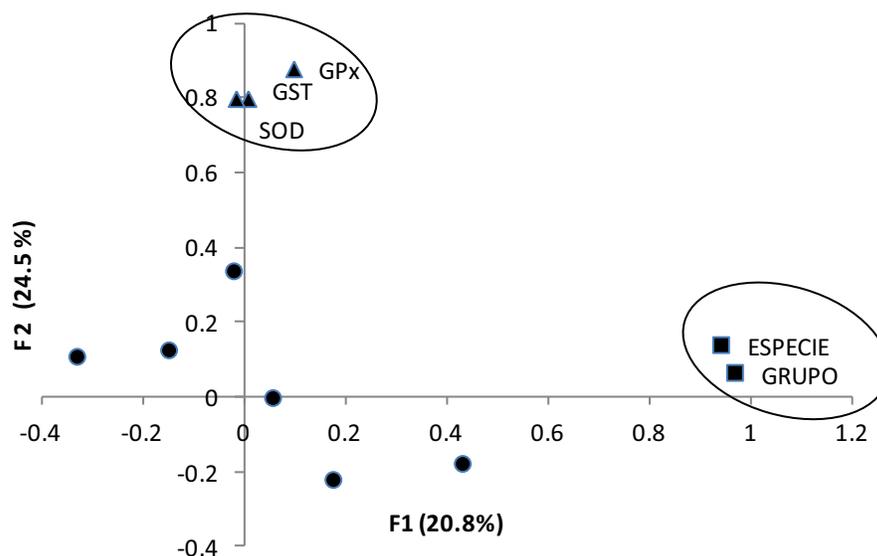


Figura 14. Proyección gráfica del resultado del análisis multivariado de análisis factorial. SOD, superóxido dismutasa; GST, glutatión-S-transferasa; GPx, glutatión peroxidasa.

8. DISCUSIÓN

8.1 VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL EN LA CONCENTRACION DE ELEMENTOS TRAZA EN MACROALGAS MARINAS

Se encontraron variaciones temporales en la concentración de elementos traza entre las diferentes especies de macroalgas analizadas en el presente estudio, como se ha reportado para Bahía Magdalena y otras regiones del mundo (Villares et al., 2005; Kalesh y Nair, 2006; Talavera-Sáenz, et al., 2007; Astorga-España et al., 2008; Riosmena-Rodríguez et al., 2009). La mayor concentración de elementos traza en macroalgas y pasto marino fue observada en abril y junio. Lo anterior está probablemente relacionado a los eventos de surgencias que ocurren durante la primavera y el inicio del verano en esta zona y que, en consecuencia, favorecen la liberación de elementos traza hacia la columna de agua, quedando disponibles para la flora marina (Muñoz-Barbosa et al., 2004). La presencia de elementos traza en macroalgas marinas se asocia a la disponibilidad de éstos en el medio circundante y a la capacidad de los organismos para incorporarlos y bioacumularlos en los tejidos (Rodríguez-Meza et al., 2007).

Las especies pertenecientes a la división Rhodophyta en la zona de Bahía Magdalena han sido reportadas como el grupo con mayor capacidad de acumular elementos traza al presentar los mayores valores de éstos (Meza-Rodríguez, 2005; Riosmena-Rodríguez et al., 2009). Sin embargo, en el presente estudio se encontró que las especies pertenecientes a la División Chlorophyta presentaron una mayor cantidad de elementos traza en comparación con las especies de la División Rhodophyta o Magnoliophyta. En la Bahía de la Paz las macroalgas verdes tuvieron mayor concentración de metales incluso que las macroalgas café (Phaeophyta), las cuales se caracterizan por presentar una alta afinidad en la absorción y acumulación de elementos traza (Rodríguez-Castañeda, 2006). Lo anterior es debido a la presencia de polisacáridos cargados negativamente y de compartimentos especiales (fisoides) que incrementan la absorción de metales (Salgado et al., 2005). Es posible que la condición metabólica, así como la fase en el ciclo de vida de cada especie, pueda estar influenciando la absorción y

acumulación de metales (Lobban y Wynne, 1981). La susceptibilidad a la absorción de elementos traza también puede estar asociada a las características morfológicas de cada especie, como el tamaño del alga, el tipo de ramificación, el área expuesta e incluso la composición química de la pared celular (Rodríguez-Meza et al., 2007). En el presente estudio, la macroalga verde *C. cuneatum* presentó concentraciones altas en más de un metal (Pb, Cd, Zn y Fe). El género *Codium* se caracteriza por presentar talos ramificados, erguidos y anatomía corticada, además de que sus estructuras son relativamente más simples que las que caracterizan a las algas rojas (Bold y Wynne, 1985). Estas particularidades le confieren una gran superficie de absorción que puede contribuir a la acumulación de elementos debido al contacto con la materia particulada suspendida (Lobban y Harrison, 1997).

La acumulación de elementos traza en las macroalgas es dependiente de factores abióticos, entre los cuales destacan: la estación del año, la salinidad, el pH, la temperatura de agua, la intensidad de radiación solar; el tipo de metal, su concentración y la especiación química en la que se encuentre, así como de la interacción entre estos factores (Munda, 1984; Wang et al., 1999 Yu et al., 1999; Wang y Dei, 2001; Kalesh y Nair 2006; Pinto et al., 2011) .

Los valores observados en este estudio para la concentración de Cd, Se, Zn, Fe y Cu en macroalgas y pasto marino fueron muy similares a lo reportado previamente en este sitio por Riosmena-Rodríguez et al. (2009) y Rodríguez-Meza (2005). Los valores encontrados en este estudio para Se y Zn se encontraron dentro de los rangos reportados por Say (1990), Villares et al. (2005) y Astorga-España et al. (2008) en macroalgas colectadas en zonas costeras de Chile y España en localidades consideradas como prístinas o con poco impacto antropogénico. Si bien Bahía Magdalena puede considerarse sin impacto importante de origen antropogénico, las características geológicas de la región favorecen el enriquecimiento de elementos como Cd, Cu y Fe (Rodríguez-Meza et al., 2007). La Península de Baja California destaca por la presencia de fosforita con origen en la Formación de San Gregorio o desde la plataforma continental, por lo cual la

geología debe ser considerada entre los factores de enriquecimiento de estos elementos en Bahía Magdalena.

Para el grupo de las macroalgas verdes la concentración promedio de Pb (6.92 mg kg^{-1}) estuvo por arriba de lo reportado en estudios anteriores (Rodríguez-Meza 2005; Riosmena-Rodríguez et al., 2009 (0.86 mg kg^{-1})), pero dentro de lo publicado por Buo-Olayan y Subrahmyam (1996; 6.5 y $8.5 \text{ mg Pb kg}^{-1}$) en macroalgas verdes en la costa de Kuwait. El Pb es considerado un elemento de origen urbano industrial, y tóxico debido a que no se le conoce función biológica, y su disponibilidad en las macroalgas podría favorecer su incorporación hacia los niveles tróficos superiores. Por lo cual, se recomienda el monitoreo de este elemento ya que los niveles encontrados podrían estar indicando un problema de contaminación.

A nivel espacial, en La Estufa se encontraron las mayores concentraciones de Zn, Pb y Cd. Estas elevadas concentraciones probablemente se deban en parte a las características propias de este sitio. Esta zona apenas es influenciada por corrientes, mareas, y ha sido descrita por González-Ramos y Santos-Baca (2005) como una entidad independiente y parcialmente aislada de la zona media y de la boca del estero, por lo cual podría considerarse como un reservorio o zona de depósito. Adicionalmente, la existencia de dos fuentes de contaminación atmosférica: una planta termoeléctrica y una enlatadora, podrían contribuir a los resultados observados, ya que las centrales térmicas de combustión pueden ser fuentes de Pb (Loehr y Collias, 1984; Mejia et al., 2007).

Para todas las especies de macroalgas, incluyendo el pasto marino, se encontraron mayores concentraciones de Zn y Fe en comparación con el resto de los elementos analizados. Estos resultados podrían indicar una mayor biodisponibilidad de estos elementos en el área, aunque al ser micronutrientes esenciales los valores obtenidos podrían asociarse a los requerimientos metabólicos de las macroalgas y pasto marino. En Bahía Magdalena las concentraciones elevadas de Fe, Zn y otros elementos se asocian directamente

con la fosforita proveniente del aporte continental o incluso del componente sedimentario del ambiente marino adyacente (Rodríguez-Meza et al., 2007).

8. 2. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Las condiciones ambientales y su variación espacio-temporal son, en conjunto, probablemente el factor limitante más importante para la productividad vegetal. En respuesta a ciertas condiciones ambientales, como hipoxia, radiación UV y desecación, las células vegetales aumentan la producción de ERO (Coelho et al., 2002; Dring, 2005). Si no son neutralizadas por moléculas antioxidantes, las ERO pueden atacar lípidos, proteínas o ácidos nucleicos y generar condiciones de estrés oxidativo que pueden resultar en muerte celular. Para minimizar el potencial daño oxidativo, las macroalgas marinas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa, a través de la expresión y activación del sistema antioxidante (Aguilera et al., 2002; Dummermuth, 2003; Dring, 2005; Aguilera y Rautenberger, 2011).

En este estudio se observó una variación espacio-temporal en la actividad de las enzimas antioxidantes en las macroalgas y pasto marino de Bahía Magdalena. Es posible que esta variación esté relacionada con diversos factores, entre los que se incluyen las condiciones del sitio, la variación estacional en las condiciones fisicoquímicas del ambiente, la presencia de elementos traza, y las características propias de cada especie.

Varios estudios han demostrado una correlación entre la capacidad antioxidante y la distribución vertical de las macroalgas (David y Pearson, 1996; Hanelt, 2001). La diferencia observada en la actividad de las enzimas antioxidantes en las macroalgas y pasto marino entre los sitios de colecta puede estar relacionada con la profundidad. En varios estudios reportan la sensibilidad de las macroalgas en función a la profundidad de distribución, debido a que la irradiancia solar es atenuada conforme penetra en la columna de agua (David y Pearson, 1996; Hanelt et al., 1997b; Hanelt et al., 2001; Aguilera y Rautenberger, 2011). Así lo

confirman los resultados obtenidos, ya que se observa una diferencia en la actividad de enzimas antioxidantes. En el sitio de La Estufa donde la profundidad máxima es de un metro se observó una mayor actividad en las defensas antioxidantes.

En la zona noroeste o de canales de Bahía Magdalena la temperatura y salinidad se correlacionan con la batimetría del lugar presentando los valores más altos en las zonas de menor profundidad ubicados hacia la cabeza, en donde se localiza La Estufa (Álvarez-Borrego et al., 1975). Las condiciones prevalecientes de temperatura y salinidad en este sitio favorecen la producción de ERO en macroalgas (Dring, 2005; Aguilera y Rautenberger, 2011). De hecho, en las especies colectadas en La Estufa, independientemente del grupo al que pertenecieran, se observó una mayor actividad de SOD, GPx y, en algunos casos, de GST en comparación con los otros dos sitios. Los resultados de este trabajo coinciden con reportes de patrones de zonación de las macroalgas, en donde las especies con mayor capacidad antioxidante estarán ocupando la zona intermareal (Choo et al., 2004; Ross and Van Alstyne, 2007; Liu y Pang, 2010). Lo cual les permitirá enfrentar la sobreproducción de ERO que pudieran estarse generando como resultado de la interacción entre las variables ambientales y las macroalgas. Los resultados de este trabajo indican una variación estacional en la respuesta antioxidante de las macroalgas de Bahía Magdalena. Se ha sugerido que el fotoperíodo, así como los ciclos circadianos, modulan las defensas antioxidantes (Cavalho et al., 2004). El incremento gradual en la actividad de las enzimas antioxidantes en las macroalgas de febrero a noviembre, sugiere un acondicionamiento en el tejido para tolerar los eventos estresantes (e.g. incremento de temperatura, mayor radiación solar) asociados a las condiciones propias del verano (Fig. 6 y 8).

Aunque, la temperatura es uno de los principales factores que controlan el crecimiento y distribución de las plantas (Lobban y Harrison, 1997), la interacción de dos o más factores deben ser considerados. La diferencia de temperatura en Bahía Magdalena durante este estudio fue de casi 5°C en La Estufa y de 3°C en

El Conchalito y La Boca entre el periodo más frío (febrero y abril) y el cálido (junio y noviembre) (Tabla I). La interacción del incremento en la temperatura y en la radiación solar durante el verano elevarían la producción de ERO por el incremento en la tasa de la fotosíntesis; lo anterior sugiere un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes, así como los niveles de antioxidantes no enzimáticos, para evitar situaciones de estrés oxidativo. Los resultados de este trabajo respaldan esta idea ya que en los meses de verano (junio y noviembre) se observó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y GST) en comparación con los meses que corresponden a la temporada invierno-primavera (febrero y abril) (Fig. 4-9). El metabolismo oxidativo en los organismos autótrofos se ve afectado en gran medida por la eficiencia fotosintética. Está ampliamente documentado que la mayor producción de ERO en células vegetales se origina en el cloroplasto, por lo cual en condiciones fotosintéticas los niveles de O_2 aumentan y varios intermediarios de la cadena de transporte electrónico se encuentran reducidos, lo que aumenta el riesgo de la transferencia de energía y electrones con la formación de 1O_2 y $O_2^{\cdot-}$ (Asada, 1999). Se ha documentado que la capacidad fotosintética de las macroalgas incrementa durante el verano, lo cual supone una mayor producción de ERO, por lo cual sería de esperarse que la actividad de las enzimas incrementara bajo estas condiciones (Aguilera et al., 2002; Bischof et al., 2002). La actividad de SOD se considera la primera línea de defensa, dismutando el $O_2^{\cdot-}$; a continuación, alguna enzima con función peroxidasa (GPx, APx o CAT) se encarga de evitar la formación de H_2O_2 , ya que esta molécula es capaz de inactivar enzimas clave en el ciclo de Calvin, de iniciar las reacciones de peroxidación de lípidos y pigmentos, e incluso si llega a reaccionar con iones ferrosos, de llevar a la formación de HO^{\cdot} a través de la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La salinidad también puede tener un efecto en las defensas antioxidantes (Pedersen 1984; Kumar et al., 2010). Estudios en *U. lactuca* (Sung et al., 2009), *Grateloupia turuturu* y *Palmaria palmata* (Liu y Pang, 2010) mostraron una mayor actividad de SOD, APx y GR al ser expuestas a condiciones de hipersalinidad. Si

bien no se midió la salinidad en este trabajo, se tiene que reportado un incremento de la salinidad y la temperatura hacia la cabeza de la zona del estero; acentuándose en los meses de verano (Lluch-Belda et al., 2000).

Mayor actividad de las enzimas antioxidantes en junio en la Estufa (Figs. 4-9) y mayor contenido de vitamina C y polifenoles (Tabla IV y V) sugiere un mecanismo para contrarrestar la producción de ERO resultado de las variaciones en los factores ambientales en este sitio. Se ha demostrado que la interacción de alta salinidad y temperatura tiene un efecto importante en el incremento de la tasa fotosintética y generación de ERO en macroalgas rojas (Phooprong et al., 2008).

En este estudio se detectó mayor actividad de las enzimas antioxidantes en las macroalgas que presentaron mayor concentración de Pb, Cu y Fe y mayores niveles de TBARS (Fig. 10A y 11A). Elementos como Cd, Hg o Pb son considerados como tóxicos, aún en bajas concentraciones ya que se desconoce su función biológica y son capaces de promover condiciones de estrés oxidativo (e.g. peroxidación de lípidos y daño a proteínas) (Pinto et al., 2003a; 2003b).

En junio, en los tejidos de *G. vermiculophylla* y *C. cuneatum* en La Estufa se encontraron concentraciones elevadas de Pb con respecto al resto de los meses; *C. sertularioides* presentó valores elevados de Cu y Pb en El Conchalito en este mismo mes en comparación con los otros meses. La acumulación de estos elementos en los tejidos de ambas especies, el incremento en la actividad de SOD, GPx y GST aunada al incremento en los niveles de TBARS indican una condición de estrés oxidativo, a pesar del aumento en la actividad enzimática (Livingstone, 2001; Collén et al., 2003; Pinto et al., 2003a). *U. lactuca* presentó una mayor actividad de GPx y GST en abril en comparación con los demás meses de muestreo en La Boca; en esta misma especie se encontraron los mayores niveles de Cu también en abril. El Cu por sí mismo tiene la capacidad de incrementar la producción de ERO a través de reacciones Fenton en macroalgas flotantes (Rama Devi y Prasad, 1998). La vía comúnmente utilizada para la eliminación de los productos finales derivados de la peroxidación de lípidos, es la conjugación de éstos mediante la reacción catalizada por la GST (Thoma et al.,

2003; Pereira et al., 2009). Los niveles de TBARS, indicadores del daño oxidativo, observado en *U. lactuca* en abril sugieren que, en conjunto, la actividad de los antioxidantes enzimáticos (GPx y GST) y no enzimáticos (vitamina C, fenoles) no fue suficiente para contrarrestar el efecto de los mayores niveles de Cu observados.

Varios factores bióticos incrementan la producción de ERO, las cuales a su vez incrementan la síntesis de antioxidantes no enzimáticos y la actividad de las enzimas SOD, GPx, APX y CAT (Lee y Shin, 2003; Liu y Pang, 2010). Otros factores que pueden estar influenciando la variación en la actividad de las defensas antioxidantes entre grupos taxonómicos y entre especies es la presencia de moléculas de bajo peso molecular con actividad antioxidante (Aguilera et al., 2002; Nagai y Yukimoto, 2003; Chakrabarty et al., 2009; Mitsunobu et al., 2010). En este estudio se observó que las macroalgas verdes presentaron mayor contenido de vitamina C que el resto de los grupos, mientras que la macroalga café *D. flabellata*, y el pasto marino *Z. marina* presentaron los mayores contenidos de polifenoles (Tabla V). En las macroalgas rojas se ha reportado la presencia de amino ácidos tipo micospirina (MAAs), los cuales están ausentes o en cantidades traza en el resto de los grupos de macroalgas (Korbee et al., 2006). *C. amplivesiculatum* presentó los mayores valores de vitamina C, así como una mayor actividad de GR, en comparación con el resto de las especies de macroalgas, lo cual puede sugerir un mecanismo de remoción de H₂O₂ vía el ciclo ascorbato-glutación (Lee y Shin, 2003). Resultados comparables fueron reportados por Aguilera et al. (2002) en *Chaetomorpha melagonium*.

Las estrategias de vida también pueden modular el metabolismo oxidativo en las macroalgas y el pasto marino. En Bahía Magdalena *C. sertularioides* ha sido caracterizada como una especie con afinidad tropical, presentando un crecimiento óptimo restringido en verano, muriendo a finales del verano (González-Ramos y Santos-Baca, 2005). La acumulación de H₂O₂ ha sido reportada en plantas superiores y microalgas senescentes, seguido de un incremento en la actividad de la enzima SOD y enzimas peroxidasas. La senescencia celular resulta en un

incremento en la peroxidación de lípidos (Butowl et al., 1996; Chakrabarty et al., 2009). Por otro lado, *Z. marina* se podría describir como una especie con afinidad frío-templada con un valor óptimo de temperatura no mayor a 25°C. Durante la temporada de invierno-primavera la temperatura se mantiene dentro de los valores óptimos reportados para esta especie en Bahía Magdalena. Sin embargo, entre verano y otoño se presentan condiciones cercanas a su límite fisiológico (27-30°C).

8.3. CORRELACIONES ENTRE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y LOS METALES TRAZA

La actividad de algunas enzimas antioxidantes, así como los niveles de TBARS y carbonilos protéicos, en varios organismos marinos como bivalvos, peces, corales y macroalgas marinas han sido usados como indicadores de exposición y daño por presencia de elementos traza (Torres et al., 2002; Collén et al., 2003; Cantú-Medellin et al., 2009; Liñan-Cabello et al., 2010). Las correlaciones que se encontraron entre la concentración de Cu, la actividad de SOD y los niveles de TBARS, entre los niveles de Fe y los de TBARS, así como entre los niveles de Cd y los de los carbonilos protéicos en todas las macroalgas colectadas en Bahía Magdalena sugieren que la actividad antioxidante en éstas no es suficiente para evitar la peroxidación lipídica posiblemente inducida por estos elementos. Si bien el Cu y Fe son importantes durante la fotosíntesis y como parte del mismo sistema antioxidante (e.g. clorofilas, plastocianinas y Cu,Zn-SOD), estos elementos son capaces de incrementar la producción de ERO, pueden promover la formación de HO[•] en presencia de O₂^{•-} y H₂O₂ mediante la reacción de Fenton e iniciar procesos de peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Se desconoce una función biológica del Cd en las macroalgas y es considerado altamente tóxico (Fernandes y Enriques, 1991; Szalontai et al., 1999; Collen et al., 2003; Smeets et al., 2005). Se ha sugerido que elementos como Cu, Pb y Zn interactúan directamente con las membranas de los tilacoides en los cloroplastos, mientras

que el Cd podría estar interfiriendo con otros procesos metabólicos ya que parece tener afinidad hacia las proteínas con grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo pudiendo alterar su estructura o inhibir su actividad (Navarro-Aviño et al., 2007).

La presencia de elementos traza no sólo incrementa la producción de ERO, sino también puede activar los mecanismos de defensa antioxidante (Pinto et al., 2003; Michalak, 2006). En este estudio se encontraron correlaciones positivas entre la concentración de Cu y de Zn y la actividad de SOD y de GST en macroalgas rojas y verdes, respectivamente. Estos resultados sugieren una respuesta antioxidante ante la presencia de Cu y de Zn para proteger contra un posible daño oxidativo. Se han reportado efectos tóxicos de Cu y un incremento en la actividad de SOD en plantas y macroalgas (García et al., 1999; Collén et al., 2003). Nagalakshmi y Prasad (2001) observaron un incremento en la actividad de APX, SOD y GPX en *Scenedesmus bijugatus* expuesto a diferentes concentraciones de Cu (0-100 μM). Si bien el Cu puede ser tóxico a altas concentraciones (Hu et al., 1996), los niveles observados en este estudio estuvieron en un rango de entre 1.28 y 2.49 mg Cu kg^{-1} , valores inusualmente elevados, pero que se encuentran por debajo de lo reportado en zonas con alto impacto antropogénico o regiones con actividad minera (Ratkevicius et al., 2003; Rodríguez-Figueroa et al., 2004). En todo caso, los efectos pueden ser atenuados bajo condiciones crónicas debido en parte a que este elemento es un micronutriente esencial para la actividad de varias enzimas (Pinto et al., 2003). En presencia de Zn se ha observado la formación de electrófilos endógenos incrementando la actividad de GST (Sbartai et al., 2011). El contenido promedio de la concentración de Zn en las macroalgas verdes en este estudio fue $17.99 \pm 5.57 \text{ mg kg}^{-1}$, valor que se encuentra dentro de los rangos establecidos para una zona libre de contaminación ($< 50 \text{ mg kg}^{-1}$; Say et al., 1990).

Resultados similares a los del presente trabajo se reportaron para la macroalga *Gracilaria tenuistipitata*, en la cual, al ser expuesta a Cu (1 ppm) y Cd (0.2 ppm) la actividad de SOD aumentó; sin embargo, también aumentaron los niveles de

TBARS y carbonilos protéicos (Collén et al., 2003). La concentración de Cd y Cu en las macroalgas en el presente estudio estuvo por debajo de lo reportado por Collén et al. (2003). Estos resultados sugieren que la presencia de Cu y Cd representa un factor estresante para las macroalgas. Rodríguez-Meza et al. (2008) reportaron una elevada concentración de ciertos metales, incluyendo Cd, Cu y Zn en el área de estudio, como resultado del aporte natural de Isla Margarita y la formación de San Gregorio, así como la influencia de las surgencias costeras.

La diferencia observada en la relación de elementos traza entre los grupos de macroalgas estudiados y su respuesta antioxidante se debe parcialmente a la afinidad que tienen diferentes metales hacia cada grupo de macroalgas. Esta afinidad se debe, en parte, a la diferencia estructural y química de su pared celular (e.g. fucanoides, alginatos) lo que permite una absorción diferencial (Hamdy, 2000). Además de que una vez que el elemento se encuentra en el interior de la célula, éste puede ser neutralizado por moléculas especializadas (e.g. metalotioneínas y/o fitoquelatinas) a formas inactivas como un sistema de detoxificación (Cobbet y Goldsbrough, 2002).

9. CONCLUSIONES

- Se observó una variación temporal en la concentración de elementos traza en macroalgas y pasto marino en Bahía Magdalena. La concentración de Pb fue mayor a lo previamente reportado en esta región.
- La diferencia en las características de los sitios, las condiciones ambientales, y entre las especies se reflejaron en la variación de las defensas antioxidantes. En general, se observó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en la zona somera del sitio La Estufa y durante el verano (junio y noviembre), lo cual sugiere una respuesta ante los factores estresantes de esta temporada.

- El mayor contenido de vitamina C y polifenoles se encontró en el grupo de macroalgas verdes y pasto marino, respectivamente, durante junio. La macroalga verde *C. sertularioides* y el pasto marino *Z. marina* presentaron los mayores contenidos de polifenoles.
- La macroalga verde *C. amplivesiculatum* presentó contenidos de vitamina C mayores a los reportados en cualquier otra macroalga colectada en el área de estudio, lo cual la hace una fuente rica en esta vitamina. Estos resultados sugieren la existencia de una variación a nivel temporal e incluso espacial en la ingesta de antioxidantes por parte de los consumidores primarios. Incluso la selectividad de recursos por parte de los consumidores les estaría aportando una ingesta diferencial en el contenido de antioxidantes. Sin embargo, la mayor disponibilidad de antioxidantes se estaría dando en los meses de verano.
- La concentración de Cu, Fe y Cd se correlacionó positivamente con los niveles de TBARS y con los niveles de carbonilos protéicos (daño oxidativo) en todas las especies de macroalgas colectadas en Bahía Magdalena. Estos resultados sugieren que la presencia de estos metales generan efectos tóxicos en la comunidad algal de Bahía Magdalena, provocando daño oxidativo.
- En el grupo de las macroalgas verdes, la concentración de Zn se correlacionó negativamente con la actividad de la enzima GST, mientras que la concentración de Fe se correlacionó positivamente con los niveles de TBARS.
- En el grupo de las macroalgas rojas sólo se encontraron correlaciones positivas entre la concentración de Cu y la actividad de la enzima SOD, y de la concentración de Pb con los niveles de TBARS. Al parecer esta enzima antioxidante puede ser un adecuado biomarcador de exposición a elementos traza en estos productores primarios.

10. LITERATURA CITADA

- Abbot, I.A., G.J. Hollenberg. 1976. Marine Algae of California. Stanford University Press. California. USA.827 p.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. En L. Packer (eds.), Methods in enzymology, v. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press. Nueva York.121-126 p.
- Aguilera, J., K. Bischof, U. Karsten, D.C. Hanelt. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defense systems against high light stress. Mar Biol. 140 (6):1087-1095.
- Aguilera, J., U. Karsten, H. Lippert, B. Vöele, E. Philipp, D. Hanelt, C. Wiencke C. 1999a. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. Mar Ecol Prog Ser . 191:109–119.
- Aguilera, J., R. Rautenberger. 2011. Oxidative stress tolerance strategies of intertidal macroalgae. En: D., Abele, Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T. (eds.) Oxidative stress in aquatic ecosystems. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.435p.
- Ahmad, S.R., S. Pardini. 1988. Evidence for the presence of glutathione peroxidase activity towards an organic hydroperoxide in larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusiani*. Insect Biochem. 18: 861–866.
- Allan, R. 1997. Introduction: mining and metals in the environment. J. Geochem. Expl. 58:95–100.

- Álvarez-Borrego, S., B.P. Flores-Báez, L.A. Galindo-Bect. 1975. Hidrología del Alto Golfo de California II. Condiciones durante Invierno, Primavera y Verano: C Mar. 2: 21–36.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50: 601-639.
- Asada, K., M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen. En: photosynthesis. En Kyle, D. J., Osmond, C. & Arntzen, C. J. (eds.) En :Photoinhibition. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam. 227–297.
- Astorga-España, M.S., N.C. Calisto-Ulloa, S. Guerrero. baseline concentrations of trace metals in macroalgae from the strait of Magellan, Chile. *Bull Environ Contam Toxicol* 80. (2): 97-101,
- Barnes, R. S.K. 1980. Coastal lagoons. Barnes (eds) Cambridge -Studies in modern biology. Cambridge Univ. Pres. 106 p.
- Bartoli, C.G., F. Gómez, D.E. Martínez, J.J. Guiamet. 2004. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Ex Bot.* 55 (403): 1663–1669.
- Bischof, K., D. Hanel, J. Aguilera, U. Karsten, B. Vögele, T. Sawall, C. Wiencke. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. I. Sensitivity of photosynthesis to ultraviolet radiation. *Mar Biol.* 140 (6): 1097-1106.
- Bold, H.C., M.J. Wynne. 1985. Introduction to the Algae (Structure and Reproduction). Prentice-Hall Inc. Segunda edición. Englewood Cliffs, USA.

- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Buettner G.R., B.A. Jurkiewicz. 1996. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. En: E., Cadenas, L Packer, (eds) *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, New York, 91-115p.
- Buo-Olayan, A.H., M.N.V.Subrahmanyam. 1996. Heavy metals in marine algae of the Kuwait Coast. *B Environ Contam Tox.* 57 (5): 816-823.
- Burritt, D.J., J.Larkindale, K. Hurd. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* 215, 829–838.
- Cantú-Medellín, N., N.O. Olguín-Monroy, L.C. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín. 2009. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico. *Arch Environ Con Tox.* 56 (1): 60-66.
- Carvajal, M., M. Remedios-Mártinez, F. Martínez-Sánchez, F.C. Alcaraz. 1997. Effect of ascorbic acid addition to peppers on Paprika Quality. *J Sci Food Agric* 75: 442-446.
- Carvalho, A.M., A.M.P. Neto, A.P. Tonon, E. Pinto, K.H.M. Cardozo, R.P.L. Mais Brigagão, M.P. Barros, M.A. Torres, P. Magalhães, S.C.G. Campos, T. Guaratini, T. Sigaud-Kutner, V.R. Falcão, P. Colepicolo, P. 2004. Circadian protection against oxidative stress in marine algae. *Hypnos.* 1 (1): 142-157.
- Casas Valdez, M., R.A. Nuñez López, M.B. Cruz Ayala, I. Sánchez Rodríguez, R. Vázquez Borja, G.E. López. 2000. Biodiversity and biogeographic affinities of the algal flora of Baja California Sur: A synthesis of the literature. En: M. Munawar, S. G. Lawrence, I. F. Munawar y D. F.

Malley (eds.) Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and scope. Leiden, Backhuys Publishers, 273-282 p.

- Chakrabarty, D., A. Kumar Verma. S.B. Datta. 2009. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in *Hemerocallis* (day lily) flowers. J Hort For. 1 (6): 113-119.
- Chaudière, J., R. Ferrari-Iliou. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 37:949-962.
- Choo, K., P. Snoeijs, M. Pedersén. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahneriana*. J Exp Mar Biol Ecol. 298: 111–123.
- Cobbett, C., P. Goldsbrough. 2002 Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, Annu Rev Plant Biol. 53:159-82.
- Coelho, S.M., A.R. Taylor, K.P. Ryan, I. Sousa-Pinto, M.T. Brown, C. Brownlee. 2002. Spatio-temporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in *Fucus* rhizoid cells. Plant Cell 14: 2369–2381.
- Collén, J., I.R. Davison. 1999a. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). J Phycol. 35:62–69.
- Collén, J., I.R. Davison. 1999b. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. Plant, Cell and Environment. 22:1143–1151.
- Collén, J., M. Pedersén. 1996. Production, scavenging and toxicity of hydrogen peroxide in the green seaweed *Ulva rigida*. Eur J Phycol. 31 (3): 265-271.

- Collén, J., E. Pinto, M. Pedersén, P. Colepicolo. 2003. Induction of oxidative stress in the red macroalgae *Gracillaria tenuistipitata* by pollutant metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45:337–342.
- Contreras, L., A. Moenne, J.A. Correa. 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *J. Phycol.* 41:1184–1195.
- D'Autréaux, B., M.B. Toledano. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 813-824.
- Davison, I.R., G.A. Pearson..1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J Phycol* 32:197–211.
- Dawes, C.J. 1998. *Marine Botany*. Segunda Edicion. John Wiley & Sons. USA New York. 480 p.
- Dietz, K.J.; M. Baier, U. Kramer .1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediator of heavy metal toxicity in plants. En: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds), *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystem*, Springer - Verlag, Berlin. 73-79 p.
- Dring, M.J. 2005. Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism. *Adv Bot Res.* 43 :175-207.
- Dummermuth, A.L., U. Karsten, K.M. Fisch, G.M. Köning, C. Wiencke. 2003. Response of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. *J Exp Mar Biol Ecol.* 289: 103-121.
- Fernández, J.C., F.S. Henríquez. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review* 57: 246-273.

- Flohé, L., W.A. Günzler. 1984. Assays for glutathione peroxidase. En: Packer, L. (eds). *Methods in Enzymology. Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press, Inc., New York, USA. 114–120p.
- Golberg, D.M., R.J. Spooner. 1987. En: *Methods of Enzymatic Analysis* Bregmayer H.V. (eds) Verlag Chemie. 258-265 p.
- Golding, A.J., G.N. Johnson. 2003. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta* 218: 107-114.
- González Ramos, S., L. Santos-Baca. 2005. Macroalgas asociadas a la zona de alimentación de tortuga verde (*Chelonia mydas agassizii*) en el Estero Banderitas, Baja California Sur. Parte I: Variación espacial y temporal de la estructura de la comunidad. Parte II: Estructura poblacional y tendencias reproductivas. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, México.
- Guzman, J. 1998. Humedales. En: *Diagnostico Ambiental de Baja California Sur, México*. Mahieux (eds). Fundación Mexicana para la Educación Ambiental, Sociedad de Historia Natural Niparajá, UABCS. La Paz.
- Habig, W.H., H.B. Jakoby. 1981. Glutathione S-transferase (rat and human), En: W. B. Jakoby (eds), *Methods in enzymology*, v. 77: Detoxication and drug metabolism: conjugation and related systems. Academic. Press. 218–235 p.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free radicals in biology and medicine*, Tercera edición. Oxford Univ. Press. Oxford, RU. 936 p.
- Hamdy, A.A. 2000. Biosorption of heavy metals by marine algae. *Curr. Microbiol.*, 41: 232-238.

- Hanelt, D., H. Tüg, K. Bischof, C. Gross, H. Lippert, T. Sawall, C. Wiencke. .2001. Light regime in an Arctic fjord: a study related to stratospheric ozone depletion as a basis for determination of UV effects on algal growth. *Mar Biol.* 138:649–658.
- Hanelt, D., C. Wiencke, U. Karsten, W. Nultsch W. 1997a. Photoinhibition and recovery after high light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J Phycol.* 22:387–395.
- Hanelt, D., C. Wiencke, W. Nultsch. 1997b. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *J Photochem Photobiol B Biol.* 40–47.
- Hu, S., C.H. Tang, M. Wu. 1996. Cadmium accumulation by several seaweeds. *Sci Total Environ.* 187:65–71.
- Kalesh, N.S., S.M. Nair. 2006. Spatial and temporal variability of copper, zinc, and cobalt in marine macroalgae from the southwest coast of India. *Bull Environ Contam Toxicol.*
- Klump, J.V., C.S. Martens. 1981. Biochemical cycling in an organic-rich coastline marine basin. Nutrient sediment-water exchanges processes. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 45: 101-121.
- Korbee, N., F. Figueroa, J. Aguilera. 2006. Acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): Biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Rev Chil. Hist. Nat.* 79: 119-132.
- Kumar, M., P. Kumari, V. Gupta, C.R.K. Reddy, B. Jha. 2010. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. *J ExpMar Biol Ecol.* 391: 27–34.

- Ledezma-Gairard, M. Validación del Método: Determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución. Tecnología en Marcha, vol. 17-4.
- Lee, M.Y., H.W. Shin. 2003. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. J App Phycol. 15:13-19.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: Bio P Ecol An Rev Ph. 68: 253-278.
- Levine, R.L., D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186:464-478.
- Liñán-Cabello, M.A., L.A. Flores-Ramírez, T. Zenteno-Savín, N.O. Olguín-Monroy, R. Sosa-Avalo, M. Patiño-Barragan, A. Olivos-Ortiz. 2010. Seasonal changes of antioxidant and oxidative parameters in the coral *Pocillopora capitata* on the Pacific coast of Mexico. Mar Ecol. 31 (3): 407-417.
- Liu, F., S.J. Pang. 2010. Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*. J Exp Mar Biol Ecol. 382: 82–87.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Pollut Bull. 42: 656–666.
- Lobban, C.S., M.J. Wynne. 1981. The Biology of Seaweeds. University of California Press. Berkeley and Los Angeles. USA. 786 p.

- Loehr, L.C, E.E. Collias. 1984. A case study of the abuse of science in sewage planning. *Mar Poll Bull.* 15 (12): 439-443.
- Lohrmann, N.L., B.A. Logan, A.S. Johnson. 2004. Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerance. *Biol Bull.* 207 (3): 225
- Mann, K.H. 1973. Seaweeds: their productivity and strategy for growth. *Science.* 182:975–981.
- McCord, J.M., I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-55.
- Mejia, J. A., R. Rodríguez, A. Armienta, E. Mata, A. Fiorucci. 2007. Aquifer vulnerability zoning, an indicator of atmospheric pollutants input? Vanadium in the Salamanca aquifer, Mexico. *Water Air Soil Poll.* 185 (1-4,): 95-100.
- Mendoza-Salgado, R.A., C. Lechuga-Devéze. 1996. Diagnóstico preliminar, Banderitas, Bahía Magdalena, B.C.S. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. División de Biología Experimental/ Grupo de Ecofisiología Marina (s.f.), La Paz, Baja California Sur, México. Reporte técnico.
- Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. Environ. Stud.* 15(4): 523-530.
- Munda I.M. 1984. Salinity dependent accumulation of Zn, Co and Mn in *Scytosiphon lomentaria* (Lyngb.) and *Enteromorpha intestinalis* (L.) from the Adriatic Sea, *Bot. Mar.*, 27: 371–376.

- Muñoz-Barbosa, A., E.A. Gutiérrez-Galindo, J.A. Segovia-Zavala, F. Delgadillo Hinojosa, G. Sandoval-Salazar. 2004. Trace metal enrichment in surface sediments of the northwest coast of Baja California, Mexico. *Mar Poll Bull.* 48:596-603.
- Muse, J.O., J.D. Stripeikis, F.M. Fernández, L. d'Huicque, M.B. Tudino, C.N. Carducci, O.E. Troccoli. 1999. Seaweeds in the assessment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. *Environ. Pollut.* 104: 315–322.
- Nagai, T., T. Yukimoto. 2003. Preparation functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chem.* 81: 327-332.
- Nagalakshmi, N., M.N.V. Prasad. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science.* 160 (5): 291-299.
- Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333-339.
- Okamoto O.K., D.L. Robertson, T.F. Fagan. 2001. Different regulatory mechanisms modulate the expression of dinoflagellate iron-superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 276: 19989-19993 .
- Orduña-Rojas, J.,D., C.J. Robledo, C.J. Dawes. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* J. Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán Mexico. I. Seasonal physiological and biochemical responses. *Bot Mar* 45: 453–458.
- Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol.* 68: 1166-1173.
- Palatnik, J.F., V.B. Tognetti Poli H.O., Rodríguez, R.E., Blanco, N., Gattuso, M., Hajirezaei, M.R., Sonnewald, U., Valle E.M., Carrillo N. 2003.

Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP(H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. *Plant J* 35: 332–341.

- Palatnik, J.F., E.M. Valle, N. Carrillo. 2002. Oxidative stress and damage in chloroplasts from dawn to dusk. En: *Advances in Plant Physiology A*. Hemantaranjan, (eds) Scientific Publishers, Jodhpur, India, Vol. 4, 75-88p.
- Pearson, G.A., I.R. Davison. 1994. Freezing stress and osmotic dehydration in *Fucus distichus* (Phaeophyta): Evidence for physiological similarity. *J. Phycol.* 30: 257–267.
- Pedersen, A. 1984. Studies on phenol content and heavy metal uptake in fucoids. *Hydrobiologia.* 116(117):498–504.
- Pereira, P., H. De Pablo, F. Rosa-Santos, M. Pacheco, C. Vale. 2008. Metal accumulation and oxidative stress in *Ulva* sp. substantiated by response integration into a general stress index. *Aquat Toxicol.* 91 (4) :336-345.
- Persky, A.M., P. Green, L. Stublely, C. Howell, L. Zaulyanov, G. Brazeau, J. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle *in vivo* and *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223: 59-66.
- Phooprong, P., H. Ogawa, K. Hayashizaki. 2008. Photosynthetic and respiratory responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss collected from Kumamoto, Shizuoka and Iwate, Japan. *J Appl Phycol* 20:743–750.
- Pinto, E., T.C.S. Sigaud-Kutner, M.A. Leitao, O.K. Okamoto, D. Morse, P. Colepicolo. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39: 1008–1018.

- Rama Devi, S., M.N.V. Prasad. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Sci.* 138(2):157–165.
- Ratkevicius, N., J.A. Corre, A. Moenne. 2003. Copper accumulation, synthesis of ascorbate and activation of ascorbate peroxidase in *Enteromorpha compressa* (L.) Grev. (Chlorophyta) from heavy metal-enriched environments in northern Chile. *Plant, Cell and Environment* 26: 1599- 1608.
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, G. Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152–159.
- Riosmena-Rodríguez, R., A. Talavera-Sáenz, B. Acosta-Vargas, S.C. Gardner. 2010. Heavy metals dynamics in seaweeds and seagrasses in Bahía Magdalena, B.C.S., México. *J App Phycol.* 22 (3): 283-291.
- Rodríguez-Figueroa, G. 2004. Geoquímica de los oligoelementos, elementos mayores y elementos de las tierras raras en los sedimentos marinos del distrito minero de Santa Rosalía, B.C.S., México. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional. La Paz, México.
- Rodríguez, R.J., C.L. Miranda, J.F. Stevens, M.L. Deinzer, D.R. Buhler. 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 39 (5): 437-445.
- Rodríguez-Castaneda, A.P., I. Sanchez-Rodríguez, E.N. Shumilin, D. Sapozhnikov. 2006. Element concentrations in some species of seaweeds from La Paz bay and La Paz lagoon, south-western Baja California, México. *J App Phycol* 18: 399-408.

- Rodríguez-Meza, D., E. Choumiline, L. Méndez-Rodríguez, B. Acosta-Vargas, D. Sapozhnikov . 2007. Composición química de los sedimentos y macroalgas del complejo lagunar Magdalena-Almejas. En: Funes-Rodríguez R., Gómez-Gutiérrez, J., Palomares-García, R., (eds). Estudios ecológicos en Bahía Magdalena. CICIMAR-IPN, La Paz, Baja California Sur, México. 61-81.
- Rodríguez-Meza, G. D. 2005. Caracterización geoquímica de componentes mayores y elementos traza de sedimentos de los ambientes marinos costeros adyacentes a la península de Baja California. Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional. La Paz, México.
- Ross, C., K.L. Van Alstyne. 2007. Intraspecific variation in stress-induced hydrogen peroxide scavenging by the ulvoid macroalga *Ulva lactuca*. J. Phycol. 43: 466–474.
- Rossa, M. M., M.C. de Oliveira, O.K. Okamoto, P.F. Lopes, P. Colepicolo. 2002. Efect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). J App Phycol. 14: 151–157.
- Salgado, L.T., L.R. Andrade, G.M. Amado Filho. 2005. Localization of specific monosaccharides in cells of the brown alga *Padina gymnospora* and the relation to heavy-metal accumulation. Protoplasma. 225: 132–128.
- Salgado, L.T.; Andrade, L. R., G.M. Amado Filho. 2005. Localisation of specific monosaccharides in cells of the brown alga *Padina gymnospora* and the relation to heavy metal accumulation. Protoplasma. 225:123-128.

- Sánchez-Rodríguez, I.Y., Ma. C. Fajardo-León, C. Oliveiro-Pantoja. 1989. Estudio florístico estacional de las algas en Bahía Magdalena, B.C.S., México. *Investigaciones Marinas CICIMAR* .4 (1): 35-48.
- Say, P.J., I.G. Burrows, B.A. Whitton. 1990. *Enteromorpha* as a monitor of heavy metals in estuaries. *Hidrobiologia*.195: 119-126.
- Sbartai, H., M.R. Djebar, R. Rouabhi, I. Sbartai, H. Berrebbah. 2011. Antioxidative response in tomato plants *Lycopersicon esculentum* L. roots and leaves to zinc. *American-Eurasian J Tox Sci*. 3 (1): 41-46.
- Sharma, M.K., G.R. Buettner. 1993. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An ESR study. *Free Radical Bio Med*.14 (6): 649-653
- Sies, H. 1986. *Oxidative stress*. Academic Press. San Diego. USA. 507p.
- Singleton, V.L., J.A. Jr. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*. 16:144-58.
- Stadtman, E.R., R.L. Levine. 2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci*. 899:191-208.
- Stengel, D.B., A. Macken, L. Mormson, N. Mopmey. 2004. Zinc concentrations in marine macroalgae and a lichen from western Ireland in relation to phylogenetic grouping, habitat and morphology. *Mar Poll Bull*. 48:902-909.
- Stohs, S.J., D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*. 18:321–336.

- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD, En: N. Taniguchi and J. Gutteridge (eds.), Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford Univ. Press. Oxford. UK.91-95p.
- Szalontai, B., L.I. Horvath, M. Debreczeny, M. Droppa, G. Horvath. 1999. Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photosynth Res.* 61:241–252.
- Talavera-Sáenz, A.L., S.C. Gardner, R. Riosmena-Rodríguez, B. Acosta-Vargas. 2007. Metal profiles used as environmental markers of green turtle (*Chelonia mydas*) foraging resources. *Sci Tot Env.* 373: 94-102.
- Thoma, I., C. Loeffler, A.K. Sinha, M. Gupta, M. Krischke, B. Steffan, T. Roitsch, M.J. Mueller. 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34: 363–375.
- Torres, M., C. Pires-Testa, C. Gáspari, M. Masutti, C. Neves-Panitz, R. Curi-Pedroza, E. Alves-de Almeida, P. Di Mascio, D. Wilhelm-Filho. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar Pollu Bull.* 44:923–932.
- Villares, R., E. Carral, X. Puente, A. Carballeira. 2005. Metal levels in estuarine macrophytes: differences among species. *Estuaries* 28(6):948–956.
- Koch, V., L.B. Brooks, W.J. Nichols. 2007. Population ecology of the green/black turtle (*Chelonia mydas*) in Bahía Magdalena, Mexico. *Mar Bio.* 153 (1): 35-46.
- Wang, W.X., R.C.H. Dei. 2001. Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P and Si). *Water Res.* 35: 315–21.

- Yu, Q., J.T. Matheickal, P. Yin, P. Kaewsarn. 1999. Heavy metal capacities of common marine macroalgal biomass. *Water Res.* 33:1534–1537.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, UK. 663 p.
- Zubia, M., D.Y. Robledo, Y. Freile-Pelegrin. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from The Yucatan Peninsula, Mexico. *J. App Phycol.* 19: 449-458.

ANEXOS

Tabla I. Variación estacional de la temperatura y oxígeno disuelto en en tres sitios de Bahía Magdalena, Baja California Sur, en las fechas de muestreo.

Mes	Temperatura (°C)			Oxígeno disuelto (%)			Profundidad (m)		
	La Estufa	Conchalito	La Boca	La Estufa	Conchalito	La Boca	La Estufa	Conchalito	La Boca
Noviembre	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Febrero	19.9	20.4	20.4	7.41	7.33	7.35	1	7	14
Abril	22	22.9	22.8	5.95	6.41	6.67	1	7	14
junio	22.7	23.9	22.7	6.27	6.53	6.89	1	7	14

(-) datos no colectados

Tabla VII. Coeficientes de correlaciones extraídas del análisis de factores para todas las variables analizadas.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Mes	0.174958	-0.219881	-0.024916
Localidad	0.055816	-0.001005	0.584985
Especie	0.941600	0.138638	0.120761
Grupo	0.971313	0.062103	-0.077859
SOD	0.008396	0.797452	0.046300
GST	-0.012408	0.798483	0.121709
GPx	0.100142	0.878008	-0.032366
GR	-0.331030	0.109466	0.389672
Carbonilos protéicos	0.430540	-0.177016	-0.311209
TBARS	-0.021457	0.338296	0.230908
Polifenoles	-0.149615	0.126748	0.060059
Varianza explicada	2.191828	2.289655	0.687098

Abreviaturas: SOD, superóxido dismutasa; GST, glutatión-S-transferasa; GPX, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; TBARS, lípidos peroxidados.. Los valores mayores a 0.70 se consideran significativos.