

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE  
INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO  
INTEGRAL REGIONAL  
UNIDAD SINALOA**



**DEPARTAMENTO DE MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO  
SUSTENTABLE**

**Actividad antioxidante, quelante Cu y fungicida de compuestos  
fenolicos de *Rhizophora mangle* en tres sitios con diferente  
perturbación antropogénica**

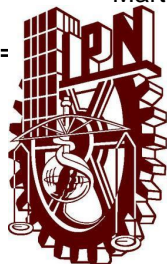
**M. en C. IVÁN GUADALUPE MARTÍNEZ  
ÁLVAREZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUICITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**GUASAVE, SINALOA, 2015**



## CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Guasave, Sinaloa. El día 24 de noviembre del año **2015**, el (la) que suscribe **IVÁN GUADALUPE MARTÍNEZ ÁLVAREZ** alumno(a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B101624**, adscrito(a) al **Centro Interdisciplinario Integral Regional Unidad Sinaloa**, manifiesto que es el autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dres. Héctor A. González Ocampo y María Eugenia Jaramillo Flores** y cede los derechos del trabajo titulado **Actividad antioxidante, quelante Cu y fungicida de compuestos fenolicos de *Rhizophora mangle* en tres sitios con diferente perturbación atropogénica**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [hgocampo@yahoo.com](mailto:hgocampo@yahoo.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'I' followed by 'Gpe. Martínez Álvarez'. The signature is written over a horizontal line.

**Iván Gpe. Martínez Álvarez**  
**Nombre y firma del alumno(a)**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13-B

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS  
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS*

Guasave, Sinaloa a 9 de noviembre del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa en su sesión ordinaria No. 11 celebrada el día 5 del mes de noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Martínez Álvarez Iván Guadalupe  
Apellido paterno Apellido materno Nombre (s)  
Con registro: 

B	1	0	1	6	2	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
Actividad antioxidante, quelante Cu y fungicida de compuestos fenólicos de *Rhizophora mangle* en tres sitios con diferente perturbación antropogénica

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Actividad antioxidante, quelante de cobre y anti fúngica de fenoles extraídos de *Rhizophora mangle* y su relación con el tipo de perturbación antropogénica.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Héctor Abelardo González Ocampo y Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:  
CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.  
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

**Directores de Tesis**

Dr. Héctor Abelardo González Ocampo

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

**Aspirante**

M.C. Iván Gpe. Martínez Álvarez

**Presidente del Colegio**

Dra. Diana Cecilia Escobedo Urías



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de Guasave siendo las 11:00 horas del día 9 del mes de noviembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa para examinar la tesis titulada:

Actividad antioxidante, quelante Cu y fungicida de compuestos fenólicos de *Rhizophora mangle* en tres sitios con diferente perturbación antropogénica

Presentada por el alumno:

<u>Martínez</u>	<u>Álvarez</u>	<u>Iván Guadalupe</u>				
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)				
Con registro:						
B	1	0	1	6	2	4

aspirante de:


Doctor en Ciencias en Biotecnología

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

**LA COMISIÓN REVISORA**  
Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Héctor A. González Ocampo


  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Eugenia Jaramillo Flores

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Luna González

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Cipriano García Gutiérrez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Diana Verónica Cortés Espinoza

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Diana Cecilia Escobedo Urías



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION

**Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en hombros de gigantes.**

**-Isaac Newton-**

## AGRADECIMIENTO A MIS DIRECTORES DE TESIS

Por darme la oportunidad para desarrollar el presente trabajo de investigación, a pesar de mis limitados concomimientos en el área. Ya que mis conocimientos hasta maestría estuvieron enfocados en ecología.

Por ser mi guía, compartiéndome sus conocimientos y sugerencias basadas en su quehacer profesional, que me fueron de gran ayuda para incursionar en el camino de la investigación, ayudándome de manera objetiva a plasmar ideas claras y lograr culminar el presente proyecto.

Su mano dura y exigencias, han logrado crear en mí a una persona más objetiva y analítica, haciéndome más consiente de mis habilidades y capacidades así como también a conocer mis límites.

En resumidas cuentas agradecido estoy por mostrarme el camino y por ser parte de mi formación en el mundo de la ciencia y la investigación. Gracias amigos, profesores y directores! Seguro estoy que este trabajo es el fin del principio de grandes cosas.

MUCHAS GRACIAS!

## AGRADECIMIENTOS

Las palabras no bastan para expresar todos mis agradecimientos a cada una de las personas que me han acompañado a lo largo de esta experiencia.

En primera instancia agradezco a la fuerza creadora que nos rige y marca el rumbo por ayudarme a ser perseverante aun cuando el camino era incierto, por darme inteligencia, paciencia, fuerza, salud y templanza para así realizar mi trabajo de la mejor forma posible.

Desde luego a **MI FAMILIA** por estar siempre pendiente dándome ánimos y apoyo para hacer los momentos difíciles más llevaderos, gracias a cada uno de ellos, a mis padres, hermanos, sobrinos, primos, así como a mis segunda familia Pinto Torres por estar presente en todo momento.

A mi única compañera y amiga de generación Paola Valenzuela por compartir tantos momentos y experiencias académicas y personales (llevarme a los gigantes de Tula, cuando yo quería ir a los prismas basálticos), a mis amigos (as) y compañeros de laboratorio Andrés, Mónica, Arlene, Alicia, Glenda, Claudia, Dámaris, Carmen. Así como a una gran amiga Xochitl Xenón.

Un agradecimiento muy especial a mis amigas y cuasi colegas las Dras. Karla Leva y María Luisa Leal, por su apoyo intelectual, en la revisión y redacción de artículo, y por todas sus sugerencias y aportaciones, gracias.

A la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), particularmente al laboratorio de biopolímeros y anexos, a mis amigos Miguel, Claudia, Paty, Abril, Ameyally, Yanet, Lily, Amor, Faby y Nancy, gracias por el apoyo en los ajustes, así como por esas noches de relax y por enseñarme a conocer la Ciudad de México.

A mi comité tutorial integrado por los Dres. Diana Verónica Cortéz, Cipriano García Gutiérrez, Antonio Luna González y al suplente Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez gracias por compartir sus acertadas observaciones, comentarios y sugerencias enriqueciendo de esta forma mi trabajo.

Por ultimo a algunas instituciones que me ayudaron en ciertos análisis de laboratorio como Federal Química, particularmente al Ing. José Luis Reyes Rosas y Victor Yepez Sánchez.

A CIBA TLAXCALA.

A CIIDIR Sinaloa, mi centro de estudios

A CONACyT y PIFI, Por su apoyo financiero durante 4 años.

A INAPI, por su apoyo para la con la beca Terminación de tesis

A todos y a cada uno de ustedes MIL GRACIAS!



## ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES .....	4
2.1 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante .....	4
2.2 Actividad antimicrobial.....	6
2.3 Relación de fenoles ante el estrés .....	8
2.4 Problemáticas de los manglares.....	9
2.4.1 Bahía Magdalena:.....	9
2.4.2 Bahía de Navachiste:.....	10
2.4.3 Laguna de Términos:.....	11
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS .....	13
3.1 OBJETIVOS .....	13
3.1.1 GENERAL .....	13
3.1.2 ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO IV: PATENTES .....	14
IV.1 SOLICITUD IMPI MX/a/2015/009493, FOLIO MX/E/2015/052942 “MICRÓENCAPSULADOS A BASE DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE <i>Rhizophora mangle</i> COMO ADITIVOS ANTI FUNIGICIDA EN CULTIVOS AGRICOLAS”.....	14
CAPITULO V: ARTÍCULOS.....	15
V.1 THE PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND ANTIOXIDANT AND CU CHELATING ACTIVITIES IN <i>R. mangle</i> (RIZOPHORACEAE) UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL POLLUTION.....	15
V.2 In vitro antifungal effect of mangrove ( <i>Rhizophora mangle</i> ) extracts on <i>Fusarium verticillioides</i> isolates .....	55
CAPÍTULO VI ANEXOS .....	82
VI.1 Determinación de taninos condensados.....	82
CAPITULO VII: Determinación de organoclorados.....	82
Colecta de sedimento .....	82
Plaguicidas organoclorados.....	82
Análisis estadístico .....	85
Resultados organoclorados .....	86
Porcentaje de recuperación .....	86

Correlaciones de organoclorados y metales pesados con las concentración de compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antioxidante y quelante de Cu de <i>R. mangle</i> .....	88
Predicción de efectos toxicológicos y biológicos .....	93
DISCUSIÓN .....	95
Plaguicidas: .....	95
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES .....	101
LITERATURA CITADA .....	102

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

Los humedales son ecosistemas donde el agua es el principal factor regulador del medio, y de la vida vegetal y animal asociada (Ramsar, 2004). Entre los humedales más importantes por su valor ecológico se encuentran los ambientes de manglar, que son ecosistemas de pantanos dominados por árboles llamados mangles, caracterizados por ubicarse en aguas relativamente tranquilas (estuarios, bahías, ensenadas, lagunas costeras, esteros, entre otros). El suelo puede estar inundado permanentemente o sólo en las mareas más altas (Sánchez-Páez *et al.*, 2000).

Los manglares son plantas halófitas facultativas que pueden crecer en salinidades desde 0 ups (dulceacuícolas) hasta hipersalinas (> 40 < 90 ups), alcanzando su máximo desarrollo en condiciones salobres  $\approx 15$  ups (McGill, 1958). Juegan un importante papel en la ecología de las costas tropicales que proporcionan bienes y servicios ambientales a las poblaciones humanas. Estos incluyen: protección y estabilización de la línea de costa, criaderos para numerosos recursos pesqueros económicamente importantes, y una variada fuente de productos a las poblaciones humanas costeras en forma de madera, leña y carbón (Yáñez-Arancibia *et al.*, 1999).

El establecimiento de asentamientos humanos alrededor de ecosistemas de manglar es motivado por la posibilidad de extraer productos asociados a estos ecosistemas, por ejemplo, Walsh (1977) registró más de 70 productos comerciales derivados de árboles de mangle (citado por Kabil y Bacon, 1994).

Las plantas medicinales constituyen el elemento más importante dentro de la Medicina Tradicional. Se considera una planta potencialmente medicinal, a todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, metabolitos secundarios con determinada actividad biológica, que permite utilizarlos con fines terapéuticos. La información de que una planta se emplea en Medicina Tradicional indica con frecuencia su estudio científico, considerando que muchos medicamentos valiosos se han derivado de plantas (Akerlele, 1987; Fuentes, 1988).

Los ecosistemas de manglar son un recurso natural con taninos y la madera que producen, son de gran valor por la dura y pesada madera de *Rhizophora* utilizada para la fabricación de barcos resistente a las termitas y organismos marinos (Rao,1994). Por otro lado, los manglares han sido utilizados durante siglos en medicina tradicional para curar diferentes enfermedades (Chopra, 1956).

Los preparados obtenidos a partir de la corteza de *R. mangle* se emplean en forma de cocimiento para el tratamiento de enfermedades de la garganta y en la tuberculosis pulmonar (Roig, 1988). El cocimiento de la corteza y las raíces se usan contra la lepra y el jarabe contra el asma. La decocción de las hojas es empleada en el tratamiento de personas afectadas por envenenamientos con pescados contaminados, úlcera péptica, trastornos digestivos, infecciones de la piel, enfermedades venéreas (Rojas y Coto, 1978) e infecciones fúngicas (Cáceres *et al.*, 1993).

En la última década se demostraron varias propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle*, que incluyen, prevención de la mastitis bovina (Armenteros, 1998) y eficacia en la curación de las heridas (Bulnes *et al.*, 2001, Fernández *et al.*, 2002), propiedades antimicrobianas (Montes de Oca *et al.*, 2001; Melchor *et al.*, 2001), tratamiento de las infecciones uterinas (Agüero, 2004), úlceras gastroduodenales (Sánchez *et al.*, 2001) y propiedades antiinflamatorias (Marrero *et al.*, 2006).

Estas cualidades son debidas a los compuestos bioactivos presentes en las plantas como los compuestos fenólicos que pertenecen a una de las principales clases de metabolitos secundarios, que poseen un anillo aromático (C6) y uno o más sustituyentes hidroxil , algunos se encuentran esterificados o glicosilados (Peterson *et al.*, 1998; Shahidi, 2000; Stalickas 2007).

Los compuestos fenólicos poseen alrededor de 8,000 variantes estructurales y se sintetizan a partir de dos principales rutas metabólicas: La ruta del Shikimato, la cual origina fenilpropanoides como ácidos hidoxicinámicos y la ruta del acetato, lo

cual produce fenoles simples y quinonas (Ajila *et al.*, 2011; Ignat *et al.*, 2011; El-Seedi *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015).

El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es fuente de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos oxidativos sobre la función celular (González *et al.*, 2001). Los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante y esta característica brinda protección a las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Martínez *et al.*, 2002; Scalbert *et al.*, 2005). El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Miller *et al.*, 1993; González *et al.*, 2001).

Existen informes que tratan sobre la inducción de compuestos fenólicos y la peroxidasa en las plantas tratadas con altas concentraciones de metales (Michalak *et al.*, 2006). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe a su alta tendencia a quelar metales. Los fenólicos poseen grupos hidroxilo y carboxilo, capaces de unirse en particular hierro y cobre (Bors *et al.*, 1990; Sánchez *et al.*, 2006). Las raíces de muchas plantas expuestas a metales pesados exudar altos niveles de compuestos fenólicos (Winkel, 2002).

Además los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes y tienen varias funciones en las plantas, dentro de las más importantes es que juegan un papel en la defensa de estas contra diversos estreses bióticos y abióticos, son esenciales para el crecimiento y reproducción de plantas, contribuyendo con la pigmentación de las plantas y como atrayentes de polinizadores, protegen a las plantas de la luz UV (Shahidi, 2000; Munne-Bosch *et al.*, 2004; Treutter, 2006).

Dada a la respuesta de los compuestos fenólicos ante diversos niveles estrés como la contaminación, el presente trabajo evalúa el comportamiento de los mismos en tejido de *R. mangle* de tres sitios con diferente tipo de contaminación: Bahía Magdalena, BCS.- Sin contaminación aparente (Shumilin *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007). Bahía Navachiste, Guasave, Sin. Que presenta contaminación por

organoclorados (Montes *et al.*, 2011) y Laguna de Términos, Campeche contaminada principalmente por hidrocarburos (Olguín *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

### 2.1 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

Entre los estudios relacionados con compuestos fenólicos destaca la caracterización química realizada al extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* que reveló la presencia de polifenoles (54.78 %), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %), destacándose la presencia en estos últimos de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico, además se encontraron galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, se refiere la presencia de carbohidratos (17.5 %) libres y enlazados; ácidos grasos (4.0 %) de cadena larga, saturados e insaturados; fitoesteroles 2 (0.0285 %); componentes volátiles o semivolátiles (70 compuestos) (0.0205 %) y aromas o aceites esenciales no volátiles (Sánchez, 1998).

Loo *et al.*, 2007. Trabajó con la actividad antioxidante y captación de radicales del ácido piroleñoso (vinagre de madera) de una planta de mangle, *Rhizophora apiculata*. Encontrando una correlación positiva entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante con  $R^2$  que van desde 0.9624 hasta 0.9979.

Son muchos los trabajos que mencionan las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos dentro de los que destacan el de Velazquez-Cardeno *et al.* (2007) quienes evaluaron las actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. Encontrando que los extractos de *Salvia aratocensis* y *Bidens reptans*, presentaron la mayor capacidad de capturar el radical DPPH. A su vez, tuvieron el mayor contenido total de fenoles.

Por otro lado, Almaraz *et al.*, 2007. Demostraron actividad antioxidante de polifenoles extraídos del polen monofloral recolectado por las abejas del árbol de mezquite (*Prosopis juliflora*), por la inhibición de la peroxidación lipídica en microsomas de hígado de ratón e *in vivo* intoxicados con bromobenceno.

Respecto a trabajos realizados particularmente con actividad antioxidante en manglares destacan el de Sánchez *et al.* (2007) trabajaron con las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y de su fracción polifenólica mayoritaria evaluadas en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Demostrando que efectivamente el extracto de *R. mangle* L. presenta propiedades antioxidantes en todos los niveles de complejidad evaluados y que la fracción polifenólica mayoritaria es el principal determinante de las mismas.

También en la India, Agoramoorthy *et al.*, 2008, evaluaron 5 plantas halófilas (*Arthrocnemum indicum*, *Suaeda monoica*, *S. maritima*, *Sesuvium portulacastrum* and *Ipomoea pes-caprae*) y 8 plantas de manglar (*Avicennia officinalis*, *Bruguiera cylindrica*, *Ceriops decandra*, *Rhizophora apiculata*, *R. mucronata*, *Aegiceras corniculatum*, *Excoecaria agallocha* and *Acanthus ilicifolius*) para determinar su contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Los polifenoles fueron significativamente más altos en las 8 plantas de manglar que en las 5 halófilas.

Deepanjan *et al.* (2008) determinaron la actividad antioxidante de 23 extractos de diferentes partes de plantas (hojas, tallo y raíz) de 6 manglares y 4 plantas asociadas al manglar, así como determinaron la concentración de compuestos fenólicos, encontrando que las mayores concentraciones se encontraron en el tallo de *C. decandra* (94.41 GAE) y mencionan que los manglares constituyen una importante fuente de antioxidantes naturales.

Shi (2010) encontró que el compuesto pinobanksin-3-caffeoylate presenta actividad antioxidante y varios de los compuestos fenólicos se ensayaron para la actividad inhibidora de la proteína quinasa en un ensayo que implica 24 diferentes tumorales relacionadas con proteínas quinasas humanas. Además los compuestos mostraron una inhibición potencial contra insectos.

Asha *et al.* (2012) determinaron el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto de raíz de *Rhizophora apiculata* y *Acanthus ilicifolius*, su propiedad antioxidante y se examinó el efecto protector del extracto de raíz de *R. apiculata* sobre el estrés oxidativo. Encontrando que el extracto de raíz de mangle tuvo un efecto beneficioso en la mejora de estrés oxidativo en el cerebro de ratas que puede atribuirse a la presencia de compuestos como polifenoles y flavonoides.

Mingzhe *et al.* (2012), trabajaron con el contenido fenólico total y las actividades antioxidantes de varios extracto y las fracciones de tallo de *R. apiculata*. Los resultados indicaron que la fracción butanol posee el mayor contenido de fenoles totales (181,84 mg/g GAE/g de extracto seco) con la antioxidante más potente. Concluyendo que los extractos de *R. apiculata* podría ser una potencial fuente de antioxidantes naturales.

Sung *et al.* (2014) trabajaron con el contenido fenólico, su actividad antioxidante y la actividad inhibidora de la tirosinasa de plantas de mangle en Micronesia. Encontrando que el contenido fenoles totales varió 4.87 a 11.96 mg por g de muestras secas. La actividad antioxidante más alta se observó en la corteza *R. stylosa* (85.5%). La mayor actividad inhibidora de tirosinasa fue encontrado en la corteza de *S. alba*. Además, el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante fueron mayores en extractos de metanol que en extractos acuosos. Concluyendo que los manglares pueden ser excelentes fuentes de compuestos antioxidantes.

## 2.2 Actividad antimicrobial

Varios taninos como el ácido tánico, ácido gálico, ácido elágico, epicatequina, epicatequina galato y epigallocatequina galato mostraron actividad antibacterial frente a *Staphylococcus aureus* (Akiyama *et al.*, 2001), propiedades antifúngicas frente a las levaduras: *Candida glabrata*; *Candidata krusei* y *Cryptococcus neoformans* por taninos hidrolizables (Latté y Kolodziej, 2000) y actividad antimicrobiana frente a patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *P. intermedia* por taninos aislados de *Vaccinium vitis-idaea* (Ho *et al.*, 2001).

Dentro de los trabajos realizados destaca el de Winkelhausen *et al.*, 2005, evaluaron la actividad antifúngica de compuestos fenólicos extraídos de *Oliva*



*pomace* seco contra *Alternaria solani*, *Botrytis cinera* y *Fusarium culmorum*, encontrando una inhibición del crecimiento de los tres hongos con a concentraciones de 0.1 y 0.2 % (w/v) de compuestos fenólicos.

Galeotti *et al.*, 2008, aislaron del clavel (*Dianthus caryophyllus*) un flavonoide glucósido (glycoside) kaempferol 3-O-c-D-glucopyranosyl (1 → 2)-O- β -D-glucopyranosyl (1 → 2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 6)]- β -D-glucopyranoside. Encontraron que los flavonoides exhibieron actividad contra *Fusarium oxysporum*.

Sá *et al.*, 2009, estudiaron la actividad antioxidante de metabolitos secundarios de duramen de *Myracrodruon urundeuva* y la inhibición del crecimiento de *Fusarium*, así como la actividad repelente contra *Corniger nasutitermes*. Encontrando que el extracto metanólico (compuestos fenólicos y flavonoides) mostró efecto en la inhibición del crecimiento de *Fusarium decemcellulare*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*, pero no mostró actividad repelente. Xue-gui *et al.* (2010), en su trabajo Flavonoides antifúngicos de *Ficus sarmentosa* var. *henryi* (King) Corner, encontraron un efecto antagónico contra 6 hongos de cultivo entre ellos *Fusarium graminearum*, siendo la luteolina quién mostró la mayor actividad inhibitoria.

Marzouk *et al.*, 2010, estudiaron la actividad antibacteriana y antifúngica de algunas poblaciones de *Tunisian Citrullus* y *colocynthis Schrad.* Siendo *Colocynthis* s. quién mostró mayores propiedades antibacterianas y antifungicas.

Salas *et al.*, 2011, trabajaron con la actividad antifúngica natural y enzimáticamente modificada de flavonoides aislados de cítricos. Todos los flavonoides presentaron efecto antimicótico. La intensidad de esta actividad depende del tipo de hongos y compuestos utilizados. El laurato glucósido hesperetina inhibe fuertemente crecimiento del micelio de *Penicillium expansum*, mientras que prunin decanoato fue el flavonoide que más inhibió *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *Fusarium semitectum*. Los flavonoides naringina, hesperidina y neohesperidina, obtenido como subproducto de bajo costo de la los residuos de las industrias de cítricos, presentan una opción interesante para estas industrias.

Mldadul *et al.*, 2011, estudiaron las actividades antioxidantes y antibacterianas de extracto metanólico, etanólico y cloroformo de hojas y cortezas del mangle *Bruguiera gymnorrhiza*. En sus resultados mencionan que el extracto etanólico de cortezas mostró el mejor resultado en todas las pruebas antioxidante, relacionándolo positivamente con el contenido fenólicos totales. Concluyendo que los extractos de etanol y metanol podrían inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*), mientras que el extracto de cloroformo de hojas no mostraron ninguna actividad antibacteriana. El efecto antimicrobiano de extracto de etanol de cortezas fue mayor que todos los demás extractos.

### **2.3 Relación de fenoles ante el estrés**

Dado que las plantas son inmóviles, han desarrollado mecanismos que las hacen resistentes a ambientes adversos que les generan estrés, dichos mecanismos les permiten mantenerse estables, estas capacidades de resistencia son atribuidas a los flavonoides y otros compuestos fenólicos los cuales realizan diferentes funciones en la pared celular y en membranas (Moore *et al.*, 2005). Los flavonoides ayudan a vivir a plantas en suelos ricos en metales tóxicos como aluminio (Barceló *et al.*, 2002) así como también le dan protección contra el fotodaño (Ryan *et al.*, 2002).

Destacan estudios como el de Pardos (2004), quien trabajó con la respuesta de las plantas al anegamiento de suelos, encontró que los compuestos fenólicos producen cambios a nivel fisiológico en las mismas, volviéndolas más resistentes a estrés hídrico.

Jithesh *et al.* (2006) se enfocaron en el monitoreo de perfiles de expresión de genes antioxidantes a la salinidad, hierro, oxidación, la luz y las tensiones hiperosmóticas en la sal altamente tolerante del mangle gris, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Mediante análisis de mRNA encontraron que los niveles de catalasa y ferritina mostraron inducción a corto plazo en respuesta al estrés por NaCl. Así como también los niveles de catalasa, ferritina y mRNA fueron inducidos por el

hierro, el estrés luz y por tratamiento directo estrés H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que confirma su papel en la respuesta al estrés oxidativo.

Chutipaijit *et al.*, 2009, estudiaron la acumulación diferencial de prolina y flavonoides en 4 variedades de arroz indica bajo condiciones diferentes de salinidad, encontrando que las vías metabólicas de prolina y flavonoides se relacionan con las variedades tolerantes a la sal más que las variedades sensibles.

## **2.4 Problemáticas de los manglares**

Las actividades humanas relacionadas con el desarrollo urbano, industrial y turístico, así como el desarrollo agrícola, ganadero y acuícola, que compiten por el suelo en donde se asientan los manglares, constituyen la principal amenaza para los manglares. . Adicionalmente, los manglares han recibido presiones por efecto de la contaminación: desechos sólidos urbanos, contaminantes industriales, pesticidas y fertilizantes agrícolas, derrames de petróleo, etc., así como modificaciones a las condiciones hidrológicas. Distintos estudios a nivel internacional señalan que recuperar un manglar que ha sido severamente dañado puede tomar muchos años cuando ello es posible; en muchas ocasiones la pérdida es total e irreversible (CONABIO, 2008).

Dentro de las investigaciones que se han realizado en las áreas de estudio destacan los siguientes.

### **2.4.1 Bahía Magdalena:**

El desarrollo económico en la bahía indudablemente contribuiría al deterioro de este cuerpo de agua, es por ello, que el presente estudio y el compendio de estudios biológicos, físicos y químicos pueden ser la base para proponer programas de monitoreo de la calidad del agua y de sedimento, principalmente en aquellas áreas donde existen sospechas de posibles fuentes de contaminación (e.g., Puerto San Carlos; Shumilin *et al.*, 2005) o estén sujetas a un eventual impacto ambiental, sobre todo los sitios relacionadas con el desove y crianza de larvas de peces de importancia económica (e.g., Morales-Zárate *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos algunos estudio pueden ser la base sobre la cual se definan posibles áreas de protección ecológica y particularmente para el uso y aprovechamiento sustentable de los recursos naturales, se ha sugerido que la bahía no tiene problemas de contaminación, al menos, por metales (Shumilin *et al.*, 2005; Rodríguez-Meza *et al.*, 2007).

#### **2.4.2 Bahía de Navachiste:**

La principal actividad en el área de estudio, incluyendo casi el 70% del municipio de Guasave, es la agricultura intensiva que se caracteriza por el uso del riego y de los altos niveles de fertilizantes y pesticidas, cuyo objetivo es aumentar en gran medida el rendimiento y la productividad. Otra actividad importante es la pesca, con la mayoría de las capturas que se están recogiendo los pescadores artesanales. Además, existe una pesquería bien desarrollada industrial del camarón, la acuicultura de camarón se ha vuelto tan importante en las últimas dos décadas, que ahora entra en conflicto con otras actividades como la pesca tradicional y la agricultura (Ruiz Luna y de la Lanza Espino, 1999).

Las principales fuentes de contaminación para el complejo lagunar Navachiste-Macapule son aguas residuales de drenes agrícolas producto de desagües del distrito de riego #063 (ID-063) cuya localización geográfica está entre los meridianos 108°18'00" y 108°42'00' de longitud Oeste y los paralelos 25°52'00" y 25°37'00" de latitud Norte, a una altitud promedio de 40 msnm (SARH, 1982; CONAGUA, 2007b). Dicho dren transporta fertilizantes y pesticidas del campo, así como descargas de granjas camaroneras situadas en los márgenes de la laguna (Hernández-Cornejo *et al.*, 2005). El distrito de riego #063 es una de las regiones agrícolas más importantes de México con ~ 116.615 hectáreas de tierras agrícolas, de las cuales 107.036 ha. Están altamente tecnificadas, con riego artificial y contienen grandes cantidades de agroquímicos que se aplican cada ciclo agrícola (CNA 2007; González-Farías 2003; González-Farías *et al.*, 2006).

Dentro de los trabajos enfocados a la determinación de plaguicidas organolcorados en Navachiste-Macapule, Sinaloa, detaca el de Montes *et al.* (2011), donde

encontraron plaguicidas como: metoxicloro, endrín, heptacloro (prohibidos), cuyas mayores concentraciones se presentaron durante lluvias por escorrentía de los campos agrícolas.

### **2.4.3 Laguna de Términos:**

Esta ANP en más del 90 % es considerada en perfectas condiciones (Labougle, 2002) siendo el área más importante para aves invernales del Golfo de México (Toledo, 2003). La laguna presenta una alta diversidad y se combina con amplio rango de funciones de la laguna-humedales y el paisaje, incluyendo una estrecha conexión con la productividad de la Sonda de Campeche (CONANP-SEMARNAT, 1997).

Por otro lado, la Bahía de Campeche aporta las mayores pesquerías de México y se encuentra entre dos provincias geológicas: al este la península de Yucatán al oeste y al sur las tierras bajas de Tabasco y Los altos de Chiapas y Guatemala, (Robadue *et al.*, 2004). Hay cuatro ríos de cuenca principales que desembocan al interior de la laguna de Términos. El río Candelaria al extremo noroeste, es una de las fuentes de abastecimiento más importante, su cuenca se encuentra principalmente en la Península de Yucatán, este río junto con el río Mamantel forman la laguna de Panlau, que conecta con la Laguna de Términos a la entra de Pargos. Esta unión forma el sistema Candelaria-Panlau. El río Chumpan se desarrolla en la llanura costera a través de los ríos Salsipuedes y San Joaquín y las corrientes finalmente desembocan en el extremo sur de Laguna de Términos (Robadue *et al.*, 2004).

Existe una gran diversidad de ambientes estuarinos, que incluyen manglares, pantanos de baja salinidad, pastos marinos, ostras de arrecife, áreas de alta sedimentación, y bajas salinidades en la zona oligohalina. Existen dos fuentes distintas de aporte de sedimentos en la laguna: Fluviales y Calcáreos procedentes de las playas orientales de la laguna (Yáñez-Arancibia *et al.*, 1983).

La Laguna de Términos cuenta con más de 250,000 ha. de manglar de más de 30 m. interconectados por canales naturales y vías fluviales, mismos que cuentan con buena salud. Entre las especies de manglar reportadas se encuentran reportadas *R. mangle*, *Laguncularia racemosa*, *Avicennia germinans* y *Conocarpus erecta*. Se estima que 106,000 ha. de manglar se encuentran puros y han sido registrados en el último estudio de uso de suelo hecho para el área (EPOMEX, 2004).

Este sistema lagunar es uno de los más estudiados debido a: 1) presentan una alta diversidad en especies y hábitat; 2) Por sus recursos: peces, moluscos y crustáceos; 3) su interacción con la sonda de Campeche; 4) Su gran desarrollo industrial (industria del petróleo) y el desarrollo general que está tomado en sus costas y áreas cercanas; 5) aún no ha llegado a niveles críticos de contaminación (Robadue *et al.*, 2004).

Alejandro Toledo, examinó el caso de las cuencas hidrográficas Usumacinta-Grijalva para ilustrar las importantes conexiones entre los ríos, océanos y costas de México. En resumen identifica: los cambios en patrones naturales el flujo del río y la sedimentación de los lechos de los ríos como lo más grave; la acelerada pérdida de la vegetación en las cuencas altas, causado por la tala descontrolada, así como un cambio en la ganadería y la agricultura, el tercer servicio ambiental que está en peligro, son y; los suelos, debido a la erosión. La contaminación del agua y otras fuentes de contaminación afectan las cuencas hidrográficas, aguas residuales urbanas y rurales son ampliamente descargadas sin previo tratamiento. Pocas instalaciones se han diseñado adecuada mente para el manejo de residuos sólidos, especialmente los tóxicos y peligrosos.

Para Laguna de Términos y sus afluentes la industria del petróleo ha sido durante mucho tiempo la principal preocupación, junto con los residuos industriales en los efluentes urbanos así como los productos agroquímicos. Por último, y muy importante punto, como los es la pobreza y marginación, los municipios de Carmen y Palizada cuentan con una alta proporción de pueblos con nivel extremo de marginación (Toledo, 2003).

## **CAPÍTULO III: HIPÓTESIS**

La concentración de compuestos fenólicos y flavonoides de *R. mangle* presentan actividad antioxidante, quelante Cu y actividad antifúngica, mismas que varían con el tipo de perturbación antropogénica.

### **3.1 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 GENERAL**

Determinar la actividad antioxidante, quelante de Cu y fungicida de compuestos fenolicos de *R. mangle* bajo diferentes tipos de perturbación antropogénica contra el hongo *Fusarium verticillioides*, cepas (PO3, DA42 Y F64)

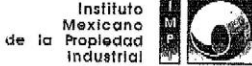
.

#### **3.1.2 ESPECÍFICOS**


1. Cuantificar los compuestos fenólicos y flavonoides de *R. mangle*
2. Analizar qué tipo de tejido presenta las mayores concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides
3. Determinar qué tejido presenta la mayor actividad antioxidante y quelante Cu
4. Correlacionar la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antioxidante y quelante Cu con el tipo de perturbación antropogénica
5. Determinar la actividad antifúngica de los flavonoides de *R. mangle*.

**CAPÍTULO IV: PATENTES**

**IV.1 SOLICITUD IMPI MX/a/2015/009493, FOLIO MX/E/2015/052942 "MICROENCAPSULADOS A BASE DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE *Rhizophora mangle* COMO ADITIVOS ANTI FUNIGICIDA EN CULTIVOS AGRICOLAS".**




Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial	Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI. Sello  Folio de entrada  Fecha y hora de recepción
---	---

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL  
 Dirección Divisiva de Patentes

Solicitud: MX/a/2015/009493  
 Expediente: 23/JUL/2015 Hora: 12:30:05  
 Folio: MX/E/2015/052942 486559



Antes de llenar la forma lee las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL	
2) Nacionalidad (es): MEXICANA	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCIÓN GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LÓPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738	
Población, Estado y País: DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO	
4) Teléfono (clave): 55 57296200 EXT 51971 Y 51975    5) Fax (clave): 55 51183245	
II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): HÉCTOR ABELARDO GONZÁLEZ OCAMPO, IGNACIO EDUARDO MALDONADO MENDOZA, MARÍA EUGENIA JARAMILLO FLORES E IVÁN GUADALUPE MARTÍNEZ ÁLVAREZ	
7) Nacionalidad (es): MEXICANAS	
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: GENARO SOTO, S/N, COLONIA CALLEJONES DE GUASAVITO, C.P. 81108	
Población, Estado y País: GUASAVE, SINALOA, MÉXICO	
9) Teléfono (clave): (687) 8729626 EXT. 87600    10) Fax (clave):	
III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR	
12) R.G.P.: 08592	
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCIÓN GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LÓPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738	
Población, Estado y País: DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, D.F., MÉXICO 14) Teléfono (clave): 55 57296200 EXT. 51971 Y 51976 15) Fax (clave): 55 51183245	
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: CARLOTA MARTÍNEZ MARTÍN	
17) Denominación o Título de la Invención: MICROENCAPSULADOS A BASE DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE RHIZOPHORA MANGLE COMO ADITIVOS ANTI FUNIGICIDA EN CULTIVOS AGRICOLAS	
18) Fecha de divulgación previa	19) Clasificación internacional <span style="float: right;">uso exclusivo del IMPI</span>
Día    Mes    Año	
20) Divisiva de la solicitud	
21) Fecha de presentación	
Día    Mes    Año	
22) Prioridad Reclamada:	
Número	Figura jurídica
País	Fecha de presentación
	Día    Mes    Año
	No. de serie
Lista de verificación (uso interno)	
No. Hojas <input checked="" type="checkbox"/> 1    Comprobante de pago de la tarifa <input checked="" type="checkbox"/> 14    Descripción y reivindicación (es) de la invención <input checked="" type="checkbox"/> 1    Dibujo (s) en su caso <input checked="" type="checkbox"/> 1    Resumen de la descripción de la invención <input checked="" type="checkbox"/> 1    Documento que acredite la personalidad del apoderado	No. Hojas <input checked="" type="checkbox"/> 4    Documento de cesión de derechos Constancia de depósito de material biológico Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa Documento (s) de prioridad Traducción TOTAL DE HOJAS



## CAPITULO V: ARTÍCULOS

### V.1 THE PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND ANTIOXIDANT AND CU CHELATING ACTIVITIES IN *R. mangle* (RHIZOPHORACEAE) UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL POLLUTION

Enviado a Aquatic Botany

Elsevier Editorial System(tm) for Aquatic Botany  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND ANTIOXIDANT AND CU CHELATING ACTIVITIES IN RHIZOPHORA MANGLE (RHIZOPHORACEAE) UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL POLLUTION

Article Type: Research Paper

Section/Category: chemical ecology, ecophysiology, ecotoxicology, exotic species, stoichiometry, trophic interactions

Keywords: mangrove; mangrove physiology; phenolic compounds; secondary metabolites; marine pollution

Corresponding Author: Prof. HECTOR ABELARDO GONZALEZ-OCAMPO, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Instituto Politecnico Nacional-CIIDIR Unidad Sinaloa

First Author: Iván G Martínez-Álvarez, MSc.

Order of Authors: Iván G Martínez-Álvarez, MSc.; María E Jaramillo-Flores, Ph.D.; Antonio LUNA-GONZALEZ, Ph.D.; Guadalupe D RODRIGUEZ-MEZA, Ph.D.; HECTOR ABELARDO GONZALEZ-OCAMPO, Ph.D.

Suggested Reviewers: Norman C Duke Ph.D.  
Professor, James Cook University, Australia, Townsville, Australia  
n.duke@uq.edu.au

He has more than 50 peer reviewed manuscripts listed in the JCR databas with more than 2600 citations.

Susan M Bengtson Nash Ph.D.  
Professor, Griffith School of Environment, Griffith University, Brisbane, Australia  
s.bengtsonnash@griffith.edu.au

She has more than 26 peer reviewed manuscripts listed in the JCR database and more than 300 citatios to her papers. She is specialist in the organochlorine pesticides presence in the biota.

Yukshan Wong Ph.D.  
Professor, Department of Biology, Hong Kong University of Science and Technology  
opyswong@cityu.edu.hk

He has authored more than 120 per reviewed manuscripts listed in the JCR database and been cited in more than 4400 scientific documents regarding toxicity and pollutants in plants.

B Nath Ph.D.  
Professor, School of Geosciences, The University of Sydney  
bibhash12@gmail.com

He is authired of more than 50 manuscripts listed in the JCR database and been cited in more than 770 scientific papers regarding the mangrove role in the bioremediation and metal pollution in sediments.

\*Cover Letter



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

**CIIDIR – I P N Unidad Sinaloa**



Guasave, Sinaloa, Aug 04th, 2015.

**AQUATIC BOTANY JOURNAL**  
PROFS. J.E. VERMAAT, E.M. GROSS AND T. WERNBERG  
EDITORS IN CHIEF

Dear Professors

In the name of coauthors and myself, we would like to submit of the manuscript entitled “**PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND ANTIOXIDANT AND CHELATING ACTIVITIES IN RHIZOPHORA MANGLE (RHIZOPHORACEAE) FROM THREE DIFFERENT POLLUTED LAGOONS**”, in the intention to be published in the prestigious journal “**Aquatic Botany**”.

Submission of this article implies that the work described has not potential conflicts of interest, has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis, and it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder, that in this case will be the editorial where the manuscript will be published. All authors disclose any actual or potential conflict of interest including any funding source, study sponsor, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted manuscript that could inappropriately influence, or be perceived to influence, this work. All funding sources who contributed in the experimental works are acknowledged in the proper section of the Aquatic Botany Journal section.

**Novelty of the work.**

The study evaluates the variation of total phenolic compounds, total flavonoids content, antioxidant and copper chelating activity of *R. mangle* in three different coastal lagoons under different anthropogenic pollutant inputs. This is the first time that these variables are evaluated in the same species under different environmental pollute conditions and its effects on the concentration of total phenolic and flavonoid compounds and Antioxidant and copper chelating activities.

**Author contributions**

IGMA, carried on the experiments and wrote the manuscript

GDRM, directed the laboratory experiments, reviewed and analyzed the results and wrote the manuscript.

ALG, reviewed results and wrote the manuscript

HAGO, project responsible, responsible of the design of the experiments, analyzed the results, reviewed and wrote manuscript.

Please receive best regards,

**PROF. HÉCTOR ABELARDO GONZÁLEZ OCAMPO, Ph.D.**  
CIIDIR-IPN, UNIDAD SINALOA.  
CORRESPONDING AUTHOR

Bulevar Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, C.P. 81101. Guasave, Sinaloa.  
e-mail: [ciidirs@ipn.mx](mailto:ciidirs@ipn.mx); Tel. (687) 87 29626 y 29625

\*Highlights (for review)

**Highlights**

Antioxidant and chelating capacity of *Rhizophora mangle* were determined.

*R. mangle* extracts shows a high antioxidant and chelating capacity.

Phenolic concentration vary among extracts, three populations

Phenolic concentration vary according to the pollutants.

Chelating and Antioxidant capacities is related to the total phenolic compounds.

\*Manuscript

[Click here to download Manuscript: 2015 08 04 PHENOL AA AND CHEL IN R MANGLE.doc](#) [Click here to view linked References](#)

1    **PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AND ANTIOXIDANT AND**  
2    **CHELATING ACTIVITIES IN *RHIZOPHORA MANGLE* (RHIZOPHORACEAE)**  
3    **FROM THREE DIFFERENT POLLUTED LAGOONS**

4    Iván G. Martínez Álvarez<sup>1</sup>, María E. Jaramillo Flores<sup>2</sup>, Antonio Luna-González<sup>3</sup>,  
5    Guadalupe D. Rodríguez-Meza<sup>3</sup> & Héctor A. González Ocampo<sup>3\*</sup>

6    <sup>1</sup>Universidad de Occidente, Av. Universidad S/N, Fracc. Villa Universidad, 81048

7    Guasave, Sinaloa, México. +52 687 872 9807; [igma\\_biologi@hotmail.com](mailto:igma_biologi@hotmail.com)

8    <sup>2</sup> Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Sinaloa. Juan de Dios Bátiz Paredes Boulevard No.

9    250 Guasave, Sinaloa, Mexico. C.P. 81101. +52687879626; [tonol69@yahoo.com](mailto:tonol69@yahoo.com);

10    [xcaret02@hotmail.com](mailto:xcaret02@hotmail.com)

11    <sup>3</sup> Instituto Politécnico Nacional-ENCB. Carpio and Plan of Ayala s/n, Col. Santo Tomas

12    C.P. 11340 Del. Miguel Hidalgo Mexico, DF, Mexico; [jaramillo\\_flores@hotmail.com](mailto:jaramillo_flores@hotmail.com)

13    \* Corresponding author: [hocampo@yahoo.com](mailto:hocampo@yahoo.com)

14

15 **Abstract**

16 The main objective of this study was to determine the variation of total phenolic (TPC) and  
17 total flavonoid (TFC) content and the antioxidant (AA) and copper chelating (Cu+CA)  
18 activities of *Rhizophora mangle* from three coastal lagoons under different anthropogenic  
19 pollution. TPC in the stem extracts was correlated to the sites under oil extraction pollution  
20 and that in leaves extracts to the sites where UV-B radiation intensity is higher. AA in root  
21 and stem extracts was correlated to the oil pollution and that in leaf extracts was correlated  
22 to the sites under higher UV-B radiation intensity. Cu+CA was significantly higher in stem  
23 extracts and was not correlated to the presence of pollution. Concentration of the assessed  
24 metabolites in *R. mangle* structures varies as a protection against the presence of pollution  
25 or UV-B radiation intensity, which influences the concentration of phenolic compounds  
26 even in the same species from different geographical locations.

27 **Keywords:** mangrove; mangrove physiology; phenolic compounds; secondary metabolites;  
28 marine pollution

29 **1. Introduction**

30 Wetlands are ecosystems where water fluxes control the environment and the associated  
31 plant and animal life; mangrove communities are among the most important wetlands based  
32 on their ecological value (RAMSAR, 2013). Mangrove communities consist of trees that  
33 belong to different families and are found in tropical and subtropical latitudes (Duke et al.,  
34 1998). Five mangrove species occur in the tropical coastal zone of Mexico: black  
35 mangrove (*Avicennia germinans*), buttonwood (*Conocarpus erectus*), red mangroves  
36 (*Rhizophora harrisonii* and *R. mangle*) and white mangrove (*Laguncularia racemosa*)

37 (Rico-Gray and Palacios-Rios, 1996). These ecosystems provide shelter and food sources  
38 for both marine and terrestrial life, as well as sources of wood and food for human  
39 communities in coastal regions. They contribute to litter decomposition and nutrient  
40 enrichment in the complex food webs as important energy transfers (Kathiresan and  
41 Bingham, 2001) and are valuable as nursery areas for shrimp and feeding areas for fish  
42 (Marshall, 1994). Mangroves also play the roles of natural barriers protecting the coast  
43 against the surges, carbon accumulation, detritus and pollutants input in their sediments  
44 (Kaiser et al., 2011).

45 Phenolic compounds in mangroves are able to protect these plants from ultraviolet  
46 radiation, and to defend them from herbivores and pathogens. Different environmental  
47 conditions, like UV light radiation, oxygen stress, organic pollution, oil pollution  
48 (Kathiresan and Bingham, 2001), salinity (Sivanadanam et al., 2012), metal pollution  
49 (Guangqiu et al., 2007; Shirvani Mahdavi et al., 2012) and domestic wastewater supplies  
50 (Herteman et al., 2011), whose can be related to the polyphenol concentration or AA and  
51  $\text{Cu}^+\text{CA}$  in mangroves.

52 The three lagoon systems examined in this study are subjected to different levels of  
53 anthropogenic disturbance. The Terminos Lagoon is located in the Gulf of Mexico ( $18^\circ 35'$   
54  $\text{N}$  and  $91^\circ 32' \text{W}$ ) and is impacted by the activities of the oil industry that exploits the  
55 Campeche basin located in the Gulf of Mexico, corresponding to the greatest oil reserve in  
56 Mexico (Robadue et al., 2004). This activity causes contamination in the adjacent coastal  
57 lagoons such as organic persistent pollutants (Zapata-Perez et al., 2007; Carvalho et al.,  
58 2009), urban wastewater (García-Ríos et al., 2013) and metals (Benítez et al., 2012), which  
59 are concentrated in the sediments of the Terminos Lagoon and, therefore, in the mangroves

3

60 (Fig. 1). The Navachsite Bay is located in the south-eastern part of the Gulf of California  
61 (25° 28' N and 108° 48' W), and borders the most important agricultural area of Mexico  
62 (Orduña-Rojas and Longoria-Espinoza, 2006). Agriculture in the Guasave Valley produces  
63 the largest corn harvests in more than 100,000 hectares that generate pollution from the use  
64 of organochlorine pesticides whose residues are disposed into the Navachsite Bay. These  
65 residues are trapped in the sediments of the lagoon system (Montes et al., 2011) or are  
66 incorporated into marine biota that inhabits this system, such as fish (Reyes-Montiel et al.,  
67 2013; Granados-Galván et al., 2015) (Fig. 1). The Magdalena Bay is a lagoon system  
68 located in the Pacific in the western part of the Baja California Peninsula (26° 44' N and  
69 113° 09' W). It is a virtually pristine system that is not impacted by industries or large-scale  
70 agriculture, but presents an environmental degradation and resource use conflicts  
71 throughout the lagoon, like artisanal fisheries (Malagrino et al., 2008; Ángel Ojeda Ruíz de  
72 la Peña and Ramírez Rodríguez, 2014; Ojeda-Ruiz et al., 2015), aside of natural arsenic  
73 pollution (Shumilin et al., 2005). The system receives municipal wastes of one city with  
74 less than 100,000 inhabitants, their wastes being dispersed by the hydrodynamics of this  
75 lagoon (Zaitsev et al., 2014) (Fig. 1).  
76 UV-B radiance affects plants, and higher exposure to UV-B affects the phenolic  
77 concentration (Detrés et al., 2001; Babu et al., 2003; Huyskens-Keil et al., 2007; Agati and  
78 Tattini, 2010; Julkunen-Tiitto et al., 2014). Specifically, UV-B increases soluble phenolic  
79 compounds and reduces aboveground biomass, soluble fructan concentrations and  
80 digestibility (Comont et al., 2013).  
81 Although it is clear that environmental conditions like pollution, stress, and UV-B light  
82 intensity affect the polyphenols concentration in mangroves, there are no studies in the

4

83 same species affected by different anthropogenic pollutants or different latitudes associated  
84 to UV-B light intensity. In this sense, this study evaluated the changes in phenolic  
85 compounds content, chelating and antioxidant activity in *R. mangle* from Magdalena Bay,  
86 Navachsite Bay and Terminos Lagoon under different anthropogenic pollution.

## 87 **2. Methods**

### 88 **2.1. Study sites**

89 The coastal lagoons of Magdalena Bay, Navachiste Bay and Terminos Lagoon are located  
90 in Mexico. Magdalena Bay is located on the Pacific coast and is under low anthropogenic  
91 impact from artisanal fisheries that intensively exploit only some areas of this lagoon due to  
92 its remoteness from populated areas (Hastings and Fischer, 2001); industrial activities are  
93 not affecting this area. Navachsite Bay is located on the Gulf of California coast and,  
94 because of the intense agricultural activity surrounding this area, it presents high  
95 contamination indices of polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine pesticides, and  
96 heavy metals (Paez-Osuna et al., 2002; Montes et al., 2011). On the other side, Terminos  
97 Lagoon is located on the Atlantic coast and is under the constant impact of the surrounding  
98 oil industry responsible for the development, refining, marketing, and exporting of Mexican  
99 oil (Robadue et al., 2004) (Table 1, Fig. 1).

### 100 **2.2. Experimental design**

#### 101 **2.2.1. Mangrove samples analysis**

102 The leaf, stem and root samples of *Rhizophora mangle* were collected in Magdalena Bay,  
103 Navachsite Bay and Terminos Lagoon in June, July and August 2011, respectively.  
104 Samples of leaves were collected manually, excluding young (<1.5 m) and old (rough  
105 barks) plants, as well as those leaves showing yellowish colour or broken edges. The



106 samples of stems and aerial roots were extracted firstly by scraping the surface with a jack-  
107 knife to collect the samples (Macfarlane et al., 2003; Naranjo-Sánchez and Troncoso-Olivo,  
108 2008). A total of three samples per tissue and five trees per point were taken per area (n =  
109 75). After the samples were collected, they were cleaned with distilled water and preserved  
110 under dark conditions in aluminium foil. In the laboratory, the samples were dehydrated in  
111 an oven (Riossa® E-47), at 40°C until constant weight ( $\pm 5$  days). After dehydration, the  
112 samples were milled in a grain grinder (Krups® GX 4100, Type F408, Mexico). Finally,  
113 samples were stored in black plastic bags, under darkness, in dry and at room temperature  
114 conditions until analysis.

115 **2.2.2. Extraction and isolation of phenolic compounds (Midadul et al., 2011; Asha et**  
116 **al., 2012)**

117 To each milled dry sample (0.5 g), 10 ml of ethanol at 5°C (80%, v/v) was added, and the  
118 samples were shaken (30 min) on a heating plate (Cimarec®, USA) avoiding light at room  
119 temperature, and then filtered through Whatman® paper # 1. The supernatant was separated  
120 and the precipitate was supplemented with 10 ml of ethanol at 5°C (80%) for a second  
121 extraction. To remove chlorophyll, 20 ml of petroleum ether was added to the solution after  
122 extraction. All supernatant extracts were kept in darkness and refrigerated until analysis. To  
123 calculate the total phenolic content, total flavonoid content, scavenging capacity, and  
124 copper chelating activity, three aliquots (three replicas per aliquot) of the extracts of stem  
125 (100  $\mu$ l), bark (10  $\mu$ l), and root (20  $\mu$ l) were diluted with ethanol (800  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) at 900, 990 and  
126 980  $\mu$ l at room temperature.

127 **2.2.3. Determination of total phenolic content (TPC)**

128 Total phenols in extracts of *R. mangle* were determined using the Folin-Ciocalteu reagent  
129 (Adom and Liu, 2002). Each extract (100  $\mu$ l) was supplemented with Folin-Ciocalteu  
130 reagent (750  $\mu$ l) diluted 10 times with distilled water. This mixture was kept in darkness (5  
131 min) and, thereafter, a 60  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (750  $\mu$ l) was added to neutralize the  
132 reaction. After incubation (90 min), the absorbance was measured (750 nm), and the TPC,  
133 expressed as gallic acid equivalents (GAE) per 100 g dry basis (db) ( $\text{mg GAE} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ db}$ ),  
134 was estimated from a calibrated curve of gallic acid, read (750 nm) in a Thermo Scientific®  
135 Spectrophotometer UV-VIS, model Genesys 10s ( $r^2 = 0.9968$ ).

#### 136 **2.2.4. Determination of total flavonoid content (TFC)**

137 TFC was obtained taking 100  $\mu$ l of extract and adding as described (Sultana et al., 2009):  
138 75  $\mu$ l of  $\text{NaNO}_2$  (50  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 75  $\mu$ l of  $\text{AlCl}_3$  (100  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) after 5 min; 500  $\mu$ l of  $\text{NaOH}$  (40  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )  
139 <sup>1</sup>), and 600  $\mu$ l of distilled water 6 min later. The solution was mixed and the absorbance  
140 was measured (510 nm) within 30 min in the Thermo Scientific® Spectrophotometer  
141 previously described. Results were reported as milligrams of catechin per gram dry basis  
142 ( $\text{mg CE} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ db}$ ). The calibration curve of catechin was performed with a standard  
143 solution (0.1  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

#### 144 **2.2.5. ABTS•+ radical-scavenging capacity**

145 This was measured by the discoloration method (Arnao et al., 2001) with some  
146 modifications. Briefly, the method consists in preparing a solution with  $\text{ABTS}^{•+}$  (0.0384 g)  
147 and  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (0.0066 g) diluted with 10 ml of distilled water and incubated for 12 h; after  
148 incubation and the formation of the radical  $\text{ABTS}^{•+}$ , 550  $\mu$ l (working solution) was diluted  
149 to 50 ml in ethanol. In the case of the  $\text{ABTS}^{•+}$  solution, it was diluted with distilled water  
150 to a 0.70 absorbance ( $\text{SD} = 0.02$ ) at 734 nm at room temperature according to Pawlak et al.

151 (2010) in a Thermo Scientific® Spectrophotometer. An aliquot of ABTS<sup>++</sup> solution (990 µl)  
 152 supplemented with ethanol (800 g • l<sup>-1</sup>, 10 µl) and all samples in triplicate were read every  
 153 min for 7 min, calculating the scavenging activity with the next formula:

$$154 \text{ ABTS}^{++} \text{ Inhibition (\%)} = \left[ \frac{\text{Abs sample } T_0 - \text{Abs sample } T_5}{\text{Abs Sample } T_0 - \left( \frac{\text{Abs Control } T_0 - \text{Abs Control } T_5}{\text{Abs Control } T_0} \right)} \right] \times 100$$

155 Where: *Abs sample* = sample absorbance; *Abs control* = control absorbance; *T<sub>0</sub>* = minute  
 156 zero; *T<sub>5</sub>* = five minutes. The absorbance decrease was expressed as the inhibition  
 157 percentage of ABTS<sup>++</sup> expressed as Trolox equivalent per gram of dry basis (20-200  
 158 µmol•l<sup>-1</sup>).

#### 159 2.2.6. Copper chelating activity (Cu+CA)

160 Cu<sup>+</sup> chelating activity was evaluated using the method described by Saiga et al. (2003),  
 161 adding to 290 µl of 50 mM acetate buffer (pH 6.0), 6 µl of 4 mM pyrocatechol violet,  
 162 copper (20 µl), and 1 µg (10 µl) (CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O). The colour change from blue to yellow in  
 163 the solution was measured at 632 nm in the same Thermo Scientific® Spectrophotometer  
 164 used above, with the following equation:

$$165 \text{ Chelating rate} = \left[ \frac{(A_{0(\text{control})} - A_{1(\text{sample})})}{A_{0(\text{control})}} \right] \times 100$$

166 Where: *A<sub>0</sub>* = Absorbance of the control (blank, without extract); *A<sub>1</sub>* = Absorbance in the  
 167 presence of the extract, and; *C<sub>u</sub>* = chelating activity assay.

#### 168 2.2.7. Heavy metals in sediment

169 Two sediment samples per point (24 total samples) were collected in the same four points  
 170 from Magdalena Bay, Navachsite Bay and Terminos Lagoon from January to August 2011.  
 171 All samples were collected with a Teflon spoon and wrapped immediately in aluminium

172 foil, placed into polyethylene bags, stored in an icebox, and then kept in a freezer for  
173 preservation until analysis in the laboratory.

174 **2.2.8. Heavy metals content in sediments**

175 The Fe, Cu, Pb, Ni, Cd, and Mn contents were determined by acidic digestion (Breder,  
176 1982) . Sediment samples were dried (60°C) during 48 to 96 h and homogenized by  
177 grinding. A 0.5 g sample was placed on heating plates with 5 ml aqua regia (1:3 HCl:  
178 HNO<sub>3</sub>) until dryness. After cooling, the solution was adjusted to 50 ml with deionized  
179 water and stored in plastic vials until analysis. Total content of metals was determined by  
180 flame atomic absorption spectroscopy (GBC® Avanta) (air-acetylene flame) recovering  
181 over 90% with respect to the certified material, in the Environmental Pollution Laboratory  
182 of the CIIDIR Sinaloa Research Centre. Blank samples and certified reference materials  
183 (PACS-2, Marine Sediment Reference Materials for Trace Metals and other Constituents,  
184 National Research Council, Canada) were used to ensure standardization.

185 For statistical analyses, mean concentration and standard deviation (SD) were calculated  
186 and the contents of heavy metals in sediments were compared with the compositions of the  
187 average continental crust given by Taylor (1964). All assays were carried out in triplicate.  
188 Data were expressed as means with standard deviations. Two-way ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) was  
189 performed and Pearson's analysis was used to correlate TPC, TFC, AA, and Cu<sup>+</sup> chelating  
190 activity with the kind of pollutant inputs and location sites latitude.

191 **3. Results**

192 **3.1. Total phenolic compounds (TPC)**

193 Leaf values were between  $19 \pm 3$  to  $51 \pm 11$  mg GAE  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db, the highest values  
194 corresponded to Magdalena Bay. Stem extracts fluctuated from  $153 \pm 20$  to  $261 \pm 19$  mg  
195 GAE  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db and root extracts values from  $83 \pm 34$  to  $107 \pm 5$  mg GAE  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db. Terminos  
196 Lagoon obtained the highest values for all three tissues. A significantly higher difference  
197 was found between the leaf extracts in Magdalena Bay and those of Navachsite Bay and  
198 Terminos Lagoon ( $p = 0.001$ ). In the same sense, Terminos Lagoon's TPC values in stem  
199 extracts were significantly higher than in Magdalena Bay and Navachsite Bay ( $p = 0.001$ ).  
200 On the other side, there were no significant differences in the TPC values of root extracts  
201 among sites ( $p = 0.252$ ) (Table 2).

### 202 3.2. Total flavonoid content (TFC)

203 TFC values in leaf extracts were between  $10 \pm 0$  and  $24 \pm 0$  mg CE  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db) with the  
204 highest values in Magdalena Bay. TFC values in stem extracts ranged from  $59 \pm 11$  to  $88 \pm$   
205  $9$  mg CE  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db. TFC values in root extracts were between  $35 \pm 11$  and  $51 \pm 22$  mg CE  $\cdot$   
206 g<sup>-1</sup> db. Significant differences were found among sites and tissues ( $p = 0.001$ ). TFC values  
207 in leaf extracts were significantly higher in Magdalena Bay ( $p = 0.001$ ), significantly lower  
208 in stem extracts in Navachsite Bay ( $p = 0.001$ ), and no significant differences were found in  
209 root extracts (Table 3).

### 210 3.3. ABTS<sup>•+</sup> radical-scavenging capacity

211 AA in leaf extracts ranged from  $7 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$   $\mu$ mol Trolox  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db)  
212 with the highest values in Magdalena Bay, which were between  $5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$  and  $1 \times$   
213  $10^5 \pm 8 \times 10^3$   $\mu$ mol Trolox  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db) in stem extracts and between  $3 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$  to  $5 \times 10^4$   
214  $\pm 1 \times 10^4$   $\mu$ mol Trolox  $\cdot$  g<sup>-1</sup> db) in root extracts, with the highest values in Terminos  
215 Lagoon. Significant differences among sites and tissues were higher ( $p = 0.001$ ) in root

216 extracts and stem extracts in Terminos Lagoon than in the other two sites ( $p = 0.001$ ),  
217 whereas leaf extracts showed no significant differences among sites ( $p = 0.053$ ) (Table 4).

#### 218 **3.4. Copper chelating activity (Cu+CA)**

219  $\text{Cu}^+\text{CA}$  of leaf extracts was between  $38.02 \pm 6.24\%$  and  $39.35 \pm 2.49\%$ . Navachsite Bay  
220 obtained the highest values of  $\text{Cu}^+\text{CA}$ .  $\text{Cu}^+\text{CA}$  of stem extracts oscillated from  $52.82 \pm$   
221  $4.03\%$  to  $56.48 \pm 4.34\%$ , and in root extracts, values were from  $45.07 \pm 3.56\%$  to  $49.50 \pm$   
222  $9.01\%$ . Terminos Lagoon and Magdalena Bay extracts obtained the highest  $\text{Cu}^+\text{CA}$ . There  
223 were no significant differences among sites in  $\text{Cu}^+\text{CA}$  ( $p = 0.905$ ), but the difference was  
224 significant among tissues ( $p = 0.001$ ) (Table 5).

#### 225 **3.5. Metal content in sediments**

226 In Magdalena Bay sediments, Pb was the heavy metal found at above continental crust  
227 average concentrations. The rest of the detected heavy metals were under the continental  
228 crust average (Table 6). For Navachsite Bay sediments, Pb and Zn were above continental  
229 crust average, the rest of the detected heavy metals were under continental crust average  
230 (Table 6). Whereas for Terminos Lagoon sediments, this is the ecosystem where more  
231 metal concentrations were found to be above continental crust average (Table 6), Cu, Pb,  
232 Ni, Zn, and Cd (Table 6). The successive order, from highest to lowest concentrations, in  
233 Magdalena Bay, was  $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd}$ ; for Navachsite Bay it was  
234  $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cd}$ ; and in Terminos Lagoon it was  $\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd}$ .  
235 Metal-metal strong positive correlations ( $r^2$ ,  $p \leq 0.05$ ) were found in Magdalena Bay for Fe-  
236 Cu, Cu-Pb, Cu-Ni, Fe-Pb, Fe-Ni, Pb-Ni, Cu-Zn, Cu-Cd, Cu-Mn, Fe-Zn, Fe-Cd, Fe-Mn, Pb-  
237 Zn, Pb-Cd, Pb-Mn, Zn-Cd, Zn-Mn and Cd-Mn. For Navachsite Bay, they were Cu-Ni, Fe-

238 Pb, Cu-Zn, Ni-Zn. For Terminos Lagoon, they were Cu-Pb, Fe-Ni, Cu-Cd, Pb-Zn, Pb-Cd,  
239 Zn-Cd, Zn-Mn, and Cd-Mn (Table 7). Two sampling groups were formed, one constituted  
240 by four sampling points of Terminos Lagoon and point 3 of Magdalena Bay; the other  
241 group included four points of Navachsite Bay and points 1, 2 and 4 of Magdalena Bay  
242 (Fig. 2).

### 243 3.6. Bioactive compounds correlation

244 TPC contributed significantly ( $p \leq 0.05$ ) and strongly ( $0.601$ ,  $r^2 = 0.973$ ) to the antioxidant  
245 capacities of *R. mangle* tissue extracts between AA and TPC, AA and TFC,  $\text{Cu}^+\text{CA}$  and  
246 TPC, and  $\text{Cu}^+\text{CA}$ . Weak correlations were found between TFC and the heavy metals (Fe,  
247 Cu, Pb, Ni, Zn, Cd, and Mn) in sediments of Magdalena Bay ( $r^2 = 0.572, 0.562, 0.569,$   
248  $0.574, 0.57, 0.545, 0.574$ , respectively). No correlation was found between bioactive  
249 compound/activities (TPC, TFC, AA,  $\text{Cu}^+\text{CA}$  and heavy metals (Fe, Cu, Pb, Ni, Zn, Cd,  
250 and Mn) in sediments ( $r^2$  from  $0.022$  to  $0.290$ ;  $p \leq 0.05$ ) (Fig. 3).

### 251 4. Discussion

252 The highest TPC values in the stem bark extracts of *R. mangle* are similar to those found in  
253 previous studies on mangrove species (Banerjee et al., 2008; Haq et al., 2011;  
254 Krishnamoorthy et al., 2011); phenolic compounds are stored in the stem bark in this  
255 species (Banerjee et al., 2008). On the other side, leaves do not store phenolic compounds,  
256 their lower TPC is explained by the fact that these molecules are constantly being used as  
257 receptors for diverse wavelengths of solar radiation and, thereby, protecting from potential  
258 photo damage (Agati et al., 2007; Agoramoorthy et al., 2008; Agati and Tattini, 2010). The  
259 intermediate TPC values in root extracts can be related to the absorption and conduction of  
260 water and minerals carried out by the roots in *R. mangle* (Taiz and Zeiger, 2002). Root TPC

261 values can be caused by a higher synthesis of phenolic compounds to survive under  
262 particular stress conditions (Jithesh et al., 2006); TPC are synthesized against antioxidant  
263 or chelating activities (Banerjee et al., 2008) and are not accumulated as occurs in barks or  
264 used as in leaves.

265 Leaves contain tannins, flavonoids, terpenoids, alkaloids, as well as steroids and cardiac  
266 glycosides (Mouafi et al., 2014). The higher TPC values in the leaf extracts of *R. mangle*  
267 from Magdalena Bay than from Navachsite Bay and Terminos Lagoon are caused by the  
268 defence role of simple phenols in the protection of leaves against herbivores and photo  
269 damage (Close and McArthur, 2002; Babu et al., 2003; Agati et al., 2007; Agati and Tattini,  
270 2010; Agati et al., 2013) activated by ultraviolet light (Taiz and Zeiger, 2002), and possible  
271 nutrients limitation (Lovelock et al., 1992; Yi-Ming et al., 2009). Magdalena Bay and  
272 Navachsite Bay are latitudinal close, but the higher TPC values in Magdalena Bay are  
273 related to the higher recorded irradiance rates in Magdalena Bay ( $7.93 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ) than  
274 in Navachsite Bay ( $5.9 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ) and Terminos Lagoon ( $6 \text{ kWh}\cdot\text{m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ )  
275 (Solartronic, 2003; SMN, 2013) together with the lack of nutrients limitation in these two  
276 lagoons (Robadue et al., 2004; Yañez-Arancibia and Day, 2006; Carrasquilla-Henao et al.,  
277 2013; Reyes-Montiel et al., 2013), the latter are environmental factors that influence TPC in  
278 leaves.

279 The stem extract TPC values are similar to those found in previous studies in the  
280 *Rhizophora* genus (Batubara et al., 2012). The highest TPC values in stem bark and root in  
281 Terminos Lagoon can be related to the pollution conditions of this site influenced by the oil  
282 extraction industry. Phenols increase in the root in response to pollutants present in the  
283 environment (Loponen et al., 2001; Marquez-Garcia et al., 2009; Sima et al., 2012; Landi et



284 al., 2013). The similar TPC values in roots among the three sites indicate that the kind of  
285 pollutant inputs in these lagoons does not influence the phenolic compounds concentration  
286 in roots that store phenols mainly as tannins (Banerjee et al., 2008).

287 In this study, the TFC values in stem bark were similar to those reported for the *Rizophora*  
288 genus (Batubara et al., 2012). The vacuolar flavonoids constitute a secondary antioxidant  
289 system that is activated upon severe stress conditions (Agati et al., 2012). In Terminos  
290 Lagoon, besides agricultural inputs, the lagoon is constantly affected by the oil industry,  
291 which can increase the stress exerted on the plant. One clue in this aspect is that polyphenol  
292 oxidase activity increases under stress, because of its ability to oxidize and degrade toxic  
293 substances, such as phenolic compounds, which are generally reported to be accumulated  
294 during salt stress (Sivanadanam et al., 2012). Flavonoids protect plants from UV radiation  
295 (Agati et al., 2007) and higher concentration of TFC in leaves is due to the higher UV-B  
296 radiation exposure in Magdalena Bay than in Terminos Lagoon and Navachsite Bay  
297 (Moorthy and Kathiresan, 1997). In addition, Magdalena Bay has a deficit of fresh water  
298 input differing from the conditions of Navachsite Bay and Terminos Lagoon, which receive  
299 agricultural (Orduña-Rojas and Longoria-Espinoza, 2006) and river runoffs (Yañez-  
300 Arancibia and Day, 2006).

301 Regarding AA, our results agree with those found in other *Rhizophora* genera, such as *R.*  
302 *apiculata* (Asha et al., 2012) and *R. mucronata* (Agoramoorthy et al., 2008), indicating a  
303 similarity in the high antioxidant activity potential of *R. mangle* (Liang-Liang et al., 2010;  
304 Sánchez Calero et al., 2011). The AA value in leaves from Magdalena Bay is directly  
305 proportional to the concentrations of TPC and TFC and is similar to the findings of  
306 Agoramoorthy et al. (2008) in the same extract. On the other side, the higher AA values in

307 stem bark and root extracts in Terminos Lagoon can be related to the kind of pollutants to  
308 which *R. mangle* is exposed. Magdalena Bay is almost clean from pollutants in its  
309 ecosystem (Hastings and Fischer, 2001) and Navachsite Bay is constantly impacted by  
310 pesticides from the intensive agriculture surrounding it (Montes et al., 2011). According to  
311 this, salt-excluding species such as *R. mangle* are less susceptible to herbicides (Bell and  
312 Duke, 2005), resulting in less AA as found in Navachsite Bay, but other pollutants such as  
313 heavy metals from the oil industry could be stimulating the AA in Terminos Lagoon.  
314 Regarding Cu<sup>+</sup>CA, TPC and TFC values did not influence the Cu<sup>+</sup>CA of *R. mangle* in the  
315 three sites; nevertheless, stem bark Cu<sup>+</sup>CA was higher than that of the leaf and root extracts  
316 in the three sites. Cu<sup>+</sup>CA depends largely on the number of hydroxyl groups (Mira et al.,  
317 2002) or on a high number of proanthocyanidins (Karamac, 2009). In this sense,  
318 *Rhizophora* species store polyphenolic compounds in stem bark tissue (Agoramoorthy et  
319 al., 2008; Banerjee et al., 2008), predominantly as procyanidins (Liang-Liang et al., 2010),  
320 catechin, epicatechin, epigallocatechin, and epicatechin gallate (Oo et al., 2008). High  
321 amounts of flavonoids improve chelation of metal ions (Symonowicz and Kolanek, 2012)  
322 such as those detected in the stem bark in Terminos Lagoon; the high content of metals in  
323 the superficial mangrove sediments coming from the oil industry could be influencing TPC  
324 and TFC values in *R. mangle*. Metal correlations in Terminos Lagoon were associated with  
325 Fe and Mn, elements known as scavengers (Cox and Preda, 2005); Terminos Lagoon is  
326 close to the Campeche basin, which hosts the largest oil field in Mexico and one of the  
327 largest offshore oil provinces (Scholz-Böttcher et al., 2008), this industry is a potential  
328 source of heavy metals.

329 **5. Conclusions**

330 This study determined that the kind of pollutant influences TPC, TFC, AA and Cu<sup>+</sup>CA in *R.*  
331 *mangle* tissues, but metabolism will produce these secondary metabolites depending on the  
332 plant tissue. In this sense, the stem bark showed the highest values of TPC, TFC, AA and  
333 Cu<sup>+</sup>CA in the three sites. In the stem bark, these are related to the storage of polyphenols to  
334 protect it from heavy metals or other toxic substances, whereas in leaves their function is to  
335 protect the plant from UV-B radiance intensity, and in the roots from salinity stress.  
336 Concentration of the assessed metabolites in *R. mangle* structures varies as a protection  
337 against the presence of pollution (Guangqiu et al., 2007; Shirvani Mahdavi et al., 2012) or  
338 UV-B radiation intensity (Klem et al., 2015) which in this case, increased the concentration  
339 of phenolic compounds even in the same species from different geographical locations.

340 **Acknowledgements**

341 We thank the IPN (SIP-20120079, SIP-20130398) and FOMIX CONACYT-CAMPECHE  
342 (FOMIX-CAMP-2010-144280) for financial support and Mrs. Ingrid Mascher for the  
343 English edition.

344 **References**

- 345 Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant Activity of Grains. *Journal of Agricultural and*  
346 *Food Chemistry* 50, 6182-6187.
- 347 Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in  
348 plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196, 67-76.
- 349 Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013.  
350 Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past.  
351 *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35-45.

- 352 Agati, G., Matteini, P., Goti, A., Tattini, M., 2007. Chloroplast-located flavonoids can  
353 scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174, 77-89.
- 354 Agati, G., Tattini, M., 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection.  
355 *New Phytologist* 186, 786-793.
- 356 Agoramoorthy, G., Chen, F.A., Venkatesalu, V., Kuo, D.H., Shea, P.C., 2008. Evaluation  
357 of Antioxidant Polyphenols from Selected Mangrove Plants of India. *Asian Journal of*  
358 *Chemistry* 20, 1311-1322.
- 359 Ángel Ojeda Ruíz de la Peña, M., Ramírez Rodríguez, M., 2014. Interactions among  
360 shrimp and “catarina” clam fisheries at Magdalena Bay, Baja California Sur Mexico. *Ocean*  
361 *& Coastal Management* 88, 31-37.
- 362 Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to  
363 total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239-244.
- 364 Asha, K.K., Mathew, S., Lakshmanan, P.T., 2012. Flavonoids and phenolic compounds in  
365 two mangrove species and their antioxidant property. *Indian Journal of Marine Sciences* 41,  
366 259-264.
- 367 Babu, T.S., Akhtar, T.A., Lampi, M.A., Tripuranthakam, S., Dixon, D.G., Greenberg,  
368 B.M., 2003. Similar stress responses are elicited by Copper and Ultraviolet Radiation in the  
369 aquatic plant *Lemna gibba*: Implication of Reactive Oxygen Species as common signals.  
370 *Plant and Cell Physiology* 44, 1320-1329.
- 371 Banerjee, D., Chakrabarti, S., Hazra, A.K., Banerjee, S., Ray, J., Mukherjee, B., 2008.  
372 Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. *African J*  
373 *Biotech* 7, 805-810.

- 374 Batubara, I., Kotsuka, S., Yamauchi, K., Kuspradini, H., Mitsunaga, T., Darusman, L.K.,  
375 2012. TNF- $\alpha$  production inhibitory activity, phenolic, flavonoid and tannin contents of  
376 selected Indonesian medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plant* 6, 406-415.
- 377 Bell, A.M., Duke, N.C., 2005. Effects of Photosystem II inhibiting herbicides on  
378 mangroves-preliminary toxicology trials. *Mar Pollut Bull* 51, 297-307.
- 379 Benítez, J., Vidal, J., Bricchieri-Colombi, T., Delgado-Estrella, A., 2012. Monitoring  
380 ecosystem health of the Terminos Lagoon region using heavy metals as environmental  
381 indicators. *Environmental Impact* 162, 349.
- 382 Breder, R., 1982. Optimization studies for reliable trace metal analysis in sediments by  
383 atomic absorption spectrometric methods. *Z. Anal. Chem.* 313, 395-402.
- 384 Carrasquilla-Henao, M., González-Ocampo, H.A., Luna González, A., Rodríguez Quiroz,  
385 G., 2013. Mangrove forest and artisanal fishery in the southern part of the Gulf of  
386 California, Mexico. *Ocean & Coastal Management*.
- 387 Carvalho, F.P., Villeneuve, J.-P., Cattini, C., Rendón, J., Mota de Oliveira, J., 2009.  
388 Pesticide and PCB residues in the aquatic ecosystems of Laguna de Terminos, a protected  
389 area of the coast of Campeche, Mexico. *Chemosphere* 74, 988-995.
- 390 Close, D.C., McArthur, C., 2002. Rethinking the role of many plant phenolics – protection  
391 from photodamage not herbivores? *Oikos* 99, 166-172.
- 392 Comont, D., Winters, A., Gomez, L.D., McQueen-Mason, S.J., Gwynn-Jones, D., 2013.  
393 Latitudinal variation in ambient UV-B radiation is an important determinant of *Lolium*  
394 perenne forage production, quality, and digestibility. *Journal of experimental botany* 64,  
395 2193-2204.

- 396 Cox, M.E., Preda, M., 2005. Trace Metal Distribution Within Marine and Estuarine  
397 Sediments of Western Moreton Bay, Queensland, Australia: Relation to Land Use and  
398 Setting. *Geographical Research* 43, 173-193.
- 399 Detrés, Y., Armstrong, R.A., Connelly, X.M., 2001. Ultraviolet-induced responses in two  
400 species of climax tropical marine macrophytes. *Journal of Photochemistry and*  
401 *Photobiology B: Biology* 62, 55-66.
- 402 Duke, N.C., Ball, M.C., Ellison, J.C., 1998, *Global Ecology and Biogeography*. Blackwell  
403 Scientific Publications.
- 404 García-Ríos, V., Alpuche-Gual, L., Herrera-Silveira, J., Montero-Muñoz, J., Morales-  
405 Ojeda, S., Pech, D., Cepeda-González, M.F., Zapata-Pérez, O., Gold-Bouchot, G., 2013.  
406 Towards a coastal condition assessment and monitoring of the Gulf of Mexico Large  
407 Marine Ecosystem (GoM LME): Terminos Lagoon pilot site. *Environmental Development*  
408 7, 72-79.
- 409 Granados-Galván, I.A., Rodríguez-Meza, D.G., Luna-González, A., González-Ocampo,  
410 H.A., 2015. Human health risk assessment of pesticide residues in snappers (*Lutjanus*) fish  
411 from the Navachiste Lagoon complex, Mexico. *Mar Pollut Bull* 2015.
- 412 Guangqiu, Q., Chongling, Y., Haoliang, L., 2007. Influence of Heavy Metals on the  
413 Carbohydrate and Phenolics in Mangrove, *Aegiceras corniculatum* L., Seedlings. *Bull*  
414 *Environ Contam Toxicol* 78, 440-444.
- 415 Haq, M., Sani, W., Hossain, A.B.M.S., Taha, R.M., Monneruzzaman, K.M., 2011. Total  
416 phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Bruguiera gymnorrhiza*.  
417 *Journal of Medicinal Plants Research* 5, 4112-4118.

- 418 Hastings, R.M., Fischer, D.W., 2001. Management priorities for Magdalena Bay, Baja  
419 California, Mexico. *J Coast Conserv* 7, 193-202.
- 420 Herteman, M., Fromard, F., Lambs, L., 2011. Effects of pretreated domestic wastewater  
421 supplies on leaf pigment content, photosynthesis rate and growth of mangrove trees: A field  
422 study from Mayotte Island, SW Indian Ocean. *Ecological Engineering* 37, 1283-1291.
- 423 Huyskens-Keil, S., Eichholz, I., Kroh, L.W., Rohn, S., 2007. UV-B induced changes of  
424 phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum* L.).  
425 *Journal of Applied Botany and Food Quality* 81, 140-144.
- 426 Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R., Parida, A., 2006. Monitoring expression  
427 profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in  
428 the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA  
429 analysis. *Plant Cell Rep* 25, 865-876.
- 430 Julkunen-Tiitto, R., Nenadis, N., Neugart, S., Robson, M., Agati, G., Vepsäläinen, J.,  
431 Zipoli, G., Nybakken, L., Winkler, B., Jansen, M.A.K., 2014. Assessing the response of  
432 plant flavonoids to UV radiation: an overview of appropriate techniques. *Phytochemistry*  
433 *Reviews*.
- 434 Kaiser, M.J., Attrill, M., Jennings, S., Thomas, D.N., Barnes, D., Brierley, A., Polunin, N.,  
435 Rfaelli, D.G., Williams, P.J., 2011, *Marine Ecology: Processes, Systems and Impacts*. In:  
436 Kaiser, M.J. (Ed.). Oxford University Press, pp. 310-324.
- 437 Karamac, M., 2009. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of  
438 selected edible nuts. *Int J Mol Sci* 10, 5485-5497.
- 439 Kathiresan, K., Bingham, B.L., 2001. *Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems*.  
440 *Adv Mar Biol* 40, 81-251.

- 441 Klem, K., Holub, P., Štroch, M., Nezval, J., Špunda, V., Triska, J., Jansen, M.A.K.,  
442 Robson, T.M., Urban, O., 2015. Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both  
443 induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant*  
444 *Physiology and Biochemistry* 93, 74-83.
- 445 Krishnamoorthy, M., Sasikumar, J.M., Shamna, R., Pandiarajan, C., Sofia, P., Nagarajan,  
446 B., 2011. Antioxidant activities of bark extract from mangroves, *Bruguiera cylindrica* (L.)  
447 Blume and *Ceriops decandra* Perr. *Indian Journal of Pharmacology* 43, 557-562.
- 448 Landi, M., Pardossi, A., Remorini, D., Guidi, L., 2013. Antioxidant and photosynthetic  
449 response of a purple-leaved and a green-leaved cultivar of sweet basil (*Ocimum basilicum*)  
450 to boron excess. *Environmental and Experimental Botany* 85, 64-75.
- 451 Liang-Liang, Z., Yi-Ming, L., Hai-Chao, Z., Shu-Dong, W., Jia-Hong, C., 2010. Condensed  
452 Tannins from Mangrove Species *Kandelia candel* and *Rhizophora mangle* and their  
453 Antioxidant Activity. *Molecules* 15, 420-431.
- 454 Lojonen, J., Lempa, K., Ossipov, V., Kozlov, M.V., Girs, A., Hangasmaa, K., Haukioja,  
455 E., Pihlaja, K., 2001. Patterns in content of phenolic compounds in leaves of mountain  
456 birches along a strong pollution gradient. *Chemosphere* 45, 291-301.
- 457 Lovelock, C., Clough, B., Woodrow, I., 1992. Distribution and accumulation of ultraviolet-  
458 radiation-absorbing compounds in leaves of tropical mangroves. *Planta* 188, 143-154.
- 459 Macfarlane, G., Pulkownik, A., Burchett, M., 2003. Accumulation and distribution of  
460 heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh: biological indication  
461 potential. *Environ Pollut* 123, 139-151.



- 462 Malagrino, G., Lagunas, M., Rubio, A.O., 2008. Environmental impact reduction through  
463 ecological planning at Bahía Magdalena, Mexico. *Journal of Environmental Biology* 29,  
464 179-182.
- 465 Marquez-García, B., Fernández, M.A., Córdoba, F., 2009. Phenolics composition in *Erica*  
466 sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt.  
467 *Bioresour Technol* 100, 446-451.
- 468 Marshall, N., 1994. Mangrove conservation in relation to overall environmental  
469 considerations. *Hydrobiologia* 285, 303-309.
- 470 Midadul, H., Wirakarnain, S., Rosna, M.T., 2011. Total phenolic contents, antioxidant and  
471 antimicrobial activities of *Bruguiera gymnorrhiza*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5,  
472 4112-4118.
- 473 Mira, L., Tereza Fernandez, M., Santos, M., Rocha, R., Helena Florêncio, M., Jennings,  
474 K.R., 2002. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their  
475 Antioxidant Activity. *Free Radical Research* 36, 1199-1208.
- 476 Montes, A.M., Gonzalez-Farias, F.A., Botello, A.V., 2011. Pollution by organochlorine  
477 pesticides in Navachiste-Macapule, Sinaloa, Mexico. *Environ Monit Assess* 184, 1359-  
478 1369.
- 479 Moorthy, P., Kathiresan, K., 1997. Influence of ultraviolet-B radiation on photosynthetic  
480 and biochemical characteristics of a mangrove *Rhizophora apiculata*. *Photosynthetica* 34,  
481 465-471.
- 482 Mouafi, F.E., Abdel-Aziz, S.M., Bashir, A.A., Fyiad, A.A., 2014. Phytochemical Analysis  
483 and Antimicrobial Activity of Mangrove Leaves (*Avicenna marina* and *Rhizophora stylosa*)  
484 Against Some Pathogens. *World Applied Sciences Journal* 29, 547-554.

- 485 Naranjo-Sánchez, Y.A., Troncoso-Olivo, W., 2008. Contents of cadmium, copper, zinc,  
486 and lead in organs of *Rhizophora mangle* in river Sevilla mouth-Ciénaga Grande de Santa  
487 Marta, Colombian Caribbean. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras 37, 107-129.
- 488 Ojeda-Ruiz, M.Á., Ramírez-Rodríguez, M., de la Cruz-Agüero, G., 2015. Mapping fishing  
489 grounds from fleet operation records and local knowledge: The Pacific calico scallop  
490 (*Argopecten ventricosus*) fishery in Bahía Magdalena, Mexican Pacific. Ocean & Coastal  
491 Management 106, 61-67.
- 492 Oo, C.W., Pizzi, A., Pasch, H., Kassim, M.J., 2008. Study on the structure of mangrove  
493 polyflavonoid tannins with MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of Applied Polymer  
494 Science 109, 963-967.
- 495 Orduña-Rojas, J., Longoria-Espinoza, R.M., 2006. Metal Content in *Ulva lactuca*  
496 (Linnaeus) from Navachiste Bay (Southeast Gulf of California) Sinaloa, Mexico. Bull  
497 Environ Contam Toxicol 77, 574-580.
- 498 Paez-Osuna, F., Ruiz-Fernandez, A.C., Botello, A.V., Ponce-Velez, G., Osuna-Lopez, J.I.,  
499 Frias-Espericueta, M.G., Lopez-Lopez, G., Zazueta-Padilla, H.M., 2002. Concentrations of  
500 selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in  
501 mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. Mar Pollut Bull 44,  
502 1303-1308.
- 503 Pawlak, K., Bylka, W., Jazurek, B., Matlawska, I., Sikorska, M., Manikowski, H., Bialek-  
504 Bylka, G., 2010. Antioxidant activity of flavonoids of different polarity, assayed by  
505 modified ABTS cation radical decolorization and EPR technique. Acta Biologica  
506 Cracoviensia Series Botanica 52, 97-104.

- 507 RAMSAR, 2013, The List of Wetlands of International Importance. The Secretariat of the  
508 Convention on Wetlands, Gland, Switzerland, p. 47.
- 509 Reyes-Montiel, N.J., Santamaría-Miranda, A., Rodríguez-Meza, G.D., Galindo-Reyes, J.G.,  
510 González-Ocampo, H.A., 2013. Concentrations of organochlorine pesticides in fish (*Mugil*  
511 *cephalus*) from a coastal ecosystem in the southwestern gulf of California. Biology and  
512 Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy 113B, 1-11.
- 513 Rico-Gray, V., Palacios-Rios, M., 1996. Leaf Area Variation in *Rhizophora mangle* L.  
514 (Rhizophoraceae) Along a Latitudinal Gradient in Mexico. Global Ecology and  
515 Biogeography Letters 5, 30-35.
- 516 Robadue, D., Oczkowski, A., Calderon, R., Bach, L., Cepeda, M.F., 2004, Characterization  
517 of the Region of the Terminos Lagoon: Campeche, Mexico Managing freshwater inflow  
518 to estuaries. Level One Profile, Fresh Water Inflow to Estuaries Project -The Nature  
519 Conservancy and the University of Rhode Island, Campeche, México.
- 520 Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T., 2003. Antioxidant Activity of Peptides Obtained from  
521 Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. Journal of Agricultural and Food  
522 Chemistry 51, 3661-3667.
- 523 Sánchez Calero, J., Martínez Sánchez, G., Faure, R., García Herrera, A., 2011. Protective  
524 effect of polyphenols from *Rhizophora mangle* L. on oxidative damage to proteins and  
525 DNA Revista Cubana de Plantas Medicinales 16, 1-12.
- 526 Scholz-Böttcher, B.M., Ahlf, S., Vazquez-Gutierrez, F., Rullkötter, J., 2008. Sources of  
527 hydrocarbon pollution in surface sediments of the Campeche Sound, Gulf of Mexico,  
528 revealed by biomarker analysis. Organic Geochemistry 39, 1104-1108.

- 529 Shirvani Mahdavi, E., Khajeh Rahimi, A.E., Vakili Amini, H., 2012. Pb and Cd  
530 accumulation in *Avicennia marina* from Qeshm Island. Iranian Journal of Fisheries  
531 Sciences 11, 867-875.
- 532 Shumilin, E., Rodríguez Meza, G.D., Sapozhnikov, D., Lutsarev, S., Murrillo de Nava, J.,  
533 2005. Arsenic Concentrations in the Surface Sediments of the Magdalena–Almejas Lagoon  
534 Complex, Baja California Peninsula, Mexico. Bull Environ Contam Toxicol 74, 493-500.
- 535 Sima, G., Fatemeh, Z., Vahid, N., 2012. Determination of peroxidase activity, total  
536 phenolic and flavonoid compounds due to lead toxicity in *Medicago sativa* L. Advances in  
537 Environmental Biology 6, 2357-2364.
- 538 Sivanadanam, V., Neelamegam, R., Chellappan, K., 2012. Salinity effect: IX on catalase,  
539 polyphenol oxidase and peroxidase enzyme activity in *Rhizophora apiculata* blume and  
540 *Acanthus ilicifolius* linn seedlings. Plant Archives 12, 195-199.
- 541 SMN, 2013, Meteorological Automatic Stations (EMAs) Database of Mexico. Servicio  
542 Meteorológico Nacional-Comisión Nacional del Agua.
- 543 Solartronic, S.A.d.C.V., 2003, Global, direct and diffuse irradiance on horizontal and  
544 inclined surfaces and DNI for the Mexican Republic [Irradiancia global, directa y difusa en  
545 superficies horizontales e inclinadas, así como radiación directa normal para la república  
546 Mexicana]. In: SOLATRONIC, S.A.D.C.V. (Ed.), Cuernavaca, Morelos, México.
- 547 Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M., 2009. Effect of extraction solvent/technique on the  
548 antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules 14, 2167-2180.
- 549 Symonowicz, M., Kolanek, M., 2012. Flavonoids and their properties to form chelate  
550 complexes. Biotechnology and Food Sciences 76, 35-41.

- 551 Taiz, L., Zeiger, E., 2002, Secondary Metabolites and Plant Defense. Plant Physiology.  
552 Sinauer Associates, Incorporated, Publishers, pp. 283-308.
- 553 Yañez-Arancibia, A., Day, J.W., 2006, Hidrology, Water Budget, and Residence Time in  
554 the Terminos Lagoon Estuarine System, Southern Gulf of Mexico. In: Vijay P. Singh,  
555 Y.J.X. (Ed.), Coastal Hydrology and Processes: Proceedings of the AIH 25th Anniversary  
556 Meeting and International Conference "Challenges in Coastal Hydrology and Water  
557 Quality". Water Resources Publications, L L C.
- 558 Yi-Ming, L., Xiao-Wei, L., Hui, Z., Hang-Qing, F., Guang-Hui, L., 2009. Nutrient  
559 conservation strategies of a mangrove species *Rhizophora stylosa* under nutrient limitation.  
560 Plant Soil 326, 469-479.
- 561 Zaitsev, O., Trasviña-Castro, A., Linero-Cueto, J., Gaxiola-Castro, G., Cepeda-Morales, J.,  
562 2014. Oceanographic conditions over the continental shelf off Magdalena Bay (Mexico) in  
563 2011–2012 Condiciones oceanográficas en la plataforma continental frente a bahía  
564 Magdalena (México) en 2011–2012. Ciencias Marinas 40, 89-112.
- 565 Zapata-Perez, O., Ceja-Moreno, V., Olmos, M.R., Perez, M.T., Rio-Garcia, M.D., Yarto,  
566 M., Mendoza-Cantu, A., Ize-Lema, A.I., Gavilan-Garcia, A., Felipe, S.T., Gold-Bouchot,  
567 G., 2007. Ecotoxicological effects of POPs on ariidae *Ariopsis felis* (Linnaeus, 1766) from  
568 three coastal ecosystems in the Southern Gulf of Mexico and Yucatan Peninsula. J Environ  
569 Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 42, 1513-1520.
- 570
- 571
- 572

573 **Figure captions**

574 **Fig. 1.** Geographical location of the study area and location of sampling sites in Magdalena  
575 Bay (A), Navachiste (B) and Terminos Lagoon (C).

576 **Fig. 2.** Similarity tree diagram of metal concentration in sediments. P=sampling point;  
577 M=Magdalena Bay; N=Navachsite Bay and T=Terminos lagoon ( $p \leq 0.05$ ).

578 **Fig. 3.** Correlation ( $r^2$ ) among antioxidant activity (ABTS•+) with total phenolic content,  
579 total flavonoid content, and copper chelating activity of leaf, stem bark, and root extracts of  
580 *R. mangle* in three coastal lagoons.

581

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

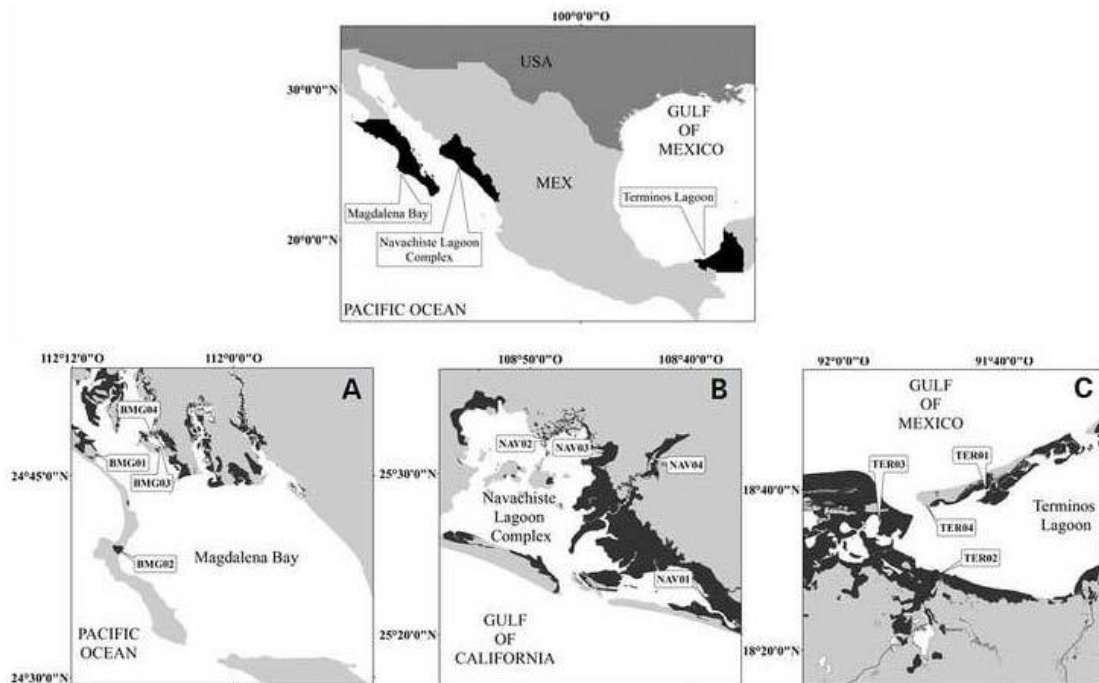


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

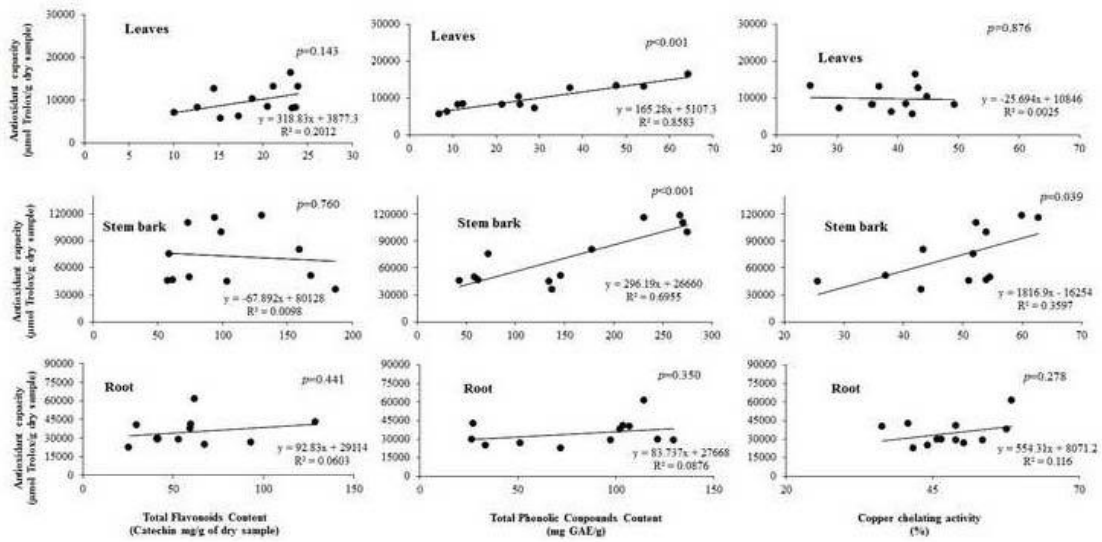
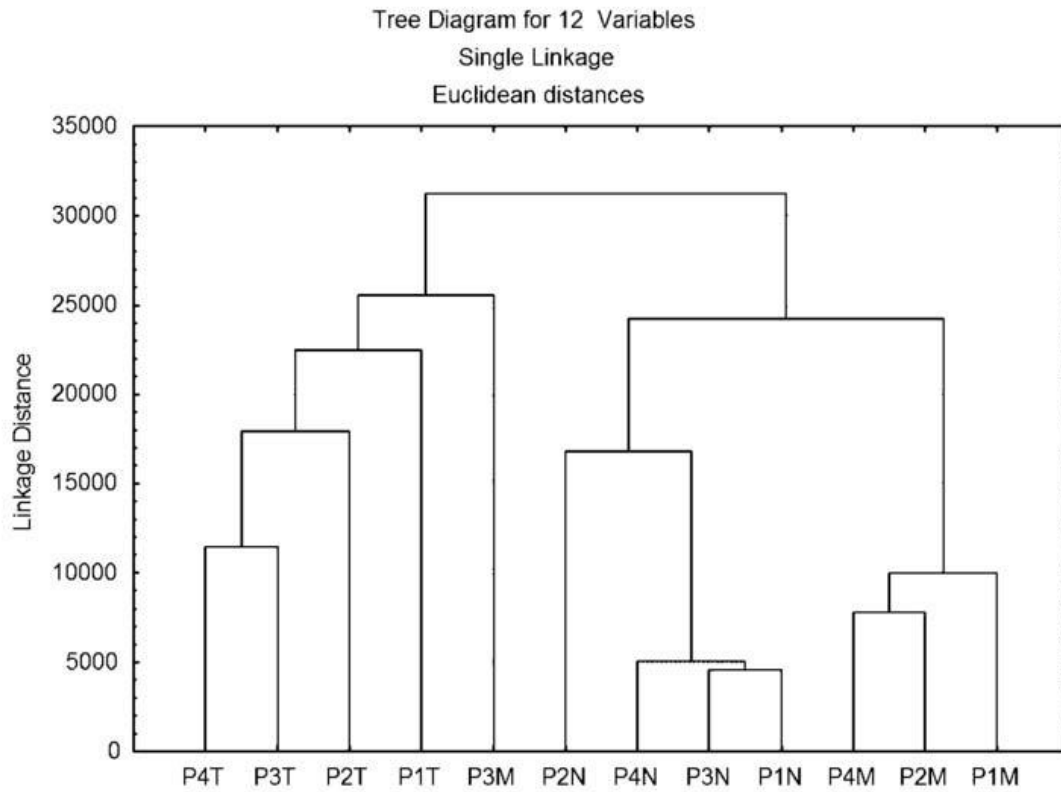




Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)



## Tables

**Table 1.** Geographical location within MBay, NBay and TLAG of sampling points of leaves, roots and stem bark tissues of *R. mangle*.

Sampling point	MB <sup>1</sup>	NB <sup>1</sup>	TL <sup>1</sup>
<b>P1</b>	24°46'17.81"N	25°22'23.46"N	18°38'25.08"N
	112°10'27.70"O	108°38'33.07"O	91°46'13.96"O
<b>P2</b>	24°39'35.01" N	25°32'28.03"N	18°29'33.42"N
	112°08'56.27"O	108°48'21.39"O	91°47'26.32"O
<b>P3</b>	24°46'50.60" N	25°31'41.29"N	18°35'51.89"N
	112°05'35.83"O	108°46'14.83"O	91°57'44.96"O
<b>P4</b>	24°47'50.75" N	25°31'30.57"N	18°38'08.74"N
	112°06'23.93"O	108°42'40.12"O	91°45'15.27"O

<sup>1</sup> MBay= Magdalena Bay, NBay=Navachiste Bay, TLAG= Terminos Lagoon

**Table 2.** Total phenolic content (mg GAE•g<sup>-1</sup> db) of leaf, root, and stem bark extracts of *R. mangle* from three coastal lagoons. Different lowercase letters indicate significant differences among tissue extracts. Different uppercase letters indicate significant differences among study sites (p<0.05).

	MBay <sup>1</sup>	NBay <sup>1</sup>	TLag <sup>1</sup>
LE <sup>2</sup>	51 ± 11 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	19 ± 3 <sub>B</sub> <sup>c</sup>	25 ± 3 <sub>B</sub> <sup>c</sup>
SBE <sup>2</sup>	153 ± 20 <sub>B</sub> <sup>a</sup>	155 ± 33 <sub>B</sub> <sup>a</sup>	261 ± 19 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
RE <sup>2</sup>	105 ± 24 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	83 ± 34 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	107 ± 5 <sub>A</sub> <sup>b</sup>

<sup>1</sup>MBay= Magdalena Bay, NBay=Navachiste Bay, TLag= Terminos Lagoon

<sup>2</sup>LE=Leaf extracts, SBE=Stem bark extracts, RE=Root extracts

**Table 3.** Total flavonoid content (mean  $\pm$  SD) (Catechin  $g \cdot 100g^{-1}$  db) of leaf, root, and stem bark extracts of *R. mangle* from three coastal lagoons. Different lowercase letters indicate significant differences among tissues extracts. Different uppercase letters indicate significant differences among study sites ( $p \leq 0.05$ ).

	<b>MBay<sup>1</sup></b>	<b>NBay<sup>1</sup></b>	<b>TLag<sup>1</sup></b>
LE <sup>2</sup>	2 $\pm$ 0 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	1 $\pm$ 0 <sub>C</sub> <sup>c</sup>	1 $\pm$ 0 <sub>B</sub> <sup>c</sup>
SBE <sup>2</sup>	8 $\pm$ 4 <sub>BA</sub> <sup>a</sup>	6 $\pm$ 1 <sub>B</sub> <sup>a</sup>	9 $\pm$ 2 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
RE <sup>2</sup>	5 $\pm$ 2 <sub>AB</sub> <sup>b</sup>	3 $\pm$ 1 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	4 $\pm$ 1 <sub>B</sub> <sup>b</sup>

<sup>1</sup> MBay= Magdalena Bay, NB MBay =Navachiste Bay, TLag= Terminos Lagoon

<sup>2</sup> LE=Leaf extracts, SBE=Stem bark extracts, RE=Root extracts

**Table 4.** Average  $\pm$  standard deviation (n=3) of antioxidant activity of ABTS<sup>+</sup> ( $\mu\text{mol Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$  db) of leaf, root, and stem bark extracts of *R. mangle* from three coastal lagoons. Different lowercase letters indicate significant differences among tissues extracts. Different uppercase letters indicate significant differences among study sites ( $p\leq 0.05$ ).

	MBay <sup>1</sup>	NBay <sup>1</sup>	TLag <sup>1</sup>
LE <sup>2</sup>	$1 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ <sub>A</sub>	$7 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ <sub>B</sub>	$8 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ <sub>B</sub>
SBE <sup>2</sup>	$5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$ <sub>C</sub>	$5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ <sub>BC</sub>	$1 \times 10^5 \pm 8 \times 10^3$ <sub>A</sub>
RE <sup>2</sup>	$3 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ <sub>C</sub>	$3 \times 10^4 \pm 8 \times 10^3$ <sub>BC</sub>	$5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ <sub>A</sub>

<sup>1</sup> MBay= Magdalena Bay, NBay=Navachiste Bay, TLag= Terminos Lagoon

<sup>2</sup> LE=Leaf extracts, SBE=Stem bark extracts, RE=Root extracts

**Table 5.** Copper chelating activity (%) of leaf, root, and stem bark extracts of *R. mangle* from three coastal lagoons. Different lowercase letters indicate significant differences among tissues extracts. Different uppercase letters indicate significant differences among study sites ( $p \leq 0.05$ ).

<b>Tissue Extract</b>	<b>MBay<sup>1</sup></b>	<b>NBay<sup>1</sup></b>	<b>TLag<sup>1</sup></b>
LE <sup>2</sup>	38 ± 6 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	39 ± 2 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	39 ± 7 <sub>A</sub> <sup>c</sup>
SBE <sup>2</sup>	53 ± 4 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	53 ± 1 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	56 ± 4 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
RE <sup>2</sup>	48 ± 5 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	45 ± 4 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	50 ± 9 <sub>A</sub> <sup>b</sup>

<sup>1</sup> MBay= Magdalena Bay, NBay=Navachiste Bay, TLag= Terminos Lagoon

<sup>2</sup> LE=Leaf extracts, SBE=Stem bark extracts, RE=Root extracts

**Table 6.** Concentrations of heavy metals in sediments ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  db) except Fe (%) (min-max/average  $\pm$  SD) from the three coastal lagoon ecosystems and average crust values (Taylor, 1964). ND = Not Detected. The grey shadows represent the concentrations above average crust values.

Detected heavy metal	MBay <sup>1</sup>	NBay <sup>1</sup>	TLag <sup>1</sup>	Average crust
Fe	<u>0.4-1.8</u>	<u>3-3.2</u>	<u>0.4-2.6</u>	5.6
	0.8 $\pm$ 0.7	3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 1	
Cu	<u>1.8-17.8</u>	<u>14.3-32.1</u>	<u>3.6-57.0</u>	55
	6.7 $\pm$ 7.5	22.7 $\pm$ 7.4	30 $\pm$ 23.8	
Pb	<u>ND-33.2</u>	<u>6.3-15.3</u>	<u>15.3-60.2</u>	12.5
	12.3 $\pm$ 18.1	8.6 $\pm$ 4.5	40 $\pm$ 21.5	
Ni	<u>ND -71.8</u>	<u>10.2-18</u>	<u>18-123.1</u>	75
	71.8 $\pm$ 0	13.5 $\pm$ 3.2	60.7 $\pm$ 54.4	
Zn	<u>3.3-35.6</u>	<u>48.3-75</u>	<u>11-173.4</u>	70
	12.5 $\pm$ 15.5	61.0 $\pm$ 12.0	70.0 $\pm$ 71.2	
Cd	<u>0.1-2.4</u>	<u>0.1-0.9</u>	<u>0.9-3.2</u>	0.2
	0.9 $\pm$ 1.1	0.7 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 1.1	
Mn	<u>34.3-184.3</u>	<u>72.6-321.3</u>	<u>41.3-92.3</u>	950
	76.7 $\pm$ 71.7	230 $\pm$ 109.4	60 $\pm$ 23.1	

<sup>1</sup> MBay= Magdalena Bay, NBay=Navachiste Bay, TLag= Terminos Lagoon

**Table 7.** Correlations between metal-metal in three coastal lagoons: MBay, NBay and Tlag.

Metal-Metal	Correlations ( $r^2$ )		
	MBay <sup>1</sup>	NBay <sup>1</sup>	Tlag <sup>1</sup>
Fe-Cu	0.997		
Cu-Pb	0.998		0.934
Cu-Ni	0.994	0.982	
Fe-Pb	1	0.993	
Fe-Ni	1		1
Pb-Ni	0.999		
Cu-Zn	0.997	0.854	
Cu-Cd	0.956		0.819
Cu-Mn	0.986		
Fe-Zn	0.997		
Fe-Cd	0.947		
Fe-Mn	0.996		
Pb-Zn	0.998		0.735
Pb-Cd	0.950		0.950
Pb-Mn	0.994		
Zn-Cd	0.969		0.816
Zn-Mn	0.987		0.950
Ni-Zn		0.886	
Cd-Mn	0.919		0.602

<sup>1</sup> MBay= Magdalena Bay, NBay=Navachiste Bay, Tlag= Terminos Lagoon



## V.2 In vitro antifungal effect of mangrove (*Rhizophora mangle*) extracts on *Fusarium verticillioides* isolates

### Antifungal effect of mangrove extracts

#### ENVIADO A LA REVISTA: Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

Elsevier Editorial System(tm) for Asian  
Pacific Journal of Tropical Medicine  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: In vitro antifungal effect of mangrove (*Rhizophora mangle*)  
extracts on *Fusarium verticillioides* isolates

Article Type: Original Article/ Research

Keywords: Antifungal effect, extracts, phenolic compounds, *Fusarium*  
*verticillioides*, fungal growth inhibition, *Rhizophora mangle*.

Corresponding Author: Prof. Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Instituto Politécnico Nacional

First Author: Iván G Martínez-Álvarez, M. Sc.

Order of Authors: Iván G Martínez-Álvarez, M. Sc.; Karla Y Leyva-  
Madrigal, Ph.D.; Héctor A González-Ocampo, Ph.D.; María E Jaramillo-  
Flores, Ph.D.; Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza, Ph.D.

Abstract: Objective: The present study was conducted to identify the  
antifungal activity of phenolic compounds extracted from *Rhizophora*  
*mangle* tissues against the *Fusarium verticillioides* isolates DA42, F64  
and PO3.

Methods: The total phenolic content was calculated by the Folin-Ciocalteu  
method. The in vitro inhibition test was performed according to the  
poisoned food technique.

Results: Stem extracts had the highest TPC (9.5 mg GAE/g DM) and  
displayed major inhibition percentages against all *F. verticillioides*  
isolates. Furthermore, the concentration of this extract required to  
inhibit the three fungal isolates by 50% is two to three times greater on  
average than that required for leaf and root extracts.

Conclusions: This study demonstrates the inhibitory activity of  
methanolic extracts from *R. mangle* roots, stems and leaves against  
different isolates of the phytopathogen *F. verticillioides*, the most  
common causative agent of stalk, ear and root rot in maize.

Suggested Reviewers: José S Dambolena Ph.D.

Professor, Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales Instituto  
Multidisciplinario d, Universidad Nacional de Córdoba (IMBiV-CONICET-  
UNC). Argentine.

dambolena@fcq.unc.edu.ar

Dr. Dambolena has extensive experience in mycology and botany, his  
publications include evaluating the activity of natural compounds on  
*Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production

Purarbasu Chaudhuri Ph.D.

Professor, Department of Environmental Science, University of Calcuta  
punarbasu\_c@yahoo.com

Dr. Chaudhuri main research interests are mangrove ecology, bio-  
prospecting and geoinformatics. The area of his research has been on  
mangrove forests of India.

Jing Xu Ph.D

Professor, Laboratory of protection and development utilization of tropical crop germoplasm, Hainan University

happyjing3@163.com

Her research interests are focused on natural products originating from endophytic microbes and medicinal plants.

Opposed Reviewers:

Cover Letter



Instituto Politécnico Nacional  
Centro Interdisciplinario de Investigación  
para el Desarrollo Integral Regional  
CIIDIR - Unidad Sinaloa



Guasave, Sinaloa, Mexico. November 24, 2015

PhD Jun-Bao Liu  
Editor-in-Chief  
Asian Pacific Journal of Tropical Medicine

Dear Jun-Bao Liu,

Please find enclosed for submission to Asian Pacific Journal of Tropical Medicine our manuscript entitled “IN VITRO ANTIFUNGAL EFFECT OF MANGROVE (*Rhizophora mangle*) EXTRACTS ON *Fusarium verticillioides* ISOLATES”.

This work was conducted to identify antifungal activity of phenolic compounds extracted from *Rhizophora mangle* tissues against *Fusarium verticillioides* isolates (DA42, F64 and PO3). This fungus causes root and stalk rot of maize severely impacting crop production in tropical and subtropical regions. Our investigation demonstrate the inhibitory activity of methanolic extracts from root, stem and leaf of *R. mangle* against different isolates of *F. verticillioides*, the most common fungus in maize that causes stalk, ear and root rot.

We consider Asian Pacific Journal of Tropical Medicine as a suitable journal for publishing our results that we believe are of considerable interest to its audience.

Sincerely yours,

**Ignacio E. Maldonado-Mendoza, Ph.D**  
**Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-Sinaloa**  
**Depto. de Biotecnología Agrícola**

Bldv. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joachin, Apdo. Postal 280, Guasave, Sinaloa, México  
Tel./Fax: (687) 8729626 / 8729625  
ciidirs@ipn.mx / www.ipn.mx

\*Manuscript (without author details)  
[Click here to view linked References](#)

1 ***In vitro* antifungal effect of mangrove (*Rhizophora mangle*) extracts on *Fusarium***  
2 ***verticillioides* isolates**

3

4 Short Title: **Antifungal effect of mangrove extracts**

5

6 **Abstract**

7 **Objective:** The present study was conducted to identify the antifungal activity of phenolic  
8 compounds extracted from *Rhizophora mangle* tissues against the *Fusarium verticillioides*  
9 isolates DA42, F64 and PO3.

10 **Methods:** The total phenolic content was calculated by the Folin-Ciocalteu method. The *in vitro*  
11 inhibition test was performed according to the poisoned food technique.

12 **Results:** Stem extracts had the highest TPC (9.5 mg GAE/g DM) and displayed major inhibition  
13 percentages against all *F. verticillioides* isolates. Furthermore, the concentration of this extract  
14 required to inhibit the three fungal isolates by 50% is two to three times greater on average than  
15 that required for leaf and root extracts.

16 **Conclusions:** This study demonstrates the inhibitory activity of methanolic extracts from *R.*  
17 *mangle* roots, stems and leaves against different isolates of the phytopathogen *F. verticillioides*,  
18 the most common causative agent of stalk, ear and root rot in maize.

19

20 **Keywords:** Antifungal effect, extracts, phenolic compounds, *Fusarium verticillioides*, fungal  
21 growth inhibition, *Rhizophora mangle*.

22 **1. Introduction**

23 Restrictions on the use of synthetic fungicides have been implemented in the last decade, due to  
24 their negative impact on the environment and the rapid emergence of resistant fungal isolates.

25 This has driven plant researchers to find alternative fungicidal compounds [1].

26 Mangroves are one source of these compounds. These woody plants are found in tropical and  
27 subtropical intertidal regions, and are able to grow under extreme local environmental conditions  
28 including high salinity, extreme tides, strong winds and high temperatures, as well as muddy,  
29 anaerobic soils [2,3]. These stress conditions promote the production of antioxidants such as  
30 phenols, which are used to counteract the effect of reactive oxygen species (ROS) [4,5].

31 Importantly, several studies have already reported the antifungal activity of mangrove phenolic  
32 extracts [6-10]. In particular, mangrove species of the Rhizophoraceae family have a high  
33 concentration and diversity of phenols [4,5,11,12], which are reported to be effective against  
34 different fungal species [7,13-15]

35 The study and use of phenolic compounds as a strategy for controlling phytopathogenic fungi has  
36 increased in recent years [16-18]. Several phytopathogenic species are found within the fungal  
37 genus *Fusarium* [19]. This includes *Fusarium verticillioides*, the widely distributed causative  
38 agent of stalk, ear and root rot in maize [20,21]. Aside from decreasing grain yield and quality  
39 [22-24], this fungus produces a variety of mycotoxins that contaminate maize grain, thereby  
40 threatening animal and human health [19].

41 Chemical control of this fungus has been inadequate, making it necessary to find effective  
42 alternatives to monitor the effects of this pathogen. As stated above, previous research has  
43 examined the antifungal properties of mangrove phenolic compounds, although no  
44 comprehensive studies have been performed on the antifungal activity of *R. mangle* phenolic

45 extracts against phytopathogenic fungi. The aim of this work was therefore to investigate the  
46 antifungal activity of methanolic extracts from *R. mangle* organs against *Fusarium verticillioides*.

47

## 48 **2. Materials and Methods**

### 49 **2.1 Plant materials**

50 Mangrove leaves, stems and roots were collected from Terminos Lagoon (Campeche, Mexico;  
51 18°29'33.42" N, 91°47'26.32" W) in August, 2011. The samples were collected and kept in  
52 sealed amber bottles to protect them from sunlight. Subsequently, the samples were dehydrated in  
53 an oven (Riossa E-47) at 40°C until they reached a constant weight. The dehydrated samples  
54 were then ground into a fine powder.

55

### 56 **2.2 Preparation of extracts**

57 Aliquots (6.25 g) of dehydrated and ground mangrove leaves, stems and roots were extracted  
58 with 250 mL of ethanol-water (80:20 v/v). Each aliquot was protected from light with a cover and  
59 shaken in a multiple position stirrer (Corning, Cat. 440826; Corning, NY, USA) at 800 rpm for  
60 30 min. The resulting extracts were filtered through Whatman No. 1 filter paper, and the ethanol  
61 was completely evaporated at 40°C using a rotary evaporator (Buchi R-210/R-215; Flawil,  
62 Switzerland). The volume of each extract was adjusted to 50 mL of ethanol-water (80:20 v/v)  
63 solution and stored in amber vials at 4°C until use.

64

### 65 **2.3 Total Phenolic Content**

66 The total phenolic content (TPC) from *R. mangle* tissues was determined by the Folin-Ciocalteu  
67 method [25]. 100 µL of each extract was mixed with 750 µL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10  
68 dilution in distilled water); 750 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (60 g/L) was then added 5 minutes later.

3

69 The mix was incubated for 90 minutes and the absorbance was subsequently read in a  
70 spectrophotometer (Multiskan GO Microplate reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,  
71 USA) at 750 nm [26]. TPC from *R. mangle* extracts was recorded as gallic acid equivalents  
72 (GAE) by gram of dry biomass.

73

#### 74 **2.4 *Fusarium verticillioides* growth inhibition test**

75 Three fungal isolates of *F. verticillioides* (PO3, DA42 and F64) were used as test organisms.  
76 These isolates are part of a *Fusarium* collection isolated from maize seeds and roots, belonging to  
77 the Laboratory of Molecular Ecology of the Rhizosphere at CIIDIR-Sinaloa (Mexico). Fungal  
78 isolates were grown on potato dextrose agar (PDA, BDBioxon, Edo. de Mexico) for five days at  
79 25°C.

80 Mycelial growth inhibition of *F. verticillioides* was tested *in vitro* according to the poisoned food  
81 technique [26]. A dose-response test was performed for each phenolic extract by adding between  
82 0.5 – 3 mL of extract to a 9 mm Petri dish containing 20 mL of PDA. Final concentrations of  
83 phenolic extracts per mL of PDA for each test are reported in Table 1. Petri dishes were  
84 inoculated in the centre with a mycelial plug (5 mm in diameter) from a 5-day old *F.*  
85 *verticillioides* culture. Growth inhibition percentage of *F. verticillioides* was calculated according  
86 to the following formula: inhibition % =  $\frac{(C-T)}{(C)} \times 100$ , where C is the mycelium diameter of the

87 positive control and T is the mycelium diameter of the treatments [26]. Petri dishes containing  
88 PDA with the equivalent ethanol-water (80:20 w/v) volume were inoculated with a *F.*  
89 *verticillioides* mycelial plug and used as a negative control, while PDA plates containing  
90 benomyl (Benoma-T, VELSIMEX Company, Mexico, D.F.) were used as positive controls. To  
91 determine the lethal concentration of *F. verticillioides*, a dose-response curve for benomyl was

4

92 performed using the concentrations 0.5, 1.25, 2.5 and 5 µg/mL. PDA plates without benomyl  
93 were used as a control. Incubation was carried out in the dark at 35°C for seven days. Each  
94 treatment was performed in triplicate.

#### 95 **Statistical analysis**

96 Data from the growth inhibition test of each phenolic extract were subjected to analysis of  
97 variance (ANOVA), and Tukey's test was used for post-hoc comparison of means ( $P \leq 0.05$ ). The  
98 inhibition percentages were arcsine-transformed before ANOVA. A two-way ANOVA model  
99 was used to determine the phenolic concentration of each extract and the *Fusarium* isolate effects  
100 on growth inhibition. Individual differences among phenolic concentrations and *Fusarium*  
101 isolates were determined by Tukey's test. The mean inhibition percentages of each treatment  
102 were entered into a weighted linear regression model to account for the differences in phenolic  
103 concentrations between extracts. This model was used to calculate the phenolic concentration  
104 needed to inhibit fungal growth by 50%. All statistical tests were performed using the SAS 9.0  
105 software (SAS Institute, Inc.; Cary, NC, USA).

106

### 107 **3. Results**

108

#### 109 **3.1 Total Phenolic Content**

110 The TPC of *R. mangle* leaf, stem and root extracts ranged from 0.777 to 9.5 mg GAE/g DM, with  
111 significant differences between them ( $P < 0.0001$ ). Stem extracts displayed the highest level of  
112 TPC (9.5 mg GAE/g DM), followed by root (2.56 mg GAE/g DM) and leaf (0.777 mg GAE/g  
113 DM) extracts (Fig. 1).

114



115 **3.2 *Fusarium verticillioides* growth inhibition test**

116 The synthetic fungicide benomyl was used as a positive control for the mycelial growth inhibition  
117 test. A dose-response curve was performed to determine the lethal dose of this chemical on the  
118 different *F. verticillioides* isolates (Figure 2). We observed a differential response among the  
119 various isolates at lower benomyl concentrations (0.5 and 1.25 mg/mL), whereas all isolates  
120 showed 100% inhibition in response to 2.5 µg/mL benomyl. The latter concentration was  
121 therefore selected for use in the growth inhibition test.

122 All mangrove extracts were capable of inhibiting mycelial growth of the different *F.*  
123 *verticillioides* isolates (Table 1). In every case, the inhibition percentage increased along with  
124 phenolic concentration.

125 Results from the two-way ANOVA are reported in Table 2. Both phenolic concentration and the  
126 *Fusarium* isolate (as well as the interaction between these two factors) had significant effects on  
127 the growth inhibition percentage. The three mangrove extracts were more efficient at inhibiting  
128 DA42 than P03 or F64 (Table 3), which could be due to genetic differences between the fungal  
129 isolates.

130 Comparing mangrove extracts in the inhibition test was difficult due to differences in their  
131 phenolic concentrations. Inhibition percentages from each mangrove extract/fungal isolate  
132 combination were therefore adjusted to a linear regression model, and the phenolic concentration  
133 required to inhibit fungal growth by 50% was calculated using the estimated regression formula  
134 for each combination (Supplementary Figure 1). There was a significant relationship between  
135 inhibition percentage and phenolic concentration for all combinations, revealing high correlation  
136 coefficients ( $R^2$ ) that ranged from 0.9125 (isolate F64, root extract) to 0.9822 (isolate DA42, leaf  
137 extract; Supplementary Figure 1).

138 As stated above, the stem extract sample displayed the highest TPC value (9.5 mg GAE/g DM)  
139 and resulted in major inhibition percentages in all *F. verticillioides* isolates (Table 1). However,  
140 the required concentration of this extract to inhibit the three fungal isolates by 50% is two to three  
141 times greater on average than that required for leaf and root extracts (Figure 3).

142

#### 143 **4. Discussion**

144 In the present study, ethanolic extracts from different red mangrove (*R. mangle*) organs were  
145 obtained, and their antifungal activity was evaluated against three *F. verticillioides* isolates from  
146 maize roots.

147 TPC varied greatly among the different mangrove organs. The highest phenol content was found  
148 in the stem extract (9.5 mg GAE/g DM), followed by root (2.56 mg GAE/g DM) and leaf (0.777  
149 mg GAE/g DM) extracts. The same pattern was previously observed in other mangrove species  
150 belonging to the Rhizophoraceae family, including *R. mucronata*, *Bruguiera gymnorrhiza*,  
151 *Ceriops decandra* [4,11] and *R. stylosa* [5].

152 Although the ethanolic extracts from *R. mangle* tested in this study were able to inhibit *F.*  
153 *verticillioides* growth, the response was variable and dependent on the type of extract (root, stem  
154 or leaf), its concentration, and the particular isolate (F64, DA42 or P03). Previous reports have  
155 demonstrated that phenolic extracts from several mangrove species exhibit antifungal activity  
156 against different fungal species [6,8]. It is believed that phenolic compounds can diffuse through  
157 the fungal membrane and penetrate into the cell, where they interfere with essential metabolic  
158 pathways (such as the synthesis of ergosterol, glucan and chitin), leading to the disruption of  
159 membrane integrity, fluidity and loss of intracellular content [27].

160 The phenolic profile depends on a number of factors including the plant genotype, and the organ,  
161 tissue or phenological stage [13,28,29]. A variety of phenolic compounds have been reported in

7

162 red mangrove stems, such as ferulic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid,  
163 caffeic acid, benzoic acid, gallic acid, ellagic acid, epicatechin and catechin [30,31]. On the other  
164 hand, it has been reported that red mangrove leaves contain quercetin, epi-catechin, catechin, 4-  
165 hydroxybenzoic acid, kaempferol 3-O- $\beta$ -glucopyranoside, quercetin 3-O- $\beta$ -glucopyranoside,  
166 quercetin 3-O-6"-trans-coumaroyl- $\beta$ -glucoside, kaempferol 3-O- $\beta$ -rutinoside and quercetin 3-O-  
167  $\beta$ -rutinoside [32]. Finally, ethanolic extracts of *R. apiculata* roots (a species closely related to *R.*  
168 *mangle*) show the presence of quercetin, gallic acid and rutin [33]. It is important to note that the  
169 phenolic profile of any plant also varies according to the method and solvent used in the  
170 extraction. This means that red mangrove may contain more phenolic compounds than stated  
171 here, and bioactivity may vary from one extract to another [12].

172 Several of the above-mentioned compounds have been tested individually against *Fusarium*  
173 fungi, with good results. In particular, Shukla and Dwivedi [34] reported mycelial growth  
174 inhibition of *F. oxysporum f.sp. ciceri* and *F. udum* (up to 98%) when grown in culture medium  
175 supplemented with benzoic acid. Furthermore, Ferrochio *et al.* [35] determined that the antifungal  
176 effect of ferulic acid on *F. verticillioides* and *F. proliferatum* depends on its concentration and  
177 water activity ( $a_w$ ). Specifically, fungal growth was decreased by 50% at high ferulic acid  
178 concentrations (20-25 mM) and high  $a_w$  (0.99 and 0.98). Fumonisin accumulation on maize-based  
179 medium was also reduced by high doses of ferulic acid, even at high  $a_w$  [35].

180 In this study, we detected differences in the concentration of mangrove extracts required to  
181 inhibit fungal isolates. Specifically, a greater concentration of stem extract is necessary to inhibit  
182 *F. verticillioides* isolates by 50%, as compared to leaf and root extracts. Although the phenolic  
183 composition of the extracts used in this study is unknown, the specific concentration of each  
184 phenolic compound depends on the plant organ, which in turn has an effect on the antifungal  
185 capacity of each extract. Hussin *et al.* [6] reported different phenolic profiles and antifungal

186 activities from leaf, stick and bark methanolic extracts in *Barringtonia racemosa*. Leaf extracts  
187 displayed the greatest diversity and concentration of phenolic compounds (*i.e.* gallic acid,  
188 naringin, rutin, kaempferol, ferulic acid and luteolin), as well as the highest percentage of  
189 *Fusarium* inhibition (53.45%). Moreover, the differences in phenolic compound and gallic acid  
190 concentration were capable of influencing the inhibition percentages of stick (31.61%) and bark  
191 (41.38%) extracts in *B. racemosa*.

192 Even when the three *F. verticillioides* isolates were inhibited, isolate DA42 exhibited a greater  
193 inhibition over each extract. This observation can be explained by genotypic differences among  
194 the isolates. Recent studies from our laboratory on the genetic and pathogenic variability of these  
195 and other isolates have determined that each isolate represents a different genotype that can infect  
196 maize, although differences in aggressiveness were observed (unpublished data). Furthermore,  
197 different inhibition percentages were recorded between fungal isolates challenged with *Bacillus*  
198 *cereus sensu lato* strain B25 (unpublished data).

199 In this study, fungal growth inhibition by phenolic extracts required higher concentrations as  
200 compared to benomyl. Indeed, the benomyl dose-response curve indicates that all isolates were  
201 100% inhibited at 2.5 µg/mL. Similar results were reported by Gale *et al.* [36] in their inhibition  
202 assay against *F. graminearum*. Other studies have reported the inhibition of different *Fusarium*  
203 species with low concentrations of benomyl [37,38]. We suggest that the control exerted by  
204 benomyl may be partially due to its purity, whereas the phenolic extracts are a mixture of several  
205 compounds that interact with each other, and which may interfere with the biological activity  
206 they exert. This underscores the necessity to analyse the profile of each phenolic extract, to  
207 determine the individual phenolic compounds present in them, and to evaluate the antifungal

208 activity of the identified compounds (both individually and combined), which will improve our  
209 understanding of how these compounds inhibit *F. verticillioides* growth.

210

#### 211 **Conclusions**

212 This study demonstrates the inhibitory activity of ethanolic extracts from *R. mangle* roots, stems  
213 and leaves against different isolates of *F. verticillioides*, the causative agent of stalk, ear and root  
214 rot in maize. Furthermore, our data indicate that leaf and root extracts were more effective than  
215 stem extracts at inhibiting this phytopathogen.

216 Additional analyses are needed to determine the phenolic composition of the evaluated extracts,  
217 and to identify the phenolic compounds responsible for their antifungal activity. Future research  
218 should investigate the effect of these extracts on other phytopathogenic fungi that affect maize, as  
219 well as the production of mycotoxins produced by the *F. verticillioides* and other fungal species.

220

#### 221 **Acknowledgements**

222 The authors are grateful to the Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del Instituto  
223 Politécnico Nacional (SIP-20120079, SIP-20130398) and Fomix CONACYT-Campeche  
224 (FOMIX-CAMP-2010-144280) for financial support. IGMA acknowledges the Consejo Nacional  
225 de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) and SIP-IPN for Ph.D. fellowships. We thank Dr.  
226 Brandon Loveall of Improve for English proofreading of the manuscript.

227

#### 228 **4. References**

229 [1] Zabka M, Pavela R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against  
230 significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 2013; **93**(6): 1051-1056.

- 231 [2] Kathiresan K, Bingham BL. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv Mar Biol*  
232 2001; **40**: 81-251.
- 233 [3] Bandaranayake WM. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of  
234 mangrove plants. *Wetl Ecol Manag* 2002; **10**(6): 421-452.
- 235 [4] Banerjee D, Chakrabarti S, Hazra AK, Banerjee S, Ray J, Mukherjee B. Antioxidant activity  
236 and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. *Afr J Biotechnol* 2008; **7**(6): 805-810.
- 237 [5] Suh SS, Hwang J, Park M, Park HS, Lee TK. Phenol content, antioxidant and tyrosinase  
238 inhibitory activity of mangrove plants in Micronesia. *Asian Pac J Trop Med* 2014; **7**(7): 531-535.
- 239 [6] Hussin NM, Muse R, Ahmad S, Ramli J, Mahmood M, Sulaiman MR, Shukor MYA, Rahman  
240 MFA, Aziz KNK. Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia*  
241 *racemosa* L. (Lecythidaceae). *Afr J Biotechnol* 2009; **8**(12): 2835-2842.
- 242 [7] Kumar SR, Ramanathan G, Subhakaran M, Inbaneson SJ. Antimicrobial Compounds from  
243 Marine Halophytes for Silkworm Disease Treatment. *Int J Med Med Sci* 2009; **1**(5): 184-191.
- 244 [8] Afzal M, Mehdi FS, Abbasi FM, Ahmad H, Masood R, Inamullah, Alam J, Jan G, Islam M,  
245 Amin AU, Majid A, Fiaz M, Shah AH. Efficacy of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Leaves  
246 extracts against some atmospheric fungi. *Afr J Biotechnol* 2011; **10**(52): 10790-10794.
- 247 [9] Alizadeh-Behbahani B, Tabatabaei-Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M. Antifungal effect of  
248 edible film (CMC) containing aqueous and ethanolic mangrove plant extract on Citrus pathogens  
249 in vitro. *J Agr Sci* 2013; **2**(1): 47-52.
- 250 [10] Fardin KM, Young MCM. Antifungal potential of *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech.  
251 (Acanthaceae) against *Cladosporium* and *Colletotrichum* species. *Appl Microbiol* 2015; **61**(1):  
252 50-57.

- 253 [11] Haq M, Sani W, Hossain A.B.M.S, Taha R.M, Monneruzzaman KM. Total phenolic  
254 contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Bruguiera gymnorrhiza*. *J Med Plants Res*  
255 2011; **5**(17): 4112-4118.
- 256 [12] Kumar VA, Ammani K, Siddhardha B, Sreedhar U, Kumar GA. Differential biological  
257 activities of the solvent extracts of *Ceriops decandra* (Griff.) and their phytochemical  
258 investigations. *J Pharm Res* 2013; **7**(7): 654-660.
- 259 [13] Kandil FE, Grace MH, Seigler DS, Cheeseman JM. Polyphenolics in *Rhizophora mangle* L.  
260 leaves and their changes during leaf development and senescence. *Trees* 2004; **18**(5): 518-528.
- 261 [14] Powar PS, Chavan SR, Gaikwad DK. Antifungal activity of mangrove bark. *Int J Pharma Bio*  
262 *Sci* 2011; **2**(4): 484-488.
- 263 [15] Vadlapudi v, Naidu KC. In vitro bioefficiency of marine mangrove plant activity of  
264 *Rhizophora conjugata*. *Int J Pharmtech Res* 2009; **1**(4): 1598-1600.
- 265 [16] Dambolena JS, López AG, Meriles JM, Rubinstein HR, Zygadlo JA. Inhibitory effect of 10  
266 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure–property–activity  
267 relationship study. *Food Control* 2012; **28**(1): 163-170.
- 268 [17] Dambolena JS, Zygadlo JA, Rubinstein HR. Antifumonisin activity of natural phenolic  
269 compounds: A structure–property–activity relationship study. *Int J Food Microbiol* 2011; **145**(1):  
270 140-146.
- 271 [18] Zabka M, Pavela R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against  
272 significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 2013; **93**(6): 1051-1056.
- 273 [19] Leslie J F, Summerell BA. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, USA: *Blackwell*  
274 *Publishing*; 2006.
- 275 [20] Munkvold GP. Epidemiology of *Fusarium* Diseases and their Mycotoxins in Maize Ears.  
276 *Eur J Plant Pathol* 2003; **109**(7): 705-713.

- 277 [21] Stumpf R, dos Santos J, Gomes LB, Silva CN, Tessmann DJ, Ferreira FD, Machinski MJ,  
278 Del Ponte EM. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio  
279 Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Braz J Microbiol* 2013; **44**(1):  
280 89-95.
- 281 [22] Pearson TC, Wicklow DT. Detection of Corn Kernels Infected by Fungi Transactions of the  
282 *ASABE* 2006; **49**(4): 1235-1245.
- 283 [23] Morales I, Yanez M, Silva HV, Garcia G, Guzman DA. Biodiversity of *Fusarium* species in  
284 Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach.  
285 *Mycopathologia* 2007; **163**(1): 31-39.
- 286 [24] Reyes VW, Figueroa GR, Barberis M, Reynoso M, Rojo FA, Chulze S, Torres A. *Fusarium*  
287 species (section *Liseola*) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferin and  
288 fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotox Res* 2011; **27**(3): 187-194.
- 289 [25] Adom K.K, Liu R.H. Antioxidant Activity of Grains. *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 6182-  
290 6187.
- 291 [26] Madhurima B, Punarbasu C. Antimicrobial potential of leaf extracts of ten mangrove species  
292 from Indian Sundarban. *Int J Pharm Bio Sci* 2014; **5**(1): 294 – 304.
- 293 [27] Ansari MA, Anurag A, Fatima Z, Hameed S. Natural phenolic compounds: A potential  
294 antifungal agent. In: Méndez-Vilas A, editors. *Microbial pathogens and strategies for combatig*  
295 *them: Science, technology and education*. 2013 edition: Vol. 2: p. 1189-1195.
- 296 [28] Kreft S., Štrukelj B., Gaberščik A., Kreft I. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV  
297 B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *J Exp. Bot*  
298 2002; **53**(375): 1801-1804



- 299 [29] Fabjan N., Rode J., Košir I.J., Wang Z., Zhang Z., and Kreft I. Tartary buckwheat  
300 (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J. Agric. Food Chem*  
301 2003; **51**(22): 6452–645.
- 302 [30] Moran EF, Zamora LA, Stephens NA, Yáñez GA, Virgen OA, Martínez CO, Rosas JA.  
303 Antioxidant capacity, radical scavenging kinetics and phenolic profile of methanol extracts of  
304 wild plants of southern Sonora, Mexico. *Trop J Pharm Res* 2014; **13**(9): 1487-1493.
- 305 [31] Sánchez LM, Varcacel L, Escobar A, Noa M. Polyphenol and phytosterol composition in an  
306 antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L. bark. *J Herb Pharm* 2008; **7**: 107-128.
- 307 [32] Costa FD, da Silva MD, Borges RM, Leitão GG. Isolation of phenolics from *Rhizophora*  
308 *mangle* by combined counter-current chromatography and gel-filtration. *Nat Prod Commun*  
309 2014; **9**(12): 1729-1731.
- 310 [33] Asha KK, Mathew S, Lakshmanan PT. Flavonoids and phenolic compounds in two  
311 mangrove species and their antioxidant property. *Indian J Mar Sci* 2012; **41**: 259-264.
- 312 [34] Shukla A, Dwivedi SK. Antifungal approach of phenolic compounds against *Fusarium*  
313 *udum* and *Fusarium oxysporum f.sp.ciceri*. *Afr J Agric Res* 2013; **8**(7): 596-600.
- 314 [35] Ferrochio L, Cendoya E, Farnochi MC, Massad W, Ramirez ML. Evaluation of ability of  
315 ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium*  
316 *proliferatum* on maize based media. *Int J Food Microbiol* 2013; **167**: 215-220.
- 317 [36] Gale LR, Chen LF, Hernick CA, Takamura K, Kistler HC. Population analysis of *Fusarium*  
318 *graminearum* from wheat fields in Eastern China. *Phytopathology* 2002; **92**(12): 1315-1322.
- 319 [37] Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, Viljoen A. Evaluation of fungicides and sterilants for  
320 potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot* 2007; **26**(4):  
321 697–705.

322 [38] Mamza WS, Zarafi AB, Alabi O. In vitro evaluation of six fungicides on radial mycelial  
323 growth and regrowth of *Fusarium pallidoroseum* isolated from castor (*Ricinus communis*) in  
324 Samaru, Nigeria. Archives of Phytopathol Plant Protect 2008; 4(2): 65-71.

325

326 **Figure Legends**

327 Figure 1. Total phenolic content (TPC) from different *R. mangle* organs (leaf, stem and root).  
328 Different letters are significantly different at a probability level of 0.05, according to Tukey's test.  
329

330 Figure 2. Benomyl dose-response curve for different *F. verticillioides* isolates.

331

332 Figure 3. Phenolic concentrations of mangrove leaf (grey bars), stem (white bars) and root (black  
333 bars) extracts required to inhibit different *Fusarium verticillioides* isolates by 50%, as calculated  
334 from the obtained linear regression formulas (see Supplementary Figure 1). Values above the  
335 bars represent the exact concentration calculated using the corresponding linear regression  
336 formula.

337

338 **Table captions**

339 Table 1. Antifungal activity of ethanolic extracts of *Rhizophora mangle* leaves, stems and roots  
340 against three *Fusarium verticillioides* isolates.

341

342 Table 2. Two-way ANOVA performed with the percentage of growth inhibition as the dependant  
343 variable and phenolic concentrations and *Fusarium* isolates as factors.

344

345 Table 3. Effect of *Fusarium* isolate growth inhibition percentages *versus* phenolic extracts from  
346 different *Rhizophora mangle* tissues.

347

348 **Electronic Supplementary Material**

349 Supplementary Figure 1. Linear regression between *F. verticillioides* isolate (P03, DA42 and  
350 F64) growth inhibition percentages and the concentration (mg GAE/mL PDA) of phenolic  
351 extracts from different *Rhizophora mangle* organs.

352

Figure 1

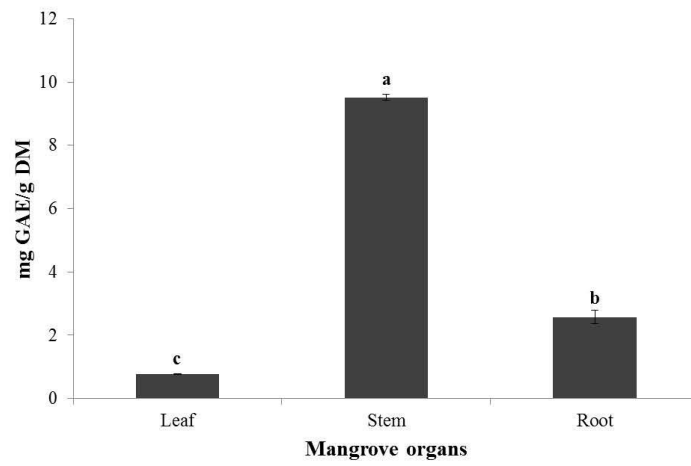


Figure 1. Total phenolic content (TPC) from different *R. mangle* organs (leaf, stem and root). Different letters are significantly different at a probability level of 0.05, according to Tukey's test.

Figure 2

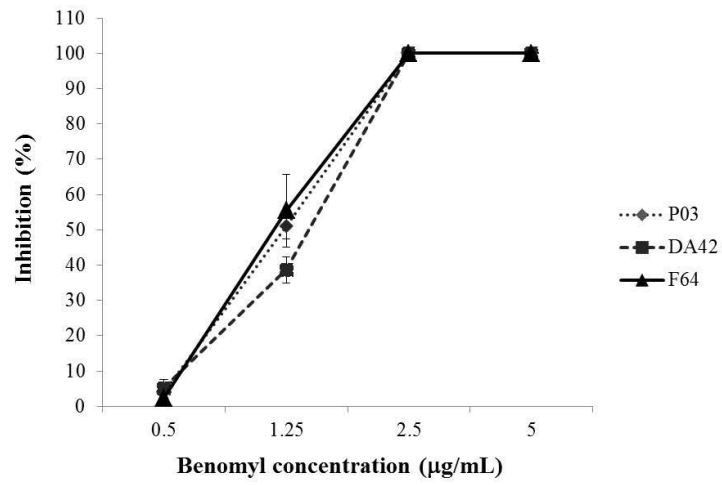


Figure 2. Benomyl dose-response curve for different *F. verticillioides* isolates.

Figure 3

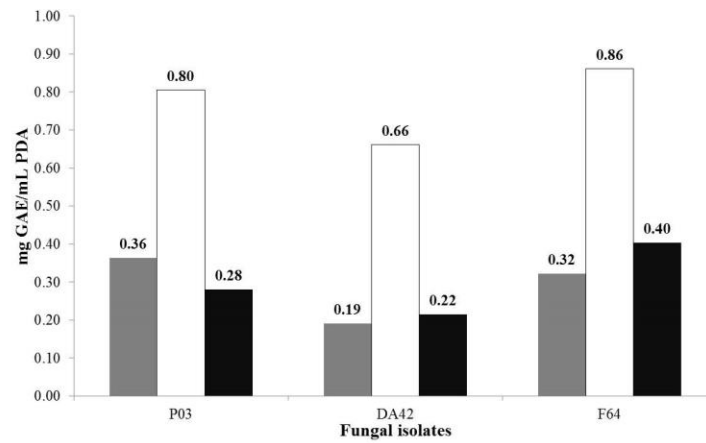


Figure 3. Phenolic concentrations of mangrove leaf (grey bars), stem (white bars) and root (black bars) extracts required to inhibit different *Fusarium verticillioides* isolates by 50%, as calculated from the obtained linear regression formulas (see Supplementary Figure 1). Values above the bars represent the exact concentration calculated using the corresponding linear regression formula.

## Table

Table 1. Antifungal activity of ethanolic extracts of *Rhizophora mangle* leaves, stems and roots against three *Fusarium verticillioides* isolates.

Mangrove extracts	EV (mL)	EC (mg GAE/mL PDA)	Growth Inhibition Percentage		
			P03	DA42	F64
Leaf	0.5	0.056	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>d</sup>
	1	0.113	8.33 ± 3.61 <sup>d</sup>	8.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	6.25 ± 6.25 <sup>cd</sup>
	1.5	0.170	10.42 ± 3.61 <sup>cd</sup>	37.30 ± 9.23 <sup>c</sup>	8.33 ± 3.60 <sup>bc</sup>
	2	0.227	18.75 ± 0.00 <sup>bc</sup>	60.00 ± 0.00 <sup>bc</sup>	22.91 ± 3.60 <sup>ab</sup>
	2.5	0.283	29.17 ± 7.22 <sup>ab</sup>	72.00 ± 6.92 <sup>b</sup>	39.58 ± 3.60 <sup>a</sup>
	3	0.340	41.67 ± 3.61 <sup>a</sup>	94.66 ± 4.61 <sup>a</sup>	45.83 ± 3.60 <sup>a</sup>
Stem	0.5	0.237	8.33 ± 3.61 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	10.41 ± 3.60 <sup>c</sup>
	1	0.475	20.83 ± 7.22 <sup>d</sup>	36.25 ± 2.31 <sup>e</sup>	18.75 ± 0.00 <sup>d</sup>
	1.5	0.712	37.50 ± 0.00 <sup>c</sup>	51.25 ± 2.31 <sup>d</sup>	33.33 ± 3.60 <sup>c</sup>
	2	0.950	45.83 ± 3.61 <sup>c</sup>	75.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	41.66 ± 3.60 <sup>c</sup>
	2.5	1.187	68.75 ± 0.00 <sup>b</sup>	91.25 ± 2.31 <sup>b</sup>	60.41 ± 3.60 <sup>b</sup>
	3	1.425	91.67 ± 3.61 <sup>a</sup>	100.0 ± 0.00 <sup>a</sup>	85.41 ± 3.60 <sup>a</sup>
Root	0.5	0.064	4.17 ± 3.61 <sup>e</sup>	20.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>e</sup>
	1	0.128	16.67 ± 3.61 <sup>d</sup>	20.00 ± 0.00 <sup>e</sup>	10.41 ± 3.60 <sup>d</sup>
	1.5	0.192	25.00 ± 0.00 <sup>cd</sup>	37.33 ± 4.61 <sup>d</sup>	16.66 ± 3.60 <sup>c</sup>
	2	0.256	37.50 ± 0.00 <sup>bc</sup>	52.00 ± 6.92 <sup>c</sup>	18.75 ± 0.00 <sup>bc</sup>
	2.5	0.316	43.75 ± 0.00 <sup>b</sup>	69.33 ± 2.31 <sup>b</sup>	25.00 ± 0.00 <sup>b</sup>
	3	0.384	66.67 ± 3.61 <sup>a</sup>	80.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	43.75 ± 0.00 <sup>a</sup>

EV: extract volume added to PDA and adjusted to 20 mL.

EC: extract concentration in PDA plates.

Means with different letters are significantly different at a probability level of 0.05 according to Tukey's test. The reported means of growth inhibition percentage were arcsine transformed ( $\sqrt{(\% / 100) + 0.5}$ ) to normalize the data and proceed with the ANOVA.

Table 2

Table 2. Two-way ANOVA performed with the percentage of growth inhibition as the dependant variable and phenolic concentrations and *Fusarium* isolates as factors.

Source	Leaf extract				Stem extract				Root extract			
	d.f.	MS	F	p	d.f.	MS	F	p	d.f.	MS	F	p
<i>GIP</i>												
PC	5	5.215	188.46	< 0.0001	5	5.578	626.31	< 0.0001	5	2.892	263.91	< 0.0001
<i>F</i> <sub>1</sub>	2	1.154	104.30	< 0.0001	2	1.147	322.16	< 0.0001	2	1.043	237.93	< 0.0001
PC x <i>F</i> <sub>1</sub>	10	0.665	12.03	< 0.0001	10	0.091	5.16	< 0.0001	10	0.141	6.46	< 0.0001

*GIP*: Growth inhibition percentage.

PC: Phenolic concentration.

*F*<sub>1</sub>: Fungal isolate.

d.f.: degrees of freedom; MS: mean square; F: F ratio; p: probability.



Table 3

Table 3. Effect of *Fusarium* isolate growth inhibition percentages versus phenolic extracts from different *Rhizophora mangle* tissues.

Isolate	Growth inhibition percentage		
	Leaf	Stem	Root
P03	18.05 ± 14.67 <sup>b</sup>	45.48 ± 29.06 <sup>b</sup>	32.29 ± 20.81 <sup>b</sup>
DA42	45.33 ± 35.08 <sup>a</sup>	63.78 ± 28.22 <sup>a</sup>	46.44 ± 23.80 <sup>a</sup>
F64	20.13 ± 17.48 <sup>b</sup>	41.66 ± 26.16 <sup>c</sup>	19.09 ± 13.97 <sup>c</sup>

p < 0.0001 for *Fusarium* isolate effect on growth inhibition percentage by two-way ANOVA. Means with different letters in the same column are significantly different according to Tukey's test. The reported means of growth inhibition percentages were arcsine transformed ( $\sqrt{(x\% / 100) + 0.5}$ ) to normalize the data and proceed with the ANOVA.

\*Title Page (with author details)

*In vitro* antifungal effect of mangrove (*Rhizophora mangle*) extracts on *Fusarium verticillioides* isolates

Short Title: Antifungal effect of mangrove extracts

Iván Guadalupe Martínez Álvarez<sup>a</sup>, Karla Yeriana [Leyva Madrigal<sup>a</sup>](#), Héctor A. González-Ocampo<sup>a</sup>, María Eugenia Jaramillo Flores<sup>b</sup>, Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR)-Unidad Sinaloa. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Col. San Joachin, 81101, Guasave, Sinaloa, Mexico.

<sup>b</sup>Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, *Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Ampliación del Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomas C.P. 11340 Del. Miguel Hidalgo Mexico, D.F.*

\*Corresponding author: Telephone +52 (687) 8729626 Ext. 87652. Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Col. San Joachin, 81101, Guasave, Sinaloa, Mexico.

E-mail address: imaldona@ipn.mx

**Supplementary Figure 1**

[Click here to download Source File: Supplementary figure 1.docx](#)

## **CAPÍTULO VI ANEXOS**

### **VI.1 Determinación de taninos condensados**

El método empleado fue el de Julkunen-Titto (1985). Se tomó una alícuota de 50 µl de muestra (extracto), se mezcló la muestra con 1.5 ml de vainillina al 4% ( $C_8H_8O_3$ , 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído), preparada con metanol, posteriormente se adicionó 750 µl de HCl concentrado, se agitó e incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 20 minutos. Fu preparado un blanco: 1.5 ml de vainillina, 750 µl de HCl y 50 µl de MeOH, finalmente se leyó en espectrofotómetro a 500 nm. Se realizó Catequina (1 mg/ml) para preparar la curva de calibración y los resultados se expresaron como miligramos de equivalente de catequina por gramo de base seca (mg ECAT/g bs).

## **CAPITULO VII: Determinación de organoclorados**

### **Colecta de sedimento**

Se tomaron muestras de sedimentos de mangle rojo (*R. mangle*) cerca a los vertidos de aguas residuales en el período de enero a agosto de 2011. Las muestras se colectaron con una cuchara de Teflón, recogiendo cuatro muestras de cada sitio de muestreo, colocándolas inmediatamente en aluminio y en bolsas de polietileno para la preservación, mismas que fueron almacenada en una hielera y transportadas al laboratorio.

### **Plaguicidas organoclorados**

Para la extracción se emplearon los métodos epa 8270, 508, 8081b, 3660, también 3500 y 3600). En un matraz erlenmeyer se agregaron 5 gramos de sedimento seco, posteriormente se le adicionó diclorometano hasta cubrir el sedimento, se colocó en sonicación (3550) por 15 min (se repitió esto 3 veces, retirando cada vez el diclorometano aprox 150 ml).

Después, en un embudo de cristal se colocó un tapón de fibra de vidrio y sulfato de sodio a fin de eliminar partículas, el diclorometano obtenido se colocó en un rotavapor a sequedad y se recuperó en 2 mililitros de hexáno (Figura 1).



Figura 1. Proceso de purificación extracción y purificación de plaguicidas organoclorados: (a) limpieza del material, (b) extracción ultrasónica, (c) filtración con un sulfato de sodio anhidro, (d) purificación con ácido sulfúrico, (e) rotoevaporación, (f) elusión de la muestra, (g) concentración final y (h) análisis cromatográfico.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones Perkin Elmer, en el cual se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de las muestras de plaguicidas diluidas en hexano. Los plaguicidas organoclorados fueron separados y cuantificados por cromatografía de gases usando un cromatógrafo de gases AutoSystem XL marca Perkin Elmer<sup>®</sup> equipado con un detector ECD, acoplado al software TotalChrom Navigator<sup>®</sup> V. 6.3.1. Se utilizó una columna capilar J&W DB-5 de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, y composición 5 % difenil-95%

dimetilpolisiloxano. Las condiciones cromatográficas de operación aplicadas se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas de determinación de plaguicidas organoclorados en sedimento de manglar.

Volumen de inyección de muestra	1 µl
Nitrógeno gas portador Flujo	15 mL/min
Temperatura del detector	320 °C
Temperatura del inyector	250 °C
Temperatura de la columna	120 °C (1 min), 40 °C/min hasta 170 °C, 10 °C/min hasta 300 °C (5 min)
Modo Split	Splitless
Atenuación	16

La identificación de compuestos se realizó a partir de sus tiempos de retención y la cuantificación se basó en las mediciones altura del pico/área, así como también, por la comparación con los resultados de los estándares de referencia 48858-U. (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo y lugar de aparición de OC empleados como patrón.

Compuesto	Tiempo de retención (min.)	Orden de aparición
d-BHC	4.5410	1
2,4,5,6 Tetracloro-Xileno	4.8080	2
a α-BHC	5.8000	3
g γ-BHC	6.4280	4
b β-BHC	6.6530	5
Heptacloro	7.1780	6
Aldrin	7.7280	7
Heptacloro Epóxido	8.7830	8
γ-clordano	9.1350	9
α-clordano	9.3940	10
Endosulfán I	9.5060	11
4,4´- DDE	9.7370	12
Dieldrin	10.0120	13
Endrin	10.5690	14
4,4´- DDD	10.8240	15
Endosulfán II	10.9850	15
4,4´- DDT	11.3710	16
Endrin Aldeído	11.6080	17
Endosulfán Sulfato	12.1240	18
Metoxicloro	12.6940	19
Endrin cetona	13.1140	20
Decaclorobifenil	15.3400	21

### **Análisis estadístico**

Las muestras fueron analizadas por triplicado y los datos fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar a menos que se indique lo contrario. El análisis de datos se realizó mediante análisis de varianza de dos vías, una diferencia de  $p \leq 0.05$  fue considerada como significativa. Para la relación entre fenoles, flavonoides, actividad antioxidante con metales; así como metal-metal, se empleó el coeficiente de correlación de pearson. El paquete estadístico empleado fue Sigma plot versión 11.0.

## Resultados organoclorados

### Porcentaje de recuperación

Como se observa en la figura 2 los analitos tuvieron un porcentaje de recuperación del 81.10 % al 114. 20 %. Los compuestos con recuperación mayor al 90 % fueron  $\delta$ -BHC,  $\delta$ -HCH,  $\gamma$ -BHC,  $\beta$ -BHC, Heptacloro, aldrin, heptacloro epóxido,  $\gamma$ -clordano,  $\alpha$ -clordano, endosulfán I, 4'4-DDE, 4'4-DDD, endosulfánII, y 4'4-DDT. Los compuestos con recuperación inferior al 90 % fueron  $\alpha$ -HCH, y endosulfán sulfato. Con una linealidad ( $r$ ) para cada uno de los compuestos mayor a 0.98

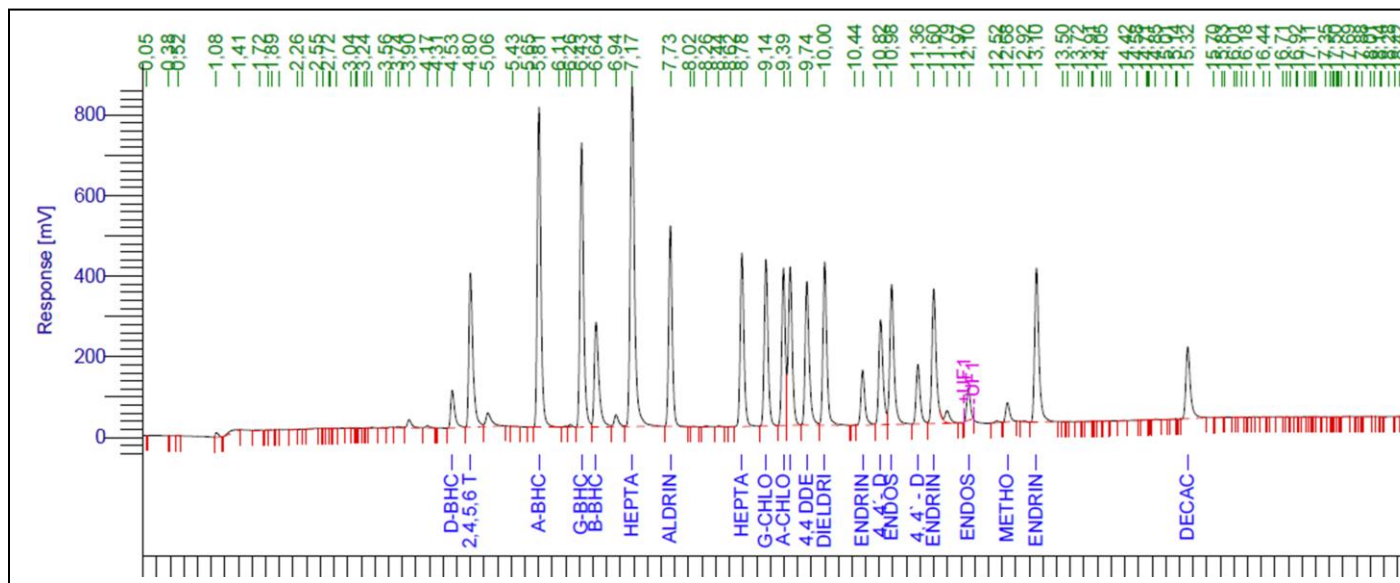


Figura 2. Perfil cromatografico de estándar de pesticida 8088 a 0.35 ug/ml, que muestra los analitos y sus tiempos de retención.

Los organoclorados presentes en Bahía Magdalena fueron  $\gamma$ -clordano,  $\beta$ -BHC  $\delta$  y  $\gamma$ -BHC, con valores que oscilaron desde cero a valores máximos de 9.84, 11.74 y 100.8 ng/g bs, respectivamente. Mientras que para Bahía Navachiste fueron:  $\gamma$ -clordano,  $\beta$ -BHC  $\delta$  y  $\gamma$ -BHC valores que mínimos que oscilaron desde cero a 29.76 y hasta máximos de 29.9, 35.02 y 157.4 respectivamente. Por otro lado los plaguicidas organoclorados encontrados en Laguna de Términos fueron  $\delta$ -BHC,



metoxiclor,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -Clordano y endrín cuyos valores mínimos oscilaron de 0 a 22.3 y los máximos 200, 70, 64.5, 59 y 8.7 respectivamente.

Cabe señalar que en Laguna de Términos se encontró un mayor número de plaguicidas, así como las más altas concentraciones (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración de OC (ng /g bs) en sedimento de manglar de tres ecosistemas lagunares costeros.

Pesticida	Bahía Magdalena				Bahía Navachiste				Laguna de Términos			
	Min	Max	Media	D.E.	Min	Max	Media	D.E.	Min	Max	Media	D.E.
$\delta$ -BHC	nd	100.8	99.4 <sup>b</sup>	1.0	29.76	157.4	90.1 <sup>b</sup>	48.6	22.3	200	103.2 <sup>a</sup>	69.7
$\beta$ -BHC	nd	11.74	11.6 <sup>b</sup>	0.1	nd	35.02	11.7 <sup>b</sup>	16.2	nd	64.5	16.1 <sup>a</sup>	29.9
Endrin	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8.7	2.2	4.0
Methoxychlor	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	70.0	17.5	32.4
$\gamma$ -Clordano	nd	9.84	10.1 <sup>b</sup>	0.5	nd	29.9	13.4 <sup>a</sup>	14.6	nd	59.0	19.8	24.6 <sup>a</sup>

Mínimo. Máximo, media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los sitios de estudio ( $p \leq 0.05$ ). N.D. No detectado.

Las concentraciones más altas del presente estudio fueron comparadas con las máximas concentraciones en sedimento de otras lagunas costeras de Campeche, Sonora y Sinaloa siendo metoxicloro y  $\gamma$ -clordano los que presentaron mayores concentraciones a las reportadas (Tabla 4).

Tabla 4. Selección de Concentraciones máximas de OC (ng g<sup>-1</sup> peso seco) en sedimento, reportadas para otras lagunas costeras de los estados de Campeche, Sonora y Sinaloa

Sitio	Plaguicida				
	$\delta$ -BHC	$\beta$ -BHC	Endrin	Methoxychlor	$\gamma$ -Clordano
Altata-Ensenada <sup>1</sup> del pabellón Laguna de <sup>2</sup> Términos			0.166		0.003
Altata-Ensenada <sup>3</sup> del pabellón Ohuira <sup>4</sup>	1190	4	2.9		
Navachiste- <sup>5</sup> Macapule, Sin.				0.76	
Agiabampo <sup>6</sup>		4.87	30.36	nd	

Tabla 4. Selección de Concentraciones máximas de OC (ng g<sup>-1</sup> peso seco) en sedimento, reportadas para otras lagunas costeras de los estados de Campeche, Sonora y Sinaloa

Sitio	Plaguicida				
	δ -BHC	β-BHC	Endrin	Methoxychlor	γ -Clordano
Bacorehuis jutzamuri Laguna de <sup>7</sup> Términos			16		33
Altata-Ensenada <sup>8</sup> del pabellón		19.48	18.53		
Navachiste- <sup>9</sup> Macapule EN ESTE ESTUDIO	70.23	533.25	26.99	42.08	
Bahía Magdalena	100.8	11.74	nd	nd	9.84
Bahía Navachiste	157.4	35.02	nd	nd	29.9
Laguna de Términos	200	64.5	8.7	70	59
nd=no detectado					

<sup>1</sup>Carvalho *et al.*, 1996; <sup>2</sup>Rendon-Von Osten *et al.*, 2000; <sup>3</sup>Carvalho *et al.*, 2002; <sup>4</sup>Osuna-Flores y Rivera (2002); <sup>5</sup>Montes *et al.*, 2008; <sup>6</sup>Gonzalez-farías *et al.*, 2002; <sup>7</sup>Carvalho *et al.*, 2009; <sup>8</sup>Gonzalez-farías *et al.*, 2006; <sup>9</sup>Montes *et al.*, 2011.

### **Correlaciones de organoclorados y metales pesados con las concentración de compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antioxidante y quelante de Cu de *R. mangle***

Del análisis de correlación de Pearson se obtuvo una matriz para flavonoides, fenoles, actividad antioxidante y quelante, metales pesados y organoclorados. Para Bahía Magdalena se encontraron altas correlaciones entre la concentración de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad quelante, cabe señalar que estos tuvieron altas correlaciones con metales pesados. Por otro lado, se encontró correlaciones altas entre metales como Cu, Fe, Pb, Ni, Zn, Cd y Mn, a su vez existe una alta correlación entre los plaguicidas δ-BHC, β-BHC y γ-clordano (r=1.000). No se mostraron correlaciones significativas entre la concentración de

fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad quelante respecto a plaguicidas organoclorados (Tabla 5).

Para Bahía Navachiste, el análisis de correlación de Pearson mostró una matriz para flavonoides, fenoles, actividad antioxidante y quelante, metales pesados y organoclorados. Se encontraron altas correlaciones entre la concentración de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad quelante, estos a su vez mostraron correlaciones de bajas a medias respecto a Cu, Fe, Pb, Ni y altas correlaciones con Zn y Cd. El Zn presentó altas correlaciones con Cu, Fe, Pb, Ni, mientras que el Cd se correlacionó con Zn y Ni. Cu y Ni, así como Mn con Cu, Ni y Cd. Para organoclorados como el  $\delta$ -BHC se presentaron correlaciones medias respecto a Cu, Fe, Pb y Ni.  $\beta$ -BHC presentó medias correlaciones con Cu, Fe, Pb y Ni, Zn y Cd. Se encontraron altas correlaciones entre los organoclorados. Destaca  $\beta$ -BHC que se correlaciona estrechamente con fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y quelante. Clordano presentó correlación media con Cu, Ni y Mn, así como una alta correlación con  $\delta$ -BHC y  $\beta$ -BHC (Tabla 6).

En Laguna de Términos, el análisis de correlación de Pearson mostró una matriz para flavonoides, fenoles, actividad antioxidante y quelante, metales pesados y organoclorados. Se encontraron altas correlaciones entre la concentración de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad quelante, por su parte éstos muestran de baja a media correlación respecto a metales pesados, siendo Cu, Pb y Cd los metales que se correlacionaron estrechamente con flavonoides, fenoles, actividad antioxidante y quelante.  $\delta$ -BHC,  $\gamma$ -clordano, metoxicloro y endrin se correlacionan altamente con el contenido fenólico, y medianamente con contenido flavonoides, actividad antioxidante y quelante. Las correlaciones altas para metales fueron entre Pb y Cu, Ni y Fe, Zn con Fe, Pb y Ni, Cd con Cu, Pb y Zn, así como Mn y Zn. Metales como Cu se correlacionaron altamente con organoclorados como  $\delta$ -BHC,  $\gamma$ -clordano, metoxicloro y endrin, Fe con  $\beta$ -BHC, Pb y Cd con  $\gamma$ -clordano,

Ni con  $\beta$ -BHC Mn con metoxicloro y endrin. Finalmente, se encontraron altas correlaciones entre los organoclorados (Tabla 7).

Tabla 5. Matriz de los coeficientes de correlación de metales pesados, organoclorados, textura y materia orgánica en Sedimentos de manglar de Bahía Magdalena

	Flavo	Fenol	A.A. <sup>1</sup>	A.Q. <sup>2</sup>	Cu	Fe	Pb	Ni	Zn	Cd	Mn	$\delta$ -BHC	$\beta$ -BHC	$\gamma$ -Clor <sup>3</sup>
Flavo	1.00													
Fenol	0.83	1.00												
A.A. <sup>1</sup>	0.80	1.00	1.00											
A.Q. <sup>2</sup>	0.80	0.90	0.90	1.00										
Cu	0.62	0.73	0.80	0.51	1.00									
Fe	0.62	0.74	0.80	0.51	1.00	1.00								
Pb	0.62	0.73	0.80	0.51	1.00	1.00	1.00							
Ni	0.41	0.53	0.53	0.36	0.80	0.80	0.80	1.00						
Zn	0.62	0.73	0.80	0.51	1.00	1.00	1.00	0.78	1.00					
Cd	0.51	0.66	0.660	0.50	0.94	0.94	0.94	0.81	0.94	1.00				
Mn	0.02	0.08	0.06	0.04	0.20	0.20	0.20	0.78	0.20	0.31	1.00			
$\delta$ -BHC	0.08	-0.08	-0.02	-0.02	-0.25	-0.25	-0.25	-0.33	-0.25	-0.54	-0.25	1.00		
$\beta$ -BHC	0.08	-0.08	-0.02	-0.02	-0.25	-0.25	-0.25	-0.33	-0.25	-0.54	-0.25	1.00	1.00	
$\gamma$ -Clor <sup>3</sup>	0.08	-0.08	-0.02	-0.02	-0.25	-0.25	-0.25	-0.33	-0.25	-0.54	-0.25	1.00	1.00	1.00

Correlaciones Pearson

Correlaciones marcadas en rojo indican que son significativas  $p < .05000$

<sup>1</sup> Actividad Antioxidante

<sup>2</sup> Actividad Quelante

<sup>3</sup>  $\gamma$ -Clordano

**Tabla 6. Matriz de los coeficientes de correlación de Flavonoides, fenoles, actividad antioxidante y quelante, metales pesados y organoclorados  
En sedimentos de manglar de Bahía Navachiste**

	Flavo	Fenol	A.A. <sup>1</sup>	A.Q. <sup>2</sup>	Cu	Fe	Pb	Ni	Zn	Cd	Mn	δ -BHC	β -BHC	γ -Clor <sup>3</sup>
Flavo	1.00													
Fenol	0.94	1.00												
A.A. <sup>1</sup>	0.95	0.95	1.000											
A.Q. <sup>2</sup>	0.86	0.86	0.83	1.00										
Cu	0.44	0.47	0.44	0.44	1.00									
Fe	0.21	0.34	0.21	0.44	0.21	1.00								
Pb	0.21	0.34	0.21	0.44	0.21	1.00	1.00							
Ni	0.44	0.47	0.44	0.44	1.00	0.21	0.21	1.00						
Zn	0.73	0.65	0.65	0.75	0.79	0.68	0.68	0.80	1.000					
Cd	0.81	0.81	0.81	0.76	0.84	-0.21	-0.21	0.85	0.848	1.00				
Mn	0.51	0.47	0.51	-0.39	0.88	-0.21	-0.21	0.89	0.551	0.84	1.00			
δ -BHC	0.22	0.26	0.22	0.31	0.57	0.52	0.52	0.57	-0.034	-0.21	0.68	1.00		
β -BHC	0.75	0.75	0.75	0.75	0.08	0.43	-0.43	0.08	0.433	0.40	0.08	0.80	1.00	
γ -Clor <sup>3</sup>	0.26	0.26	0.26	0.30	0.64	-0.32	-0.32	0.64	0.093	-0.21	0.64	0.97	0.80	1.00

Correlaciones Pearson

Correlaciones marcadas en rojo indican que son significativas p <.05000

<sup>1</sup>Actividad Antioxidante

<sup>2</sup>Actividad Quelante

<sup>3</sup>γ -Clordano

Tabla 7. Matriz de los coeficientes de correlación de Flavonoides, fenoles, actividad antioxidante y quelante, metales pesados y organoclorados  
En sedimentos de manglar de Laguna de Términos

	Flavo	Fenol	A.A. <sup>1</sup>	A.Q. <sup>2</sup>	Cu	Fe	Pb	Ni	Zn	Cd	Mn	δ-BHC	β-BHC	γ-Clor <sup>3</sup>	Met <sup>4</sup>	End <sup>5</sup>
Flavo	1.00															
Fenol	<b>0.86</b>	1.00														
A.A. <sup>1</sup>	<b>0.98</b>	<b>0.88</b>	1.00													
A.Q. <sup>2</sup>	<b>0.86</b>	<b>0.60</b>	<b>0.80</b>	1.00												
Cu	<b>0.69</b>	<b>0.82</b>	<b>0.71</b>	<b>0.58</b>	1.00											
Fe	0.23	0.40	0.50	0.45	0.20	1.00										
Pb	<b>0.50</b>	<b>0.56</b>	<b>0.51</b>	0.43	<b>0.80</b>	0.40	1.00									
Ni	0.33	0.40	<b>0.50</b>	-0.35	0.20	<b>1.00</b>	0.40	1.00								
Zn	-0.21	0.45	-0.25	0.41	<b>0.40</b>	<b>0.80</b>	<b>0.80</b>	<b>0.80</b>	1.00							
Cd	<b>0.50</b>	<b>0.56</b>	<b>0.51</b>	0.43	<b>0.80</b>	0.40	<b>1.00</b>	<b>0.40</b>	<b>0.80</b>	1.00						
Mn	0.41	0.35	0.40	0.35	-0.20	<b>0.60</b>	<b>0.40</b>	<b>0.60</b>	<b>0.80</b>	0.40	1.00					
δ-BHC	<b>0.54</b>	<b>0.73</b>	<b>0.51</b>	0.43	<b>0.80</b>	0.40	<b>0.60</b>	0.40	0.00	<b>0.60</b>	0.40	1.00				
β-BHC	0.40	0.30	0.08	0.08	0.25	<b>0.78</b>	0.25	<b>0.78</b>	0.25	0.25	0.25	<b>0.78</b>	1.00			
γ-Clor <sup>3</sup>	<b>0.54</b>	<b>0.73</b>	<b>0.51</b>	0.43	<b>0.80</b>	0.40	<b>0.60</b>	0.40	0.00	<b>0.60</b>	0.40	<b>1.00</b>	<b>0.78</b>	1.00		
Met <sup>4</sup>	<b>0.60</b>	<b>0.75</b>	<b>0.58</b>	0.47	<b>0.78</b>	0.45	0.25	0.25	0.25	0.25	<b>0.78</b>	<b>0.78</b>	0.33	<b>0.78</b>	1.00	
End <sup>5</sup>	<b>0.60</b>	<b>0.75</b>	<b>0.58</b>	0.47	<b>0.78</b>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	<b>0.78</b>	<b>0.78</b>	0.33	<b>0.78</b>	<b>1.00</b>	1.00

Correlaciones Pearson

Correlaciones marcadas en rojo indican que son significativas p <.05000

<sup>1</sup>Actividad Antioxidante

<sup>2</sup>Actividad Quelante

<sup>3</sup>γ-Clordano

<sup>4</sup>Methoxychlor

<sup>5</sup>Endrin

## **Predicción de efectos toxicológicos y biológicos**

En el sentido de predecir los efectos toxicológicos y biológicos potenciales de contaminación por plaguicidas organoclorados en las tres lagunas costeras estudiadas, los datos obtenidos en el presente estudio se compararon con las tablas de referencias de compuestos orgánicos (NOSS, 2004) y la guía Canadiense de la Calidad Ambiental de Sedimentos (CCME, 2002). Las tablas especifican: El nivel de umbral de efectos (Threshold Effects Level, TEL) y nivel de efectos probables (Probable Effects Level, PEL), efecto de rango bajo (Effects Range-Low, ERL), efecto de rango medio (Effects Range Median, ERM), nivel mínimo de efecto (The Lowest Effect Level, LEL) es un nivel de contaminación de los sedimentos que pueden ser tolerados por la mayoría de los organismos bentónicos. Nivel de efecto (The Severe Effect Level, SEL) es aquel donde se puede esperar la que la perturbación de la comunidad que viven en los sedimentos. Esta es la concentración que sería perjudicial para la mayoría de la comunidad bentónica. Los valores se refieren como Ecotox Umbrales (ETs), y se definen como las concentraciones de contaminantes que sobrepasan los límites de aceptación por lo que hay suficiente preocupación por los efectos ecológicos adversos y se justifica una investigación más profunda del sitio. ETs están diseñados para proporcionar a los investigadores del sitio como una herramienta para identificar eficazmente los contaminantes que puedan suponer una amenaza para los receptores ecológicos y enfocar más las actividades del sitio sobre los contaminantes y los medios de donde se encuentran. ETs están destinados a ser utilizados sólo con fines de detección; no son criterios reglamentarios, normas de limpieza específicos del lugar, o metas de remediación. Para los productos químicos con el potencial de bioacumulación a niveles tóxicos en los animales salvajes superior trófica. Estos criterios se aplicaron a los siguientes compuestos marinos:  $\delta$ -BHC,  $\beta$ -BHC, endrin, metoxycloro y  $\gamma$ -clordano.

Bahía Magdalena y Navachiste sobrepasaron los valores establecidos teniendo una categoría de PEL para  $\gamma$ -clordano, mientras que Laguna de Términos presentó tres compuestos que pasan los valores, siendo endrin (PEL),  $\gamma$ -clordano (PEL) y metoxycloro (ETs)



## DISCUSIÓN

### Plaguicidas:

Las concentraciones de OC en sedimento se muestran en la (Tabla 3).  $\beta$ -hexaclorociclohexano y  $\delta$ -hexaclorociclohexano ( $\delta$ -HCH,  $\beta$ -BHC) son organoclorados isómeros del hexaclorociclohexano (HCH) y presentaron los valores más altos sugiriendo una contaminación histórica por el uso de la mezcla técnica de HCH.  $\beta$ -BHC es el isómero más persistente y estable frente a la descomposición microbiana en suelos y sedimentos (Montes *et al.*, 2011). Methoxychlor también se encontró en altas concentraciones por lo que se sugiere el constante uso y aporte al sistema al igual que  $\gamma$ -Clordano, mismo que entró al medio ambiente cuando se usó como plaguicida en cosechas (ATSDR, 1995). Finalmente endrin fue el compuesto que presentó las más bajas concentraciones. Éste compuesto es un plaguicida usado para controlar insectos, roedores y pájaros, cabe destacar que la presencia de metoxicloro y endrín sugieren un presente uso continuo a pesar de su prohibición por las leyes gubernamentales (ATSDR, 1995; Montes, 2011).

En Bahía Magdalena se encontraron las concentraciones más bajas de  $\delta$ -BHC,  $\beta$ -BHC, y  $\gamma$ -clordano, en el punto 4, localizado en el puerto de San Carlos. Cabe destacar que no existen reportes de presencia de plaguicidas organoclorados para esta zona debido a que en no hay actividad agrícola, ni descargas por ríos o drenes por lo tanto se atribuye la presencia de estos plaguicidas al aporte aéreo y es muy probable que provengan de Ciudad Constitución, que es un sitio cercano al puerto de San Carlos y en esa zona se realiza agricultura.

Por otro lado, en Bahía de Navachistes se encontraron OC's en los 4 puntos de muestreo encontrándose la mayor diversidad en el punto 2 presentado los compuestos ( $\delta$ -BHC,  $\beta$ -BHC, y  $\gamma$ -clordano). Seguido del punto 1 con dos compuestos,  $\delta$ -BHC y  $\gamma$ -clordano. Mientras que en los puntos 3 y 4 sólo se encontró un compuesto por punto.

Las mayores concentraciones fueron para el compuesto  $\delta$ -BHC con 157.42 ng/g localizado en el punto 2, seguido por el mismo compuesto en el punto 1 y 4 con concentraciones de 92.84, y 80.4 ng/g, respectivamente. El segundo compuesto más abundante fue  $\beta$ -BHC con una concentración de 35.02 ng/g en el punto 2. El compuesto  $\gamma$ -clordano presentó la concentración más baja (23.88 ng/g) en el punto 1.

En algunos reportes se encontraron concentraciones para  $\delta$ -BHC y  $\beta$ -BHC de 70.23 y 533.25 ng/g, respectivamente (Montes *et al.*, 2011). Cabe destacar que estas concentraciones máximas se encontraron en drenes agrícolas durante la época de lluvias (Montes *et al.*, 2011) y nuestro estudio se realizó en las zonas de manglar, posiblemente esa sea la causa por la que sus resultados presentaron concentraciones mucho más altas para  $\beta$ -BHC y endrin.

Los principales efluentes que llegan al sistema son: drenaje agrícola del distrito de riego ID-063, parte de los desechos municipales del municipio de Guasave (300,000 habitantes) y drenaje de granjas camaronícolas. Existen 68 granjas acuicolas en el complejo San Ignacio-Navachiste-Macapule (Lyle-Fritch *et al.*, 2001; Montes *et al.*, 2011). Por su parte, Vergara *et al.* (1996) mencionan que los sedimentos que cubren la Bahía Navachiste, así como los de la plataforma, son de origen continental, y han sido transportados allí por el río Sinaloa. Las principales fuentes de contaminación del sistema Lagunar Navachiste-Macapule corresponden a los drenes de riego del distrito n° 63 (ID-063 y 075). Navachiste recibe las aguas residuales agrícolas de los módulos I-1 de riego, I-2, II-1 del distrito de riego 075 Y VII-1, II-1, II-2 y III-1 del distrito 063 (Conagua, 2007). Los principales drenes colectores de esos distritos de riego son: batamote, Tepachote-San Antonio, Los Hornos-San Antonio, 20+1000 (aguas municipales), El Burrión y San Rafael (Escobedo-Urías, 2010). Por otro lado, los estuarios de Babaraza, Tortugo, Cuchillo y Algodoneros se integran a este sistema y la boca en los desagües procedentes de las zonas de riego y el drenaje del municipio de Guasave, aparte de los vertidos procedentes de las granjas camaroneras ubicadas en las márgenes de la laguna (Hernández Cornejo *et al.*, 2005). Como consecuencia de la intensa actividad

agrícola, la Bahía Navachiste presenta altos índices de contaminación de PCBs, pesticidas organoclorados y metales pesados (Páez-Osuna *et al.*, 2002; Domínguez *et al.*, 2004; Montes *et al.*, 2011).

En Laguna de Términos se encontraron OC's en los 4 puntos de muestreo, pero se encontraron 3 OC en los puntos 1 ( $\delta$ -BHC, endrin y metoxycloro) y 2 ( $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -clordano y metoxycloro). En los puntos 3 y 4 sólo se encontraron dos compuestos ( $\delta$ -BHC y  $\gamma$ -clordano). El compuesto  $\delta$ -BHC presentó las mayores concentraciones en los puntos 2 y 3 con 200 y 116.82 ng/g, respectivamente. Algunos trabajos como el de Rendón-Von Osten *et al.* (2000) reportan concentraciones de 0.003 ng/g para metoxyclor y otros como Carvalho *et al.* (2009) reportan 16 y 33 ng/g de endrín y  $\gamma$ -clordano, respectivamente. Otros trabajos reportan 805.7 y 49.1 ng/g de endrín y  $\beta$ -BHC en pasto, respectivamente (Díaz-González *et al.*, 2005).

Los sistemas fluvio lagunares Candelaria, Chumpán y Palizada llegan a Laguna de Términos contribuyendo a mantener las funciones ecológicas en esta region. Siendo Palizada el que aporta el 70 % del agua dulce que llega a L. Términos. Cabe señalar que el uso de plaguicidas en ésta region durante los años 80's fue muy intenso para el control de la malaria y razón por la cual se encuentran presentes algunos compuestos orgánicos persistentes (COPS) como plaguicidas organoclorados y polibifenilos (Rendón-Von Osten *et al.*, 2005).

Por otro lado Carvalo *et al.* (2009) encontraron residuos de compuestos clorados presentes en sedimentos y ostra con 16 y 33 ng/g para endrin y clordano, respectivamente, mencionan que la concentración de dichos compuestos no se encuentran en un nivel alarmante y siempre los valores se encontraron para otras lagunas de la region.

Se puede inferir que los ríos que desembocan en Laguna de Términos arrastran compuestos orgánicos persistentes que quizá fueron empleados en comunidades aledañas y que por su característica de persistencia se encuentran en el sedimento. Otra posible fuente de aporte que no debe descartarse es el

atmosférico, ya que se ha demostrado que estos compuestos son transportados largas distancias, así como también existen organoclorados del grupo de los derivados de hidrocarburos están representados por: aldrín, dieldrín, endrín, heptaclor, epóxido de heptacloro, alfa y beta endosulfan, sulfato de endosulfan, clordecona y clordano (Duce, 1998; Schmidt van Drop, 1991; Rendón-Von Osten *et al.*, 2005).

En general nuestras concentraciones son similares a las previamente reportadas, excepto para metoxicloro y  $\gamma$ -clordano que presentaron mayores concentraciones a las reportadas (Tabla 4). (Carvalho *et al.*, 1999; 2002; 2009; Rendón-Von Osten *et al.*, 2000; Osuna-Flores y Rivera *et al.*, 2002; González-Farías *et al.*, 2002; 2006; Montes *et al.*, 2011).

Estudios recientes demuestran la presencia de bacterias patógenas, metales tóxicos (como plomo, cadmio, cromo y arsénico), hidrocarburos aromáticos policíclicos, derivados del petróleo, bifenilos policlorados y plaguicidas organoclorados, no sólo en muestras de agua y sedimentos, sino también en importantes recursos pesqueros de las costas del Pacífico, Golfo de México y el Caribe mexicano. (Jiménez 2001; Aboites *et al.*, 2008; Botello *et al.*, 2010)

Los plaguicidas organoclorados constituyen derivados halogenados de los hidrocarburos. Son insolubles en disolventes polares, química y bioquímicamente muy estables, con una vida media en el ambiente mayor a los 10 años. En muchos casos, sus productos de degradación parcial resultan más estables y tóxicos que el compuesto original (Albert y Loera Gallardo, 2005).

La persistencia de los organoclorados favorece otros problemas graves como la bioacumulación y la biomagnificación, es decir, su retención y almacenamiento en los organismos y su transferencia en la cadena de alimentación, de modo que aumenta significativamente los niveles en los tejidos hasta el consumidor final que adquiere de forma aguda cantidades elevadas de estos compuestos. Los efectos adversos de estos contaminantes se encuentran principalmente asociados a la

exposición crónica a bajas concentraciones, que pueden causar inmunodeficiencia, problemas y lesiones dérmicas, disminución de la eficiencia reproductiva y carcinogénesis (Brink *et al.*, 2000; ATSDR, 2002; Rendón-Von Osten *et al.*, 2005).

Por tal motivo, se debe controlar el uso e incorporación de organoclorados al sistema y se recomienda monitorear los drenes de riego debido a su cercanía con los ecosistemas costeros por lo tanto es urgente el fortalecimiento y la aplicación de la legislación mexicana para evitar la presencia de contaminantes en las zonas costeras. Cabe destacar que México se comprometió a reducir paulatinamente, el uso de compuestos persistentes, hasta lograr su eventual eliminación en el 2006 (Rendón Von-Osten *et al.*, 2005).

Entre las maneras de abordar este asunto están los auspicios del proyecto Monitoreo y Evaluación Ambientales del programa Manejo Adecuado de las Sustancias Químicas de la CCA. Para México, un programa sustentable que brinde información integral y a largo plazo sobre monitoreo y evaluación ambientales permitiría a los responsables de la toma de decisiones:

Entender si los contaminantes pudieran estar afectando el medio ambiente y la salud de los mexicanos y de qué manera, y formular iniciativas de políticas adecuadas para la reducción de riesgos.

Determinar las tendencias a largo plazo de la exposición humana y del medio ambiente a contaminantes, y comprender la eficacia de las políticas puestas en marcha.

. Analizar las posibles implicaciones comerciales y económicas de las estrategias orientadas a la reducción de evaluación de sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables (STPB).

En la actualidad, México tiene capacidad para monitorear un número limitado de sustancias químicas tóxicas en distintos medios y no se advierten programas de monitoreo de STPB rutinarios o continuos; o bien se trata de iniciativas esporádicas y, en el mejor de los casos, específicas de sustancias químicas. Por ende, no existen inventarios formales ni evaluaciones exhaustivas sobre los niveles y riesgos

de exposición a estas sustancias tóxicas. Las sustancias tóxicas persistentes seleccionadas incluyen DDT, clordano, lindano, hexaclorobenceno (HCB), bifenilos policlorados (BPC), furanos, dioxinas, plomo y mercurio

La información obtenida arrojó aspectos sobresalientes acerca de la capacidad regional de México y marcó la sólida posición de Sinaloa y Yucatán para generar información ambiental validada sobre sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables. Proyectos de investigación empleados para desarrollar las matrices regionales se han llevado a cabo, en general, recientemente (2000-2007). Diversas instituciones en diferentes estados han realizado proyectos de investigación que incluyen el análisis de contaminantes orgánicos persistentes en matrices ambientales (CCA, 2009).

Para el periodo 2007-2012 el cumplimiento de lo dispuesto en el Convenio de Estocolmo, al considerarlo como ley nacional. Específicamente, el Convenio establece obligaciones relativas a la producción, uso, importación, exportación, liberación al ambiente y disposición final de los COP intencionales y no intencionales. En todas estas materias México ha logrado avances y derivado lecciones, con base en los cuales se ha procedido a la integración de este Plan (PNICE, 2007).

## CAPITULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

La corteza del tallo, seguido de la raíz y hoja son los tejidos con el mayor contenido de compuestos fenólicos libres y flavonoides, así como una mayor actividad de antioxidante y actividad quelante de Cu.

La corteza del tallo de los manglares de la Laguna de Términos mostró los valores más altos de contenido fenólico libres y flavonoides, actividad antioxidante y quelante de Cu.

En las hojas, la mayor concentración de compuestos fenólicos libres se encontró en Bahía Magdalena y la menor en Bahía Navachiste y Laguna de Términos. Esto indica que los fenoles responden a la radiación UV, siendo estas mas elevadas en Bahía Magdalena.

La concentración más alta de las raíces se encontró en la Laguna de Términos, en segundo lugar en la bahía de Magdalena y posteriormente en Bahía Navachiste, lo que significa que existe una respuesta de los compuestos fenólicos a la contaminación.

Se encontraron correlaciones medias en el contenido fenólico y flavonoides, actividad antioxidantes y quelante de Cu respecto al contenido de metales pesados y organoclorados en sedimentos de manglares, lo que indica que tal vez la respuesta esta en las asociaciones de los manglares con otras especies, tales como bacterias, hongos y esponjas.

El contenido fenolico de extractos etanolicos de tejido de raíz, tallo y hoja de *R. mangle* presentaron actividad antimicótica contra diferentes aislados de *F. verticillioides*, siendo específicamente hojas y raíces los extractos que demostraron ser más eficaz que el extracto del tallo.

## LITERATURA CITADA

Aboites L, Cifuentes E, Jiménez B. y Torregrosa M.L. Agenda del agua en México, Academia Mexicana de Ciencias. (2005).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTR). Toxicological Profile for Chlordane. Update. Atlanta GA. U.S. Department of Health and Human Service. Public Health Service 1995. ([http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts31.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts31.pdf))

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTR). Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Update. Atlanta GA. U.S. Department of Health and Human Service. Public Health Service 2002: 497 p. (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=81&tid=20>)

Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Crit Rev Biotechnol* 2011; 31(3): 227-49

Albert L, Loera Gallardo R. Química y ecotoxicología de los insecticidas. En Botello J, Von Osten R, Gold Bouchot G. y Agraz C. (eds.), Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias, Campeche y México: Universidad Autónoma de Campeche-Universidad Nacional Autónoma de México. 2005; pp. 177-190. (<http://ru.iiec.unam.mx/65/1/CalidadAguaImpr.pdf>).

Asha KK, Mathe Suseela, Lakshmanan PT. Flavonoids and phenolic compounds in two mangrove species and their antioxidant property. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 2012; 41(3), 259-264.

Barcelo J, Poschenrieder C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 2002: 48(1): 75-92(18)

Botello A V, Villanueva S, Ponce G. La contaminación de las costas mexicanas en: Calidad del agua: un enfoque multidisciplinario / coord. Alonso Aguilar Ibarra.



México: UNAM, *Instituto de Investigaciones Económicas* 2010. 308 p. ISBN 978-607-02-1455-4. (<http://ru.iiec.unam.mx/65/1/CalidadAqualmpr.pdf>)

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiency. *Meth. Enzymol* 1990: 186-343.

Brink NWVD, De Rooter-Dijkman EM, Broekhuizen S, Reijnders PJH, & Bosveld ATC. Polychlorinated biphenyls pattern analysis: potential non-destructive biomarker in vertebrates for exposure to cytochrome P450-inducing organochlorins. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000: 19: 575-581.

Carvalho FP, Fowler SW, González-Farías F, Mee LD y Readman JW. (Agrochemical residues in Altata-Ensenada del Pabellón Coastal Lagoon (Sinaloa, México): A need for integrated coastal zone management. *International Journal of Environmental Health Research* 1996; 6(3): 209-220.

Carvalho, FP, González-Farías F, Villeneuve JP, Cattini C, Hernández-Garza M, Mee LD, *et al.* Distribution, fate and effects of pesticide residues in tropical coastal lagoons of northwestern Mexico. *Environmental Technology* 2002; 23(11): 1257-1270.

Carvalho Fernando P, Villeneuve Jean-Pierre, Cattini C, Rendón Jaime, De Oliveira J. Mota. "Pesticide and PCB residues in the aquatic ecosystems of Laguna de Términos, a protected area of the coast of Campeche, Mexico". *Chemosphere* 2009; 74(7): 988-995.

Canadian Council of Minister of the Environment (CCME). Canadian sediment quality guideines for the protection of aquatic life. 2002. <http://documents.ccme.ca/en/index.html>. Accessed 03 Jun 2013.

CNA. Determinación de la disponibilidad de agua en el acuífero Río Sinaloa, Estado de Sinaloa. 2002. Consultada en enero del 2008 en ([www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/DR2502.pdf](http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/DR2502.pdf)).

Comisión Nacional del Agua (CNA). Estadísticas agrícolas de los distritos de riego. Año agrícola 1999-2000: México, D.F., Subdirección General de Operación, Gerencia de Distritos y Unidades de Riego, Informe Estadístico 2, 2001b, 338 pp.

CONAGUA. Evaluación de resultados del programa de Rehabilitación y Modernización de Distritos de Riego del ejercicio fiscal 2006, sujetos a reglas de operación a cargo de la comisión nacional del agua. "Distrito de riego 063, Guasave, Sinaloa. SEMARNAT 2007: 26.p.

Comisión para la Cooperación Ambiental, Compilación y clasificación de información inédita sobre sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables en México. 2007. Pp. 52. Consultada en Septiembre de 2015 en [http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/cnc/5/03\\_pni\\_mexico\\_sep\\_12\\_07.pdf](http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/cnc/5/03_pni_mexico_sep_12_07.pdf)

Díaz-González G, Botello AV. y Ponce-Vélez G. Plaguicidas organoclorados en pastos y peces de los sistemas Candelaria-Panlau y Palizada de Este, Laguna de Términos, Campeche, México, P. 207-224. En: A.V. Botelo, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón.de Campeche, Univ. Nal. Autón, de México, *Instituto Nacional de Ecología* 2005: 696 p.

Duce. The input of atmospheric chemicals to the ocean. *WMO Bull.* 1998; 47(1):51-60.

Environmental Protection Agency (EPA). METHOD 3660B SULFUR CLEANUP 1996. <http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3660b.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). METHOD 3600C CLEANUP. 1996. <http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3600c.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). METHOD 8081B ORGANOCHLORINE PESTICIDES BY GAS CHROMATOGRAPHY. 2007. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8081b.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). METHOD 3550C. ULTRASONIC EXTRACTION. 2007. <http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). METHOD 3500C ORGANIC EXTRACTION AND SAMPLE PREPARATION. 2007. <http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3500c.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). Method 8270d. Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms). 2014. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). Method 508. Determination of chlorinated pesticides in water by gas chromatography with an electron capture detector. 2014. [http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007\\_11\\_06\\_methods\\_method\\_508.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007_11_06_methods_method_508.pdf)

El-Seedi HR, El-Said A M, Khalifa SA, Göransson U, Bohlin L, Borg-Karlson A K. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem* 2012; 60:10877–10895.

Escobedo-Urías D. Tesis de Doctorado: Diagnostico y descripción del proceso de eutrofización en las lagunas costeras del norte de Sinaloa. CICIMAR-IPN. 2010.

Martínez FS, González GJ, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutrición Hospitalaria* 2002; 17(6): 271-278.

González-Farías F, Cisneros X, Fuentes C, Díaz G. y Botello AV. Pesticides distribution in sediments of a tropical coastal lagoon adjacent to an irrigation district in northwest Mexico. *Environ Technology* 2002; 23(11):1247-56.

González-Farías F, Hernández-Garza MR, y Díaz-González G. Organic carbón and pesticide pollution in tropical coastal lagoon-estuarine system in northwest Mexico. *International Journal of Environment and pollution* 2006; 26(1/2/3): 234-253.

González-Mangadoa N, Morera Prats J. Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *ArchBronconeumol* 2001; 37: 407–410.

Hernández-Cornejo R, Koedam N, Ruíz, A, Troell, M., & Dahdouh-Guebas F. Remote sensing and ethnobotanical assessment of the mangrove forest changes in the Navachiste-San Ignacio-Macapule lagoon complex, Sinaloa, Mexico. *Ecology and Society* 2005; 10(1): 16. [Online] URL: <http://www.ecologyandsociety.org/vol10/iss1/art16/>.

Huang Wu-Yang, Cai Yi-Zhong Zhang Yanbo. Natural Phenolic Compounds from Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. Potential Use for Cancer Prevention, *Nutrition and Cancer* 2009; 62(1): 1-20.

Instituto Nacional de Estadística Geográfica e informática (INEGI). Cuaderno estadístico municipal de Guasave, Sinaloa. Gobierno del Estado de Sinaloa, Culiacán Rosales, México (2000). Obtenida en junio del 2008 en <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/aee05/estatal/sin/index.htm>

Ioana Ignat, Irina Volf, Valentin I. Popa.. Review: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 2011; 126 (4): 1821–1835.

Jiménez, B. La contaminación ambiental en México, México, Limusa. (2001).

Jithesh M. N., Prashanth S. R., Sivaprakash K. R., Parida Ajay. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. By mRNA analysis. *Plant Cell Reports* 2006; 25 (8): 865-876.

Miller JK., Brzezinska-Slebodzinska E. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function, *Journal of Dairy Science* 1993; 76 (9): 2812-2823

Jung Ch, Maeder V, Funk F, Frey B, Sticher H, Frosserd E. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil* 2003: 252-301.

Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 2002; 59(1): 23–32.

Loo AY, Jaina K, Darahb I. Antioxidant and radical scavenging activities of the pyroligneous acid from a mangrove plant, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry* 2007; 104(1): 300-3007.

Lyle-Fritch PL, Romero Beltrn E, Bect Valdez JA. Development and characteristics of shrimp forms in sinaloae. In: PezOsuna F, (ed) Shrimp aquaculture and the environment. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, México City, 2001: pp 350– 369.

Michalk A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. of Environ. Stud* 2006: 15(4): 523-530.

Mingzhe Gao and Hongbin Xiao. Activity-Guided Isolation of Antioxidant Compounds from *Rhizophora apiculata*. *Molecules* 2012; 17: 10675-10682; doi: 10.3390/molecules170910675.

Mldadul Haq, Wirakarnain Sani, A. B., Hossain M.S, Mat Taha R. and Monneruzzaman K.M. Total phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Bruguiera gymnorrhiza*. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(17): 4112-4118.

Montes A.M., Gonzalez-Farias F.A., Botello A.V. Pollution by organochlorine pesticides in Navachiste-Macapule, Sinaloa, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment* 2011; 184: 1359-69.

Moore JP, Westall KL, Ravenscroft N, Farrant JM, Lindsey GG, Brandt WF. The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus*

flabellifolius, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochem J.* 2005; 385(1): 301-8.

NOAA (2004). National Oceanic and Atmospheric Administrations. Screening Reference Tables. [www.noaa.gov](http://www.noaa.gov). Accesado 3 junio 2015.

Orduña-Rojas J., Longoria-Espinoza R.M. Metal Content in *Ulva lactuca* (Linnaeus) from Navachiste Bay (Southeast Gulf of California) Sinaloa, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006: 77: 574-580.

Osuna-Flores I. y Riva MC. Organocchlorine pesticide residue concentrations in shrips, sediments, and surface water from bay Ohuira, Topolobampo, Sinaloa, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2002; 68(4): 532-539.

Páez-Osuna F, Ruiz-Fernández AC, Botello AB, Ponce-Vélez G. Osuna-López I, Farías-Espericueta MG *et al.* Concentration of selected trace metals (Cu, Pb y ZN), organochlorines (PCBs, HCB) and total PHAs in mangrove oysters from the Pacific coast of Mexico: An overview. *Marine Pollution Bulletin* 2002; 44: 1296-1313.

Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res.* 1998; 18(2): 1995–2018.

Plan nacional de implementación del convenio de Estocolmo (PNICE). DIAGNÓSTICO DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES Y DE LAS CAPACIDADES PARA SU GESTIÓN EN MÉXICO. 2007. Pp. 221.

[http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/cnc/5/03\\_pni\\_mexico\\_sep\\_12\\_07.pdf](http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/cnc/5/03_pni_mexico_sep_12_07.pdf)

Rendón-von Osten J, Alpuche Gual L, Memije M. Distribución espacio temporal de plaguicidas organoclorados en sedimentos de la laguna de Términos, Campeche, Camp. Resúmenes del VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar.2000. p 24.

Rendón-von Osten J, Memije Canepa, Ek Moo NA. Plaguicidas orgánicos persistentes (POPs) en sedimentos de la costa sur de Campeche, México, p. 249-260. En: A.V. Botelo, J. Rendón-Von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón.de Campeche, Univ. Nal. Autón, de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

Sánchez J, Melchor G, Martínez G, Escobar A, Faure R. Antioxidant activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia* 2006; 77: 1411-143.

Scalbert A, Manach C, Morand C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005; 45: 297-306.

Schmidt-Van Dorp, A.D., *Protection of the North Sea Ecosystem Water Science and Technology* 1991; 24(10):339-340.

Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Consideraciones preliminares para el mejoramiento de la producción en el Distrito de Riego 063 – Guasave, Sinaloa: México, SARH, Dirección General de Distritos y Unidades de Riego, 1982: 68 pp.

Shi C, Xu MJ, Bayer M, Deng ZW, Kubbutat MH, Wätjen W, Proksch P, Lin WH. Phenolic compounds and their anti-oxidative properties and protein kinase inhibition from the Chinese mangrove plant *Laguncularia racemosa*. *Phytochemistry* 2010; 71(8-9):1025

Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* 2007; 30: 3268–3295

Sung-Suk Suh, Jinik Hwang, Mirye Park, Heung-Sik Park, Taek-Kyun Lee. Phenol content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mangrove plants in Micronesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2014: 531-535.

Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002; 5: 218.