

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



"COMPONENTES QUIMICOS DE ALGAS DEL
ESTADO DE TAMAULIPAS Y SU APLICACION
FARMACOLOGICA"

POR

MA. AZUCENA ORANDAY CARDENAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA BIOMEDICA

SEPTIEMBRE DE 1998

TD
QK565
07
c.1



1080080871

11170

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



"COMPONENTES QUIMICOS DE ALGAS DEL
ESTADO DE TAMAILIFAS Y SU APLICACION
FARMACOLOGICA"

POR

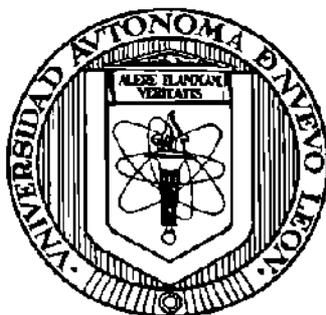
MA. AZUCENA ORANDAY CARDENAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA BIOMEDICA

SEPTIEMBRE DE 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**"COMPONENTES QUIMICOS DE ALGAS DEL ESTADO DE
TAMAULIPAS Y SU APLICACION FARMACOLOGICA"**

Por

MA. AZUCENA ORANDAY CARDENAS

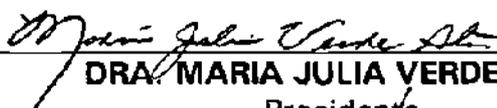
Como requisito parcial para obtener el Grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**
con especialidad en Química Biomédica.

Septiembre, 1998

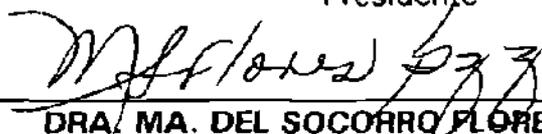


**ESTUDIOS DE LOS COMPONENTES QUIMICOS DE ALGAS MARINAS DEL
ESTADO DE TAMAULIPAS Y SU APLICACIÓN FARMACOLOGICA**

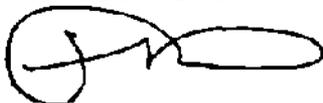
Aprobación de la Tesis:



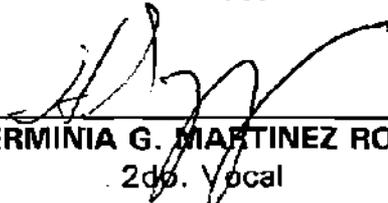
DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
Presidente



DRA. MA. DEL SOCORRO FLORES GONZALEZ
Secretario



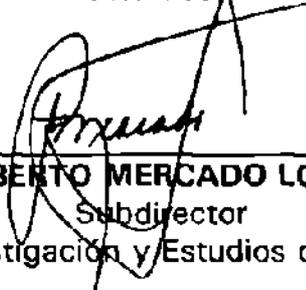
DR. LUIS J. GALAN WONG
1er. Vocal



DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
2do. Vocal



DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
De Investigación y Estudios de Posgrado

Dedico esta tesis:

Con amor, a mi esposo Ing. Félix A. Barrera Canales quien siempre me ha animado y brindado todo el apoyo necesario para la culminación de mis objetivos. Gracias por estos felices años que hemos caminado juntos.

Con todo cariño a mis hijos Félix Amador, Jesús y Ernesto Alexis, inspiración y orgullo de mi vida, gracias por su comprensión, palabras de apoyo y regaño que siempre me han dado.

A mi hermano Jesús y mis sobrinos Jesús y Adi, con mucho cariño, por ser parte muy importante de mi vida y por brindarme palabras de aliento en mis estudios.

A mis padres políticos Félix y Genoveva, por su ejemplo y apoyo moral.

A la Dra. Ma. Julia Verde Star por la confianza y apoyo que a través del tiempo me ha brindado, por el ejemplo de superación que ha sido para mi, pero sobre todo por haberme dado el regalo mas preciado para el ser humano: la Amistad.

A la Dra. Noemi Waksman de Torres con mi admiración por sus conocimientos, por haber confiado en mi al aceptarme en el programa de Doctorado y porque en todo este tiempo supe que podía contar con su apoyo y amistad. Muchas gracias.

A mi compañera de afanes y gran amiga Catalina Rivas Morales quien siempre tiene una palabra adecuada para impulsarme a seguir adelante.

A la memoria del Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla, por sus enseñanzas y por abrirme las puertas de su Laboratorio con toda la amabilidad que le caracterizaba

A todos mis Maestros, que en el correr del tiempo me han dado su sabiduría y ejemplo.

A todos mis amigos y compañeros.

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Ma. Julia Verde Star por el apoyo incondicional que me brindó para llevar a cabo la elaboración de este trabajo en el Laboratorio de Fitoquímica.

A la Dra. Noemi Waksman de Torres por todas las enseñanzas que recibí en este tiempo que transcurrieron mis estudios y las facilidades que me brindó para los espectros de RMN.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por haberme siempre animado a la terminación de este proyecto y por las sugerencias en el presente escrito.

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas, por preocuparse por la superación de los maestros y por el apoyo que me brindó para llevar a cabo la realización de esta meta.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez por ser un ejemplo como Maestra y por las observaciones en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Myrthala Moreno por la atención que siempre me brindó durante mis estudios y aceptar ser parte de la comisión de tesis.

A la Dra. Ma. del Socorro Flores de Castañeda por haber aceptado amablemente ser parte de mi jurado de disertación doctoral.

A CONACYT, mi agradecimiento sincero por el apoyo brindado con la beca No. 85659 otorgada para mis estudios y el Proyecto Ref. 4041-P.B para la realización de mi tesis.

A la Dra. Leticia Villarreal Rivera por el apoyo brindado en la colecta de algas y en la clasificación botánica de las especies en estudio.

Al personal del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL por su cooperación en el desarrollo de este trabajo y en particular al Sr. Carlos Paz por la ayuda que me brindó.

A los integrantes del Departamento de Farmacología por la amistad que me brindaron a través del tiempo que duró esta etapa.

Al M. C. Adolfo Caballero y la M. C. Verónica Rivas por su paciencia y atención para realizar los espectros de RMN.

Al Dr. Luis Enrique Elizalde del Centro de Investigación de Química Aplicada de Saltillo por realizar con la mejor disposición los espectros de Espectro de Masas.

Al Dr. Ramiro Quintanilla Licea, por su apoyo para la realización de los espectros de Infrarrojo llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Al personal de la Subdirección de Postgrado de la Facultad de Medicina U.A.N.L. por las atenciones que me prestaron en los tramites ahí realizados.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1. 1 Antecedentes	3
1.1.1 Phaeophytas	4
1.1.2 Rodophytas	6
1.1.3 Chlorophytas	9
1.1.4 Acidos grasos	11
Hipótesis y objetivos.	15
2. MATERIAL Y METODOS	
2.1 Material vegetal, clasificación y descripción botánica	
2.1.1 <i>Sargassum fluitans</i>	16
2.1.2 <i>Ulva fasciata</i>	18
2.1.3 <i>Gracilaria foliifera</i>	20
2.1.4 <i>Ulva lactuca</i>	22
2.2 Extracción del material vegetal	
2.2.1 Lixiviación en columna	24
2.2.2 Maceración a temperatura ambiente	24
2.2.3 Extracción continua en Soxhlet	24
2.3 Separación de fracciones	
2.3.1 Cromatografía Planar	25
2.3.1.1 Preparación de placas	25
2.3.1.2 Agentes cromogénicos	25
2.3.2 Cromatografía en columna	26
2.3.2.1 Preparación de la columna	26
2.3.2.2 Gel de Sílice	26
2.3.2.3 Aplicación de la muestra	26

2.3.2.4 Eludón en gradiente	27
2.3.3 Cromatografía en columna seca "invertida"	27
2.4 Cristalización	28
2.5 Métodos físicos	28
2.6 Métodos espectroscópicos	28
2.7 Evaluación microbiológica	29
2.7.1 Microorganismos utilizados	29
2.7.2 Estrategia para la evaluación de actividad antimicrobiana	29
2.7.3 Curva de actividad de Ampicilina	30

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Pruebas preliminares para elegir tipo de extracción	31
3.1.1 Preparación de extractos	31
3.1.2 Evaluación de la actividad microbiana	31
3.1.2.1 Activación y viabilidad de cepas	31
3.1.2.2 Ensayo de actividad de extractos	32
3.2 <i>Sargassum fluitans</i>	
3.2.1 Preparación de los extractos	33
3.2.2 Evaluación de los extractos obtenidos	33
3.2.3 Extracto Sf 1.1	
3.2.3.1 Separación cromatográfica	35
3.2.3.2 Evaluación microbiológica	35
3.2.3.3 Fracción Sf 1.1 f 6	37
3.2.3.4 Fracción Sf 1.1 f 12	37
3.2.3.5 Fracción S f 1.1 f 15	37
3.2.4 Extracto Sf 2.4	
3.2.4.1 Separación cromatográfica	37
3.2.4.2 Evaluación microbiológica	38
3.2.4.3 Fracción Sf 2.4 f 11	38
3.3 <i>Ulva fasciata</i>	
3.3.1 Preparación de extractos	39
3.3.2 Evaluación de actividad antimicrobiana	39

3.4 <i>Gracilaria foliifera</i> o <i>tikvahiae</i>	
3.4.1 Preparación de extractos	41
3.4.2. Evaluación de actividad antimicrobiana	41
3.4.3. Extracto Gf 1.26	
3.4.3.1 Separación cromatográfica	41
3.4.3.2 Evaluación microbiológica de las fracciones obtenidas	43
3.4.3.3 Fracción Gf 1.26 f 4	43
3.4.3.4 Fracción Gf 1.26 f 8	43
3.4.4 Extracto Gf 3.29	43
3.4.5 Extracto Gf 4.30	45
3.4.5.1 Fracción Gf 4.30 f 37	45
3.5 <i>Ulva lactuca</i>	
3.5.1 Preparación de extractos	46
3.5.2 Evaluación microbiológica	46

4 RESULTADOS

4.1 Pruebas preliminares para elegir tipo de extracción	48
<i>Sargassum fluitans</i>	
4.2 Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos	49
4.3 Separación y evaluación de los extractos activos	49
4.3.1 Extracto Sf1.1	49
4.3.1.1 Fracción Sf 1.1 f 6 Compuesto " I "	50
4.3.1.2 Fracción Sf 1.1f 12 Compuesto " A "	55
4.3.1.3 Fracción Sf 1.1. f 15 Compuesto " D "	65
4.3.2 Extracto Sf 2.4	65
4.3.2.1 Fracción Sf 2.4 f 11 Compuesto " K "	73
<i>Ulva Fasciata</i>	
4.4 Evaluación de los extractos obtenidos	74
<i>Gracilaria foliifera</i>	
4.5 Separación y evaluación de los extractos obtenidos	75
4.5.1. Separación y evaluación de los extractos activos	75

4.5.1.1 Fracción Gf 1.26 f 4 Compuesto " J "	76
4.5.1.2 Fracción Gf 1.26 f 8 Compuesto " G "	76
4.5.2 Extracto Gf 3.29	79
4.5.3.Extracto Gf 4.30	85
4.5.3.1.Fracción Gf 4.30 f 37 Compuesto " C "	85
<i>Ulva lactuca</i>	
4.6 Evaluación antimicrobiana de extractos	89
5 DISCUSION	90
6 CONCLUSIONES	102
7 RECOMENDACIONES	103
8 REFERENCIAS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Alga : <i>Sargassum fluitans</i>	17
2	Alga : <i>Ulva fasciata</i>	19
3	Alga : <i>Gracilaria foliifera</i>	21
4	Alga : <i>Ulva lactuca</i>	23
5	Curva de Ampicilina	30
6	Obtención de extractos de <i>S. fluitans</i>	34
7	Separación de fracciones de <i>S. fluitans</i>	36
8	Obtención de extractos de <i>Ulva fasciata</i>	40
9	Obtención de extractos de <i>Gracilaria foliifera</i> .	42
10	Separación de fracciones de <i>G. foliifera</i> .	44
11	Obtención de extractos de <i>Ulva lactuca</i> .	48
12 ^a	Espectro de masas del compuesto I	51
12	Espectro ¹ H RMN del compuesto I	52
13	Espectro ¹³ C RMN del compuesto I	53
14	Espectro IR del compuesto I	54
15	Espectro de masas del compuesto A	56
16	Espectro ¹ H RMN del compuesto A	57
17	Espectro ¹³ C RMN del compuesto A	58
18	Espectro HETCOR del compuesto A	59
19	Espectro DEPT 135° del compuesto A	61
20	Espectro DEPT 90° del compuesto A	62

21	Espectro DEPT 45° del compuesto A	63
22	Espectro COSY del compuesto A	64
23	Espectro ¹ H RMN del compuesto D	66
24	Espectro de masas del compuesto K	67
25	Espectro ¹ H RMN del compuesto K	68
26	Espectro ¹³ C RMN del compuesto K	69
27	Espectro COSY del compuesto K	70
28	Espectro IR del compuesto K	72
29	Espectro ¹ H RMN del compuesto J	77
30	Espectro ¹³ C RMN del compuesto J	78
31	Espectro IR del compuesto G	80
32	Espectro de masas del compuesto G	81
33	Espectro ¹ H RMN del compuesto G	82
34	Espectro COSY del compuesto G	83
35	Espectro ¹³ C RMN del compuesto G	84
36	Espectro IR del compuesto C	86
37	Espectro ¹ H del compuesto C	87
38	Espectro COSY del compuesto C	88

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Resultados comparativos de los halos de inhibición de extractos obtenidos con extracción en soxhlet y maceración.	48
2	Resultados de la evaluación de los extractos de <i>Sargassum fluitans</i>	49
3	Evaluación microbiológica de las fracciones del extracto etéreo y clorofórmico de <i>S. fluitans</i> .	50
5	Actividad de extractos obtenidos de <i>Ulva fasciata</i> .	74
6	Actividad antimicrobiana de extractos de <i>Gracilaria foliifera</i>	75
7	Actividad inhibitoria de fracciones de extractos de <i>G. foliifera</i>	76
8	Actividad inhibitoria de extractos de <i>Ulva lactuca</i>	89

ABREVIATURAS

A	Acetona
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
cols.	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono trece
Clf	Cloroformo
DEPT	Distorsionless Enhancement Polarization transfer
EM	Espectro de masas
EP	Eter de petróleo
EtOH	Etanol
Ex	Extracto
HETCOR	Heterogeneous Correlation
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
m/z	Relación masa-carga
MHZ	Megahertz
MIC	Concentración Mínima inhibitoria
ppm	Partes por millón
Rf	Razón de velocidad de flujo de la muestra con respecto al eluyente
UFC	Unidades formadoras de colonias
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
µL	Microlitro

Claves para nombrar los extractos y fracciones

Sf	l	l	f	l
Especie	Solvente	No. de Ex	Fracción	No. de fracción

Especies

Sf	<i>Sargassum fluitans</i>
Uf	<i>Ulva fasciata</i>
Gf	<i>Gracilaria foliifera</i>
Ul	<i>Ulva lactuca</i>

Solventes

1	Eter de petróleo
2	Cloroformo
3	Acetona
4	Etanol
5	Metanol
6	Agua

**“COMPONENTES QUIMICOS DE ALGAS DEL ESTADO DE TAMAULIPAS Y
SU APLICACION FARMACOLOGICA”**

Este trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

RESUMEN

Ma. Azucena Oranday Cárdenas

Fecha de obtención del grado: Septiembre 1998

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León

Título del estudio: **COMPONENTES QUÍMICOS DE ALGAS DEL ESTADO DE TAMAULIPAS Y SU APLICACIÓN FARMACOLÓGICA.**

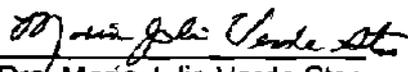
Candidato al grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.

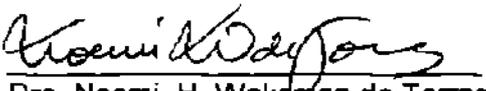
Área de estudio: Química Biomédica

Propósito y método de estudio: Las algas marinas constituyen una fuente rica y variada de compuestos con actividad biológica y el objetivo del presente trabajo fue obtener compuestos con actividad antimicrobiana de cuatro especies y determinar su estructura química. Las algas *Sargassum fluitans*, *Ulva fasciata*, *Ulva lactuca* y *Gracilaria foliifera*, se colectaron en las costas de Tamaulipas Mex., se obtuvieron de ellas, extractos con solventes de polaridad creciente que se probaron contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa* por el método de difusión. Los extractos activos fueron separados por cromatografía en columna y cromatografía invertida y evaluada su actividad contra *C. albicans* y *S. aureus*, las fracciones con actividad relevante fueron purificadas y determinada su estructura por métodos espectroscópicos.

Contribuciones y Conclusiones: Los extractos de las algas elegidas mostraron actividad antimicrobiana relevante contra los microorganismos estudiados, presentaron mayor índice de inhibición los de *Sargassum fluitans* y *Gracilaria foliifera* y el compuesto que presentó mayor actividad antibiótica contra *C. albicans* con un MIC de 0.16 mg/mL fue obtenido del extracto éter de petróleo de *S. fluitans* y su estructura correspondió al ÉSTER ETÍLICO DEL ÁCIDO 6 METIL HEPTADECANOICO, el cual no ha sido reportado en la literatura.

Con el método de cromatografía invertida se logró separar e identificar compuestos activos utilizando el 10 % de la cantidad de reactivos usados en cromatografía en columna.


Dra. María Julia Verde Star
Asesora Doctoral


Dra. Noemi H. Waksman de Torres
Coasesora

1.- INTRODUCCION

El mundo natural ha sido el origen de la mayor parte de los agentes medicinales y las plantas constituyen una parte importante de esas fuentes, su utilización para aliviar las enfermedades ha sido una preocupación para el ser humano desde sus principios y en todos los espacios y tiempos existen registros de esta inquietud. Hoy las plantas continúan teniendo significancia histórica y una importante fuente de nuevos compuestos, los metabolitos secundarios biológicamente activos (principalmente toxinas) derivados de las plantas, han encontrado aplicación medicinal, directamente como drogas o han servido de modelos para sintetizar o semisintetizar compuestos o bien se han modificado sus estructuras preparando análogos para optimizarlos (1).

Las algas forman un grupo de plantas variado y multifacético, figuran entre los seres vivos más antiguos del planeta, ya que provienen del período Precámbrico es decir tienen de 1 a 3 millones de años de antigüedad; existen entre 20,000 a 30,000 especies con cuatro divisiones: Chlorophytas (algas verdes) precursoras de las algas terrestres, Rodophytas (algas rojas), Phaeophytas (algas café) y Cyanophytas (algas verde- azul). (2)

La utilización de las algas marinas se ha incrementado en años recientes, gran cantidad de compuestos extraídos de ellas han sido desarrollados y aplicados en muchos campos : en agricultura como fertilizantes, en la industria alimenticia como espesantes para cremas y nieve, en la fabricación de cosméticos, en la remoción de metales de aguas residuales y en la obtención de ficocolides como agar y alginatos, productos extraídos de algas sobre todo Rodophytas (3).

En los últimos tiempos se ha visto la posibilidad de aprovechar no solo las algas sino otros organismos marinos, de ellos se han aislado aproximadamente 4,000 productos naturales nuevos y muchos de esos compuestos poseen actividad biológica; estos metabolitos secundarios producidos por organismos que viven en el mar, han recibido atención de químicos y

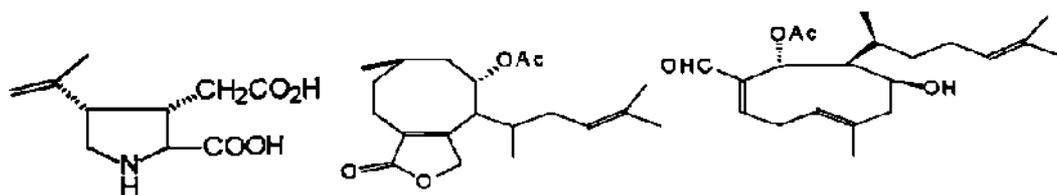
farmacólogos durante las últimas dos décadas, interés por parte de los químicos por ser origen de nuevas y singulares moléculas y por otro lado los farmacólogos se han enfocado en la búsqueda de sustancias que combatan a los microorganismos patógenos para el hombre, ya que aunque en la actualidad el número de compuestos antimicrobianos es elevado, también lo es la resistencia que presentan los microorganismos que son atacados con terapias convencionales, particularmente los que afectan a pacientes inmunodeprimidos (4,5), por lo que es importante la investigación continua de compuestos con esta actividad.

La búsqueda de productos naturales con actividad biológica, depende en gran parte del aislamiento y purificación de los metabolitos; nuevos métodos de Espectroscopía, Fitoquímica, Farmacología y materias afines han hecho importantes contribuciones a esta búsqueda, a pesar de estos avances, muchas preparaciones simples están basadas en tecnologías del siglo XIX , por ejemplo la comúnmente usada extracción en Soxhlet fue desarrollada hace 100 años (6). Se espera que en el futuro el proceso de nuevos descubrimientos de drogas pueda ser facilitado y hecho mas eficientemente usando nuevos métodos automatizados en los que se requiera mínima cantidad de muestra y de solventes para llevar a cabo investigaciones masivas.

En México se han realizado estudios de las algas como productoras de ficocoloides cuya industrialización representa un rubro económico importante (2), también se tienen reportes de su actividad antibiótica (24,25) y aunque nuestro país con 10,000 Kms de costas es rico en este recurso su estudio se ha circunscrito principalmente al aspecto florístico y taxonómico.

1.1 ANTECEDENTES

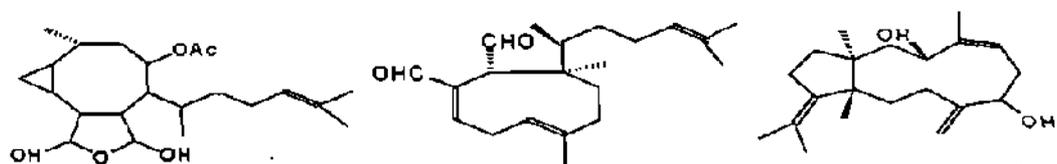
La utilización de las algas con propósitos medicinales no es nueva. Shen Xaung, 2,700 años A.C y Dioscórides en su obra "De materia Médica" escrita en el año 77 A.C., hacen mención de su uso en la medicina de las primeras civilizaciones y su importancia durante esas épocas (6). La *Digenea simplex*, se ha utilizado desde hace un milenio como antihelmíntico y en 1953 Murakami y colaboradores (7) aislaron su principio activo, el Acido kaínico, elucidando su estructura (No. 1), este es un producto que actualmente se distribuye en la industria Farmacéutica Suiza y Japonesa.



No. 1

No. 2

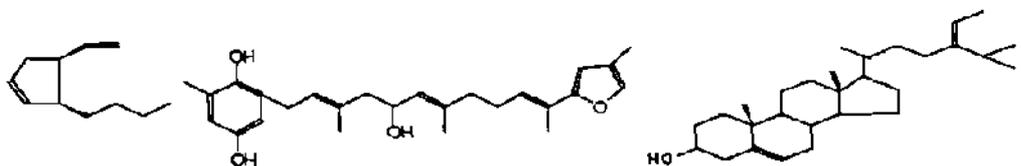
No. 3



No. 4

No. 5

No. 6



No. 7

No. 8

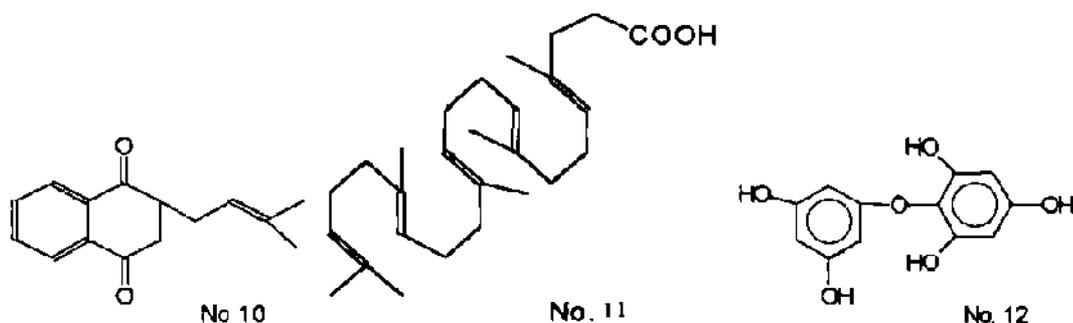
No. 9

En las cuatro divisiones de algas que se mencionaron, se han reportado una gran cantidad de especies que poseen actividad biológica muy variada, en este trabajo se eligieron para su estudio dos chlorophytas, una rodophyta y una phaeophyta y a continuación se mencionan algunos de los antecedentes que se han encontrado sobre ellas.

1.1.1 Phaeophytas

Las Phaeophytas o algas pardas son productoras de metabolitos secundarios biológicamente activos, los géneros *Dyctiota* y *Dilophus* son considerados prolíficos en este tipo de compuestos; de *Dilophus ligulatos* (8) se aislaron diterpenos (No 2 y No. 3) con actividad citotóxica; de este género Tringali (9) aisló el Crenuladiol (No. 4) compuesto con actividad antimicrobiana; de *Dyctiota divaricata* se obtuvo el dictyodial, (No. 5) substancia que posee actividad antimicrobiana y antifúngica (10); de *D. pardalis* König (11) obtuvo el Dolabellano (No. 6), con actividad antimalarial en cepas resistentes a Cloroquina y de *Dictyota dichotoma*, aisló diterpenos con el esqueleto dolabellano, que poseen actividad contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, de la *Dictyopteris prolifera* se aisló un vinil ciclopentano (No. 7) con actividad biológica (12). El extracto crudo lipofílico de *Cystoseira spinosa* (13) exhibe propiedades antibacterianas que son asociadas con la presencia de derivados de tetrafeniltoluquinol de los compuestos aislados, el que presentó mayor acción fue el 5-hidroxicistofuranoquinol (No. 8); de este mismo género pero de las especies *C.barbata* y *C.crinita* se aislaron hidrocarburos halogenados como el 1-cloro-2 bromoetano, bromoetanol, hexaclorobutadieno etc con actividad fungicida y antibacteriana, además del fucoesterol (No.9) compuesto altamente distribuido en este género (14).

Compuestos aromáticos como los Florotaninos aislados de *C. granulata* han comprobado tener acción antibiótica (15). Otros compuestos aromáticos como el deoxilapachol (No. 10) presentan actividad citotóxica, al igual que el ácido turbinárico (No.11) de la familia *Sargassaceae* . El género *Sargassum* de esta familia ha sido origen de un gran número de metabolitos bioactivos, se han encontrado compuestos antioxidantes (No 12), útiles tanto en la industria



alimenticia como en la de cosméticos (16); de *Sargassum natans*, Martínez Nadal (17) identificó el compuesto Sargarina con propiedades antibióticas; García (18) en 1995 de esta especie encontró extractos con actividad antibacteriana y fungicida; *S. Cinctum* presentó acción fungicida (19); de *S. polyceratum* Levring (20) obtuvo sustancias antibióticas y de *S. Tenemimum* con acción fungicida (21); *S. thunbergii* se utiliza en Japón como antitumoral (22); de *S. tortile* , Faulkner extrajo el tocotrienol y su correspondiente epóxido (23); De Lara encontró actividad en los extractos acuosos y etanólicos de *Sargassum* sp, contra *S. aureus* (24) y contra *E. coli* y *Micrococcus lisodeikticus* (25) *Sargassum palmeri*, y *S. acinacifolium*; en *Sargassum muticum*, se encontraron glucoronofucogalactanos, derivados de fucanos con propiedades anticoagulantes (26).

Estos reportes nos indican la importancia de la actividad biológica del género *Sargassum*, que además es muy abundante en el mar y en las costas

del estado de Tamaulipas donde se llevó a cabo la recolección por lo que se eligió, *S. fluitans* en este trabajo.

1.1.2. Rhodophytas,

Las Rhodophytas, han sido estudiadas extensamente y varias especies son reportadas por su uso en medicina folklórica (1,27). Las investigaciones fitoquímicas de algas rojas han dado como resultado la identificación de metabolitos predominantemente halogenados, principalmente terpenoides, acetogeninas y aromáticos, aunque también son reportados como fuentes de derivados de ácido eicosanoico.

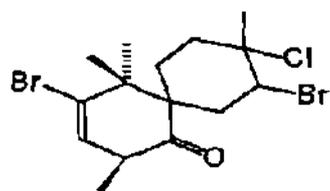
Del género *Laurencia* de las algas rojas se han aislado un sinnúmero de metabolitos halogenados, Selover y cols. (28) de *L. pacifica* obtuvieron Kylinone (No.13) de *L. glandulifera* Suzuki (29) obtuvo un sesquiterpeno halogenado con el mismo spiro-esqueleto (No 14) y de *L. nidifica* Shizyuri y Cols.(30) el sesquiterperpeno Laurequinina (No.15), de esta misma especie, Waraskiewies (31) aisló un compuesto (No.16) que presentó actividad contra *S. aureus* y *Mycobacterium smegmatis*; compuestos semejantes fueron extraídos de *L. Johnstonii*, Johnstonol por Sims y Fenical (32) (33) y en el mismo género *Laurencia*, Rhodophytin (No.17) y Oppositol (No.18), que mostraron moderada actividad contra *S. aureus* (34); además del género *Laurencia*, Mc.Conell (35) estudió el *Ochtodes* y encontró pequeñas cantidades de monoterpenos cíclicos halogenados, como el Octodeno (No.19); en *Chondria oppositoclada* (36) se encontró Cicloeudesmol (No.20) con fuerte poder antibiótico contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y en *Dasya pedicellata* el p-Hidroxibenzaldehído, el cual mostró actividad contra *Vibrio anguillarum*, *C. albicans* y *S. aureus* (37).

Siudas y colaboradores aislaron de *Bonnemaisonia hamifera* (38) compuestos con Yodo y Bromo como el 1-Yodo-3,3-dibromo-2-heptanona y el 1,1,3,3-tetrabromo-2-heptanona que muestran actividad contra el hongo *Monosporium apiospermum* y contra *S. piogenes* y *D. pneumoniae*. El primer alcaloide indólico obtenido de una planta eucariótica marina lo reportaron Kirkup y Moore (39) en *Martensia fragilis*, una Rodophyta

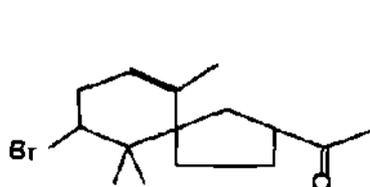
El género *Plocamium* ha sido fuente de monoterpenos halogenados, con actividad biológica; Phillip Crews y cols. obtuvieron de *P. violaceum* (40) varios compuestos polihalogenados (Nos 21 y 22), de *P. oregonum* (41) uno ciclico (No. 23) y de *P. cartilagineum* (42) además de otros monoterpenos una cetona halogenada (No.24); de esta misma especie Rovirosa J. en 1991 (43), extrajo un nuevo monoterpeno halogenado (No 25) que mostró actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* y *S. aureus*.

Las especies del género *Gracilaria* han sido utilizadas por los ficocoloides que contienen, además de sus metabolitos secundarios muchos de los cuales mostraron actividad biológica; de *Gracilaria coronipifolia* Nagai H. y cols. (44) aislaron la Aplysiatoxina y Debromoaplysiatoxina; *G. dominguensis* colectada en Cuba posee un agar tipo polisacárido, altamente sulfatado que tiene efecto antitumoral (45); de *G. lichenoides* (46) se obtuvieron eicosanoides con potente actividad antihipertensiva (No. 26 y No. 27) ; en *Gracilaria corticata*, Hoppe (47) determinó su acción fungicida y antituberculosa; *G. verrucosa* produce sustancias utilizadas para combatir las úlceras (48). Se han caracterizado algunos compuestos nitrogenados, así en *G. textori* (49), se encontró el

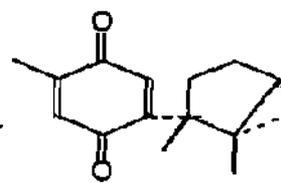
aminoácido Gigartine (No 28) y en *G. Secundata* (50) Fattorusso y cols. encontraron aminoácidos que contienen ciclo imidazol (Nos. 29,30).



No.13



No. 14



No.15

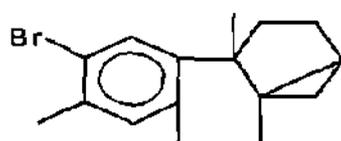


Fig. No. 16

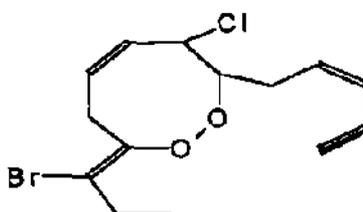


Fig. No. 17

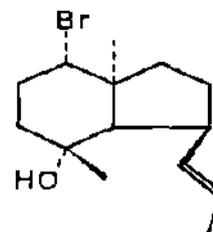
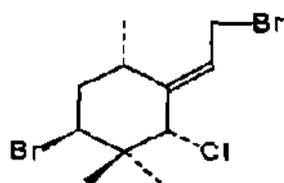
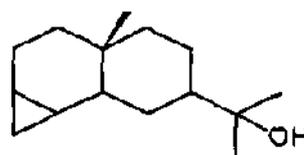


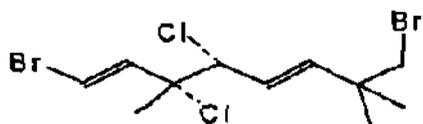
Fig. No. 18



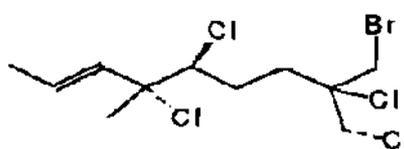
No. 19



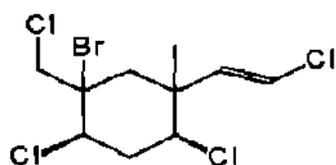
No. 20



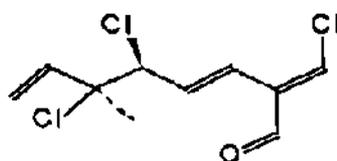
No.21



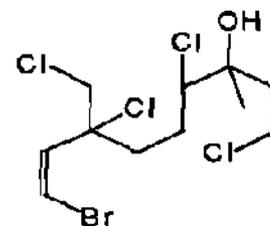
No. 22



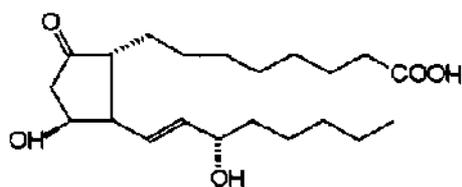
No.23



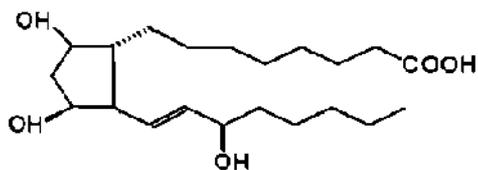
No.24



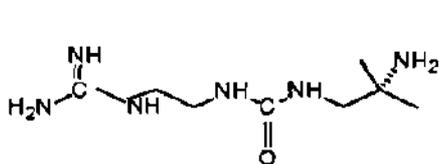
No.25



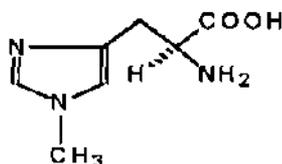
No. 26



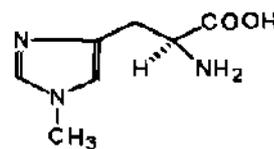
No. 27



No. 28



No. 29

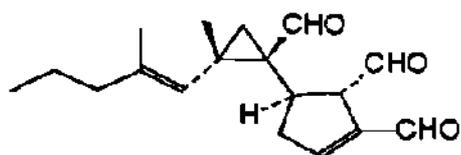


No.30

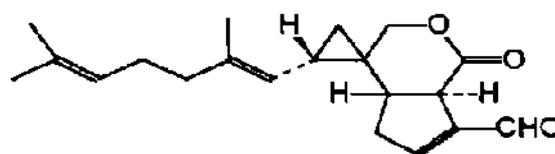
1.1.3 Chlorophytas

Las Chlorophytas se consideran antecesoras de las plantas terrestres y son descritas desde los inicios de la medicina folklórica; la *Ulva fasciata*, con el nombre de *Bryon thalassion* fue reportada por Dioscórides, como remedio contra la gota. Existen muchos reportes sobre bioactividad de las algas verdes, precisamente de una especie de *Chlorella*, se tiene el primer artículo científico sobre propiedades antimicrobianas de organismos marinos hecho por Pratt (51), cuyo extracto soluble en éter inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. De *Dunaliella primolecta*, Chang T. y cols. (52), obtuvieron un extracto fuertemente activo contra *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *Enterobacter aerogenes*.

Del género *Halimeda*, Fenical (53) reportó nuevos diterpenos (No. 31 y No. 32) que mostraron potente propiedad antimicrobiana y citotóxica.

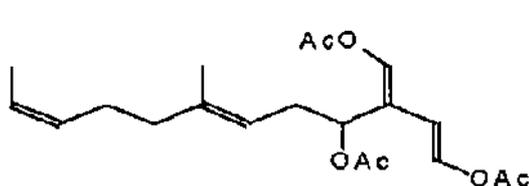


No. 31

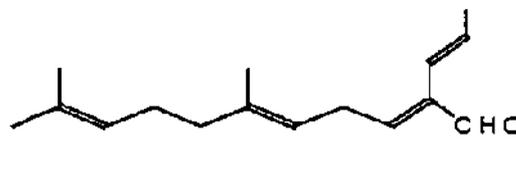


No.32

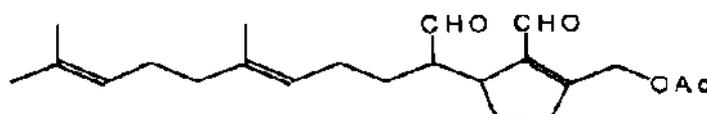
De los géneros *Penicillus* y *Udotea* , J. Valerie y cols. (54) aislaron terpenoides (Nos. 33, 34 y 35) con un amplio rango de actividad antibiótica.



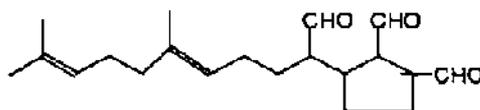
No. 33



No. 34



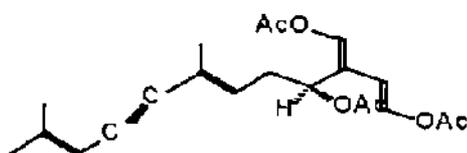
No. 35



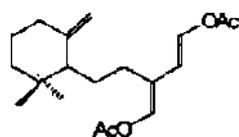
No.36

Del mismo género Tetsuo Nakatsu (55) y cols. encontraron que el extracto etánolico de *U. flabellum* mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, siendo el Udoteatrial (No36) el responsable de esta actividad. Contra *S. aureus* Mesmar (56) encontró mayor actividad de las algas verdes del Jordán en comparación con otras divisiones. Algunas Chlorophytas del género *Caulerpa* han sido estudiadas y los metabolitos encontrados en ellas poseen bioactividad: de *C. flexilis*, (57) el Caulerpenyne (No 37) de *C. bikinensis* (58) (No.38 y No. 39) ; de *C. brownii* (59) y de *F. tuberosa* (60) compuestos

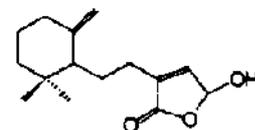
relacionados con la vitamina A (No. 40 y No.41).



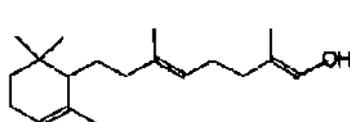
No.37



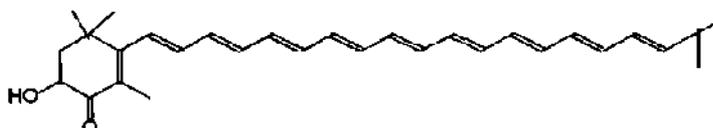
No. 38



No. 39



No. 40



No. 41

La familia *Ulvaceae* está ampliamente distribuida en nuestras costas; algunas especies de *Ulva* son usadas como alimento y en medicina popular, la *Ulva fasciata*, se utiliza para cicatrizar heridas y posee actividad antimicrobial por el Acido acrílico que contiene (61); este ácido fue el primer compuesto de las algas con actividad antibiótica cuya fórmula fue plenamente identificada, también posee un compuesto con actividad antiviral *in vitro* e *in vivo* que fue identificado como N-palmitoil-2-amino-1,3,4,5-tetrahydroioctadecano por Han, S. y cols. (62); *Ulva lactuca* se utiliza en Asia para combatir la gota y la artritis (20), se ha encontrado, aminoácidos (63), esteroides y carbohidratos que varían según la estación (64); en *U. gigantea* , Dupéron y Thiersault, (65) aislaron esteroides libres , glicosados y acetilados .

1.1.4 Ácidos grasos

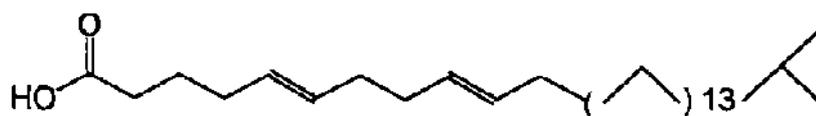
Los ácidos grasos saturados e insaturados encontrados en diferentes organismos marinos, entre ellos, las algas, han demostrado tener actividad biológica; precisamente en el primer reporte científico sobre propiedades antibióticas de las algas que realizó Pratt en 1953 (51), concluyó que una mezcla

de ácidos grasos a la que llamó "Chloralina" por ser derivado de una chlorophyta , era la responsable de esta actividad.

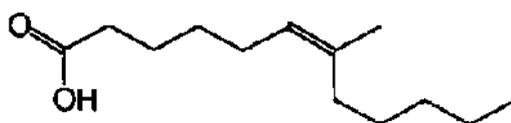
Carballeira y cols. han estudiado recientemente los compuestos lipídicos de esponjas, anémonas y otros organismos marinos, encontrando ácidos grasos saturados, con propiedades antibacterianas, insaturados, lineales, ramificados y con diferentes sustituyentes; en la esponja *Chondriosa ramiformis* (66) encontraron ácidos con cadenas de 17 a 29 carbonos, identificando el ácido 15-metil-5,9-hexadecadienoico no aislado anteriormente; en *Amphimedon viridis* (67), caracterizaron mas de 100 compuestos entre aldehídos y ácidos grasos, algunos con ramificaciones de metilos como el ácido 7-metil-6 hexadecenoico (No.43); en otros organismos marinos como *Holoturia mexicana* (68) aislaron un nuevo ácido, el 7-metil-6(Z)-octadecenoico (No.44) además de otros ácidos como fosfolípidos; en la anémona *Condylactis gigantea* (69) fue caracterizado el ácido hexadecanoico (No.45) como principal componente y un derivado bromado del ácido eicosanoico (No.46), semejante al que encontraron en *Stoichactis heliantus* (70) y en 1997 este mismo grupo de investigadores en *Eunicea succinea* (71) también encontró el ácido hexadecanoico como componente principal (este ácido se considera ubicuo en los organismos marinos) y un compuesto con propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*, el ácido (5Z,9Z)-14-metil-5,9-pentadecadienoico (No.47); de 24 ácidos grasos que se extrajeron de *Plethodon cinereus* (72) 15 presentaron actividad antibiótica.

Barnathan y Komprobst (73), caracterizaron la serie completa de ácidos 2-hidroxi de cadena larga en *Pseudosuberites* sp. donde predominan las cadenas de 22 a 27 átomos de carbono; Khotimchenko (74) determinó los

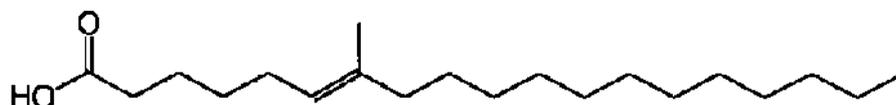
ácidos grasos de diferentes especies de *Sargassum*, encontrando mayor cantidad de derivados del ácido araquidónico; algunos ácidos grasos se han obtenido en forma de glicolípidos: Rho y cols. (75) obtuvieron compuestos bioactivos (No.48) de la chlorophyta *Oltmannsiellopsis unicellularis* y Bell y cols. (76) el ácido



No. 42



No. 43



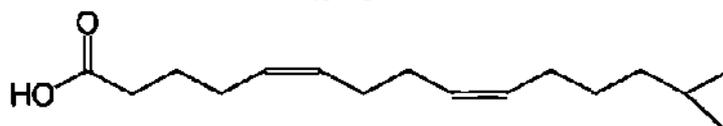
No. 44



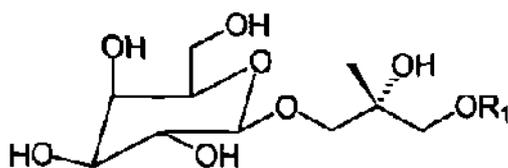
No. 45



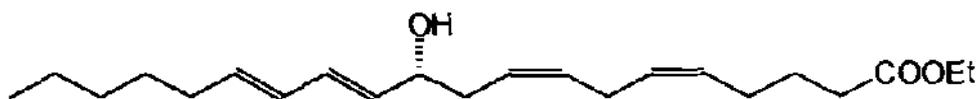
No. 46



No. 47



No. 48



No. 49

octadecapentanoico como galactocil diacil glicerol de la alga *Heterosigma akashiwo*. Otros como Guerreiro y cols. (77) los obtuvieron como ésteres etílicos (No.49), sin embargo la esterificación la consideraron artefacto por el manejo de la muestra. Un derivado del ácido linoléico aislado por Otha y cols. (78), de una microalga marina, presentó actividad MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilina), este dato es muy interesante porque como sabemos el *S. aureus* fácilmente puede adquirir resistencia a los antibióticos, de ahí el interés por buscar compuestos con actividad antimicrobiana en los organismos marinos.

HIPOTESIS

Las especies de algas marinas en estudio tienen importantes propiedades farmacológicas similares o mejores a las reportadas en otras especies de los mismos géneros.

OBJETIVO GENERAL

Identificar principios activos de las algas seleccionadas y probar su efecto bactericida y fungicida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar pruebas preliminares *in vitro* para evaluar la actividad bactericida y fungicida de extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad.
- Separar y evaluar microbiológicamente las fracciones de los extractos que presenten actividad biocida.
- Aislar y purificar los compuestos activos y dilucidar su estructura por métodos químicos y espectroscópicos.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Material vegetal, clasificación y descripción botánica

2.1.1 *Sargassum fluitans*

Clasificación Botánica:

Reino : Protista
División: Phaeophyta
Clase: Cyclospora
Orden: Fucales
Familia: Sargassaceae
Género: *Sargassum*
Especie: *S. fluitans* Börgesen

Descripción de la planta:

Planta pelágica, usualmente de hasta 15 cm de alto, café dorada, sin apéndices dominantes, tallo suave y un poco espinoso, hojas delgadas a lanceoladas, tallo corto, ampliamente dentado de 2-6 cm de largo y 3-8 mm de ancho, presencia de vesículas globosas a ovaladas de 4-5 cm de diámetro sobre tallos de 2-3 mm de largo, los tallos son frecuentemente alados, receptáculos no conocidos. (80,81) Fig No. 1.

2.1.2 *Ulva fasciata*

Distribución Geográfica:

Reino: Protista. Asociado con *Sargassum natans*, es común en las aguas de la costa del Atlántico Norte-Oriente y el Golfo de México.

Recolección de *Sargassum fluitans*

Orden: Ulva. La recolección se llevó a cabo en el mes de Julio de 1994, y en Agosto de 1996 en la Laguna Madre de San Fernando Tamaulipas, México en las escolleras El Catán entre 97° 50' y 98° 50' de latitud norte y 24° 30' y 25° 18' de longitud oeste.

Una muestra se depositó con el número 4648 en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. La identificación de la planta estuvo a cargo de Salomón Martínez Lozano del Departamento de Botánica.

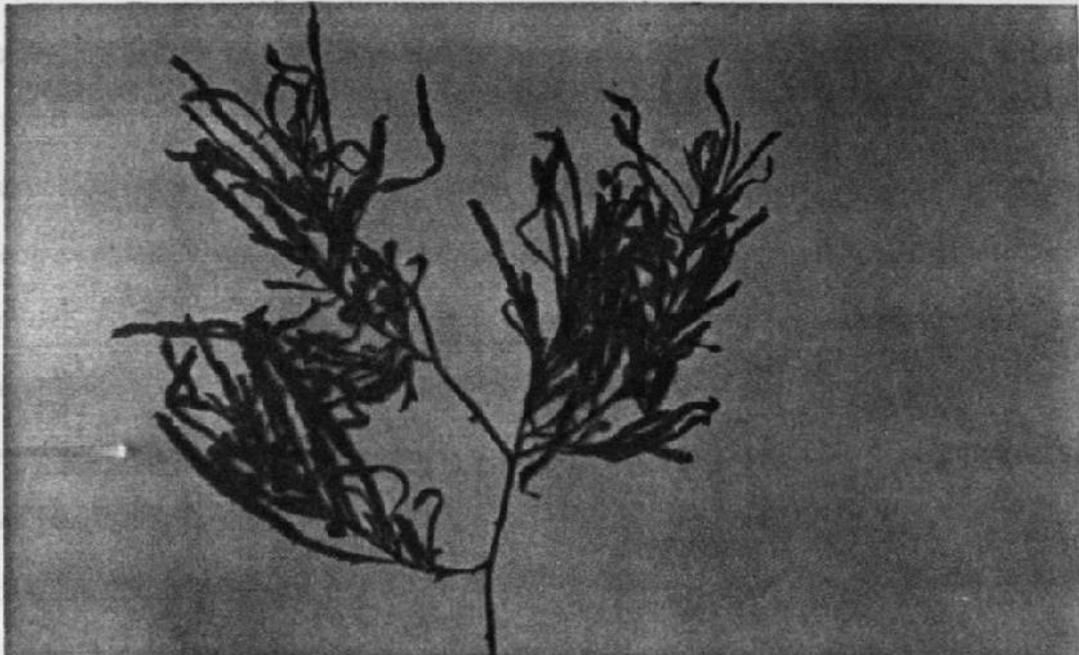


Fig. No. 1 *Sargassum fluitans*

2.1.2 *Ulva fasciata*

Clasificación Botánica

Reino : Protista

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Ulvales

Familia: Ulvaceae

Género: *Ulva*

Especie: *U. fasciata* Delile

Descripción de la planta:

Plantas foliáceas de hasta 45 cm de alto, verde brillante, frondas ampliamente lobadas y onduladas, a veces ligeramente lanceoladas hacia los ápices, con el pie de fijación pequeño; de hasta 12 cm de largo por 30-65 mm de grueso; células en sección transversal de horizontal a verticalmente elongadas, su estructura celular es eucariótica similar a las plantas superiores, son laminares diestromáticas y se fijan al sustrato por discos basales que pueden producir frondas en la primavera, por lo que pueden considerarse pseudoperennes, los fragmentos de las frondas pueden separarse y continuar creciendo y reproduciéndose, formando grandes masas en aguas protegidas y contaminadas Fig. No. 2.

Distribución Geográfica:

Se les puede localizar en aguas de baja temperatura del Ártico y en templadas de los Trópicos, en el Atlántico desde Florida a través del Golfo de México hasta Brasil (80,81).

Recolección de *Ulva fasciata*

La recolección se llevó a cabo en el mes de Julio de 1994, en la Laguna Madre de San Fernando Tamaulipas a 24° 30' y 25° 18' de latitud norte y 97° 50' y 98° 50' de longitud oeste y en el municipio de Soto la Marina, Tamaulipas, localizado geográficamente (centro oeste del Golfo de México) a los 23° 30' de latitud Norte y a los 98° 30' de longitud Oeste.

Order: La identificación de la planta estuvo a cargo de Leticia Villarreal Rivera del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. No. de herbario 4763.

Especie: *G. filifera* (Forsk.) Sörgesen, o
Ulva fasciata McLachlan



Distribución Geográfica

Se encuentran distribuidas ampliamente en las costas del Océano Atlántico y Pacífico en climas templados a cálidos.

Fig No. 2 *Ulva fasciata*

2.1.3. *Gracilaria foliifera*

Clasificación Botánica:

Reino: Protista
División: Rhodophyta
Clase: Rhodophyceae
Orden: Gigartinales
Familia: Gracilaraceae
Género: *Gracilaria*.
Especie: *G. foliifera* (Forsskal) Börgesen, o
tikvahiae McLachlan

Descripción de la planta:

Plantas erectas, de hasta 20 cm de alto, púrpura-rojizo, con la edad se vuelven libres; textura firmemente carnosa, ramas de 0.5- 2 mm de diámetro, repetidamente divididas, ramificación alterna, ocasionalmente casi dicotómica, numerosas ramificaciones laterales cilíndricas a todo lo largo, adelgazándose en las últimas ramillas; células de la médula con paredes delgadas, corteza de 2 a 3 capas celulares; tetrasporangios numerosos, esparcidos en las ramillas, ovales. Gregaria, en forma de abanico, se fija por sarcillos discoides Fig No. 3 (80,81).

Distribución Geográfica:

Se encuentran distribuidas ampliamente en las costas del Océano Atlántico y Pacífico en climas templados a cálidos.

Recolección de *Gracilaria foliifera*

Clasificación: La recolección se llevó a cabo en el mes de Julio de 1994, y en Agosto de 1996 en la Laguna Madre de San Fernando Tamaulipas a 24° 30' y 25° 18' de latitud norte y 97° 50' y 98° 50' de longitud oeste. La clasificación botánica fue llevada a cabo por Leticia Villarreal Rivera y un ejemplar fue guardado con el No. de herbario 4829 de Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.

Familia: Ulvaceae

Género: *Ulva*

Especie: *U. lactuca* (Lamour.)

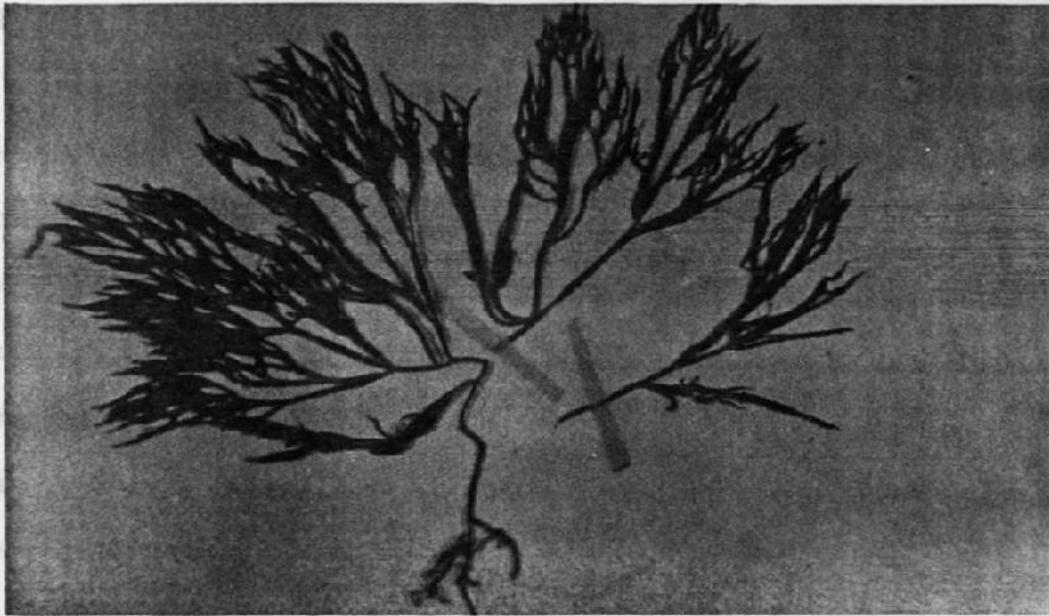


Fig. No. 3 *Gracilaria foliifera*

2.1.4. *Ulva lactuca*

Clasificación botánica:

Reino:	Protista
División:	Chlorophyta
Clase:	Chlorophyceae
Orden:	Ulvales
Familia:	Ulvacea
Género:	<i>Ulva</i>
Especie:	<i>U. lactuca</i> (Linnaeus)

Descripción de la planta:

Presentan color verde por las clorofilas α y β que contienen, presentan láminas largas de consistencia membranosa firme, talo foliáceo expandido constituido de dos capas de células que miden hasta 53 micras de grosor, cutícula moderadamente espesa, mostrándose en ciertos puntos lamelosa, células en vista superficial en forma de polígono redondeado, con un único cloroplasto dispuesto a lo largo de las paredes, fijación con un minúsculo opresorio basal, para lo cual contribuyen los rizoides que nacen en las células próximas; crecen sobre fondo rocoso.

Se le conoce como "Lechuga de mar" en Inglaterra y Escocia, "Aosa" en Japón y "Palahalahaen" en Hawaii (80,81).

Distribución Geográfica:

Se les puede localizar en aguas de baja temperatura del Ártico y en templadas de los Trópicos, en el Atlántico Norte y Pacífico Norte.

2.2 Extracción del Material Vegetal

Recolección de *Ulva lactuca*

Una vez recolectado y clasificado el material se secó a temperatura ambiente, se trituró en un molino tipo "wiley", extrayéndose posteriormente por 3 técnicas: lixiviación en columna (2.2.1), insuflación a temperatura ambiente (2.2.2) y extracción continua en Soxhlet (2.2.3).
Tamaulipas localizado geográficamente (centro oeste del Golfo de México) a los 23° 30' de latitud Norte y a los 98° 30' de longitud Oeste. Fue clasificada botánicamente por Leticia Villarreal Rivera y guardada con el No. de herbario 4776 en la Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.



Fig. No. 4 *Ulva lactuca* mencionados en 2.2.2, utilizando extractores de tipo

2.2 Extracción del Material Vegetal

Una vez recolectado y clasificado el material se secó a temperatura ambiente, se trituró en un molino tipo "Wiley", extrayéndose posteriormente por 3 técnicas: lixiviación en columna (2.2.1), maceración a temperatura ambiente (2.2.2) y extracción continua en Soxhlet (2.2.3).

2.2.1 Lixiviación en columna

En este método el material vegetal seco y molido se introdujo en una columna de vidrio de 40 cm de largo con un diámetro de 4 cm, con una capa de algodón en la parte inferior, se hicieron pasar solventes de polaridad creciente, se colectaron los diferentes lixiviados y se concentraron en rotavapor a presión reducida.

2.2.2 Maceración a temperatura ambiente

En esta técnica el material seco y molido se introdujo en un recipiente sellado con aproximadamente 1 L de solvente por cada 200 gramos de planta seca. Los solventes usados fueron: Eter de petróleo, cloroformo, acetona, etanol, metanol y agua. El recipiente se dejó a temperatura ambiente, (25-35° C) en la obscuridad durante 7 días, se drenó el solvente, se añadió después otra cantidad igual de solvente y se hizo la extracción dos veces más. El extracto se concentró en Rotavapor Büchi a presión reducida; esto se repitió con todos los solventes.

2.2.3 Extracción continua en "Soxhlet"

En esta técnica el material seco y molido se extrajo durante una semana con los disolvente mencionados en 2.2.2 , utilizando extractores de tipo

"Soxhlet". La solución obtenida se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio a baja temperatura y presión reducida

2.3 Separación de fracciones

2.3.1 Cromatografía Planar

2.3.1.1 Preparación de placas. Estas se prepararon sobre rectángulos de vidrio de 10 x 5 cm con 1 mm de grosor, usando "gel de sílice-60 G para cromatografía en placa fina" de E. Merck A.G. Para elaborar las placas se suspendió gel de sílice en agua en una proporción de 1 a 3, se aplicó sobre el vidrio con grosor variable, se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente y se activaron en una estufa a 100 °C por una hora.

Para calcular el R.f. se midió la distancia del punto de aplicación al centro de la mancha estudiada y se dividió este valor entre la distancia del punto de aplicación y el frente del solvente (82) , la selección de la fase móvil se hizo de acuerdo a los parámetros mencionados por Touchstone y Dobbins (83).

2.3.1.2 Agentes cromogénicos. Las manchas separadas en las placas se detectaron utilizando:

- Luz ultravioleta. Después de examinar las placas con luz visible se observaron en una cámara de luz ultravioleta de onda larga y corta.
- Vapores de Yodo. La placa libre de solventes , se colocó en un frasco cerrado que contenía cristales de yodo, después de 10 minutos se observaron las manchas .

2.3.2 Cromatografía en columna.

2.3.2.1 Preparación de la columna. Se utilizaron cilíndricas, de vidrio (Pyrex) de 40 cm de largo y 4 cm de diámetro equipadas con llave de paso de teflón en la parte inferior. Las columnas se taparon con algodón previamente a la adición del soporte cromatográfico, siguiendo la metodología convencional (82).

2.3.2.2 Gel de sílice Se utilizó "Silicagel-60" 60-200 mallas (Baker) y se aplicó en montaje seco. Esta técnica se llevó a cabo agregando a la columna, en una sola porción, la gel de sílice seca, se esperó que se asentara, ayudando con golpes dados estratégicamente a la columna y se procedió a agregar la muestra a la parte superior de la columna. Después se añadió el solvente de elución a la columna seca y se procedió a correr la columna

2.3.2.3 Aplicación de la muestra. Por adsorción previa. Esta técnica, utilizada para mezclas complejas cuyos componentes tienen un amplio rango de polaridades, consistió en lo siguiente: se añadió una solución concentrada de la mezcla a una cantidad igual al de la mezcla seca de adsorbente, se dejó evaporar el solvente al aire y se molió finamente el sólido resultante. Este polvo se aplicó sobre la parte superior del empaque de la columna, preparada según 2.5.1.1. cuidando no dañar la parte superior del empaque de la columna, ya que de la homogeneidad de esta parte depende la resolución.

2.3.2.4 Elución en gradiente. En este tipo de elución la polaridad del sistema de solvente utilizada para correr la columna, se modificó conforme avanzaba la separación. Los solventes utilizados fueron metanol, benceno, acetona, diclorometano, acetato de etilo, clorofarmo, etanol.

2.3.3 Cromatografía en columna seca "Invertida".

Se utilizaron columnas de vidrio de 17 cm de longitud y 21 mm de diámetro; para llevar a cabo la cromatografía se tapó uno de los extremos de la columna con un tapón de hule y se añadió en pequeñas porciones el adsorbente que en este caso fue "gel de sílice-60 G para cromatografía en capa fina" (Merck), se golpeó suavemente el extremo tapado, contra la mesa para asegurar su asentamiento uniforme, hasta aproximadamente 2 cm del extremo superior de la columna, se colocó un disco de papel filtro y se ajustó a la superficie de la sílica con un tapón adecuado. Sobre este disco se añadió la muestra la cual fué disuelta en solventes volátiles mezclada en un mortero con la sílica en una proporción de 2:1 respectivamente y se evaporó el solvente, se colocó otro disco de papel filtro y se llenó hasta el extremo con sílica, se cubrió con un papel filtro se le hicieron orificios con un alfiler y se fijó con un cordel (previamente humedecido con la mezcla de eluentes a usar) a la columna, este extremo se colocó en un recipiente que contenía el eluyente, y se dejó ascender. Se sacó la sílica del tubo y se cortó con una espátula, se fraccionó según los colores desarrollados o los R.f obtenidos en CCF hechas previamente.

Cada porción se recibió en un matraz de dimensiones apropiadas, se añadió el eluyente y se filtró en un embudo Büchner. Los resultados de esta

cromatografía dependen de la selección adecuada de la mezcla de eluentes probada por CCF

2.4. Cristalización.

Esta y la recolección de los compuestos aislados por cromatografía se efectuaron siguiendo la metodología convencional (83).

2.5. Métodos físicos.

Se utilizó un aparato Mel-Temp "Electrothermal" para la determinación en capilar cerrado.

2.6. Métodos espectroscópicos

Espectroscopía infrarroja. Los espectros se determinaron en un Espectrómetro Perkin Elmer, Paragon 2,000 FTIR, en la Facultad de Ciencias Químicas U.A.N.L.

Espectroscopía de masas. Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II acoplado con detector Espectro de Masas 5971 con rango de 2 a 700 unidades básicas, en el Centro de Investigación de Química Aplicada de Saltillo Coah.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C . Fueron realizados en un Espectrómetro Bruker DPX 400 del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina U.A.N.L.

Espectroscopía de RMN doble dimensión, COSY, HETCOR y DEPT. Espectrómetro Bruker DPX 400, del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina U.A.N.L.

2.7 EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA.

2.7.1. Microorganismos utilizados

Staphylococcus aureus 004

Candida albicans 181

Escherichia coli 030

Streptococcus faecalis

Staphylococcus epidermidis 006

Salmonella enteritidis 035

Pseudomonas aeruginosa

proporcionados por Manuel Rodríguez Quintanilla del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina U.A.N.L.

2.7.2. Estrategia para la evaluación de actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión señalado por Rios y colaboradores (85), en el cual los microorganismos después de activados por 24 h. en BHI se inoculan en la superficie de una caja petri con agar Muller-Hinton, el inóculo se distribuye en el agar con una asa de Driblasky. Se hacen orificios de 6 mm de diámetro en el agar con una pipeta pasteur, se agrega extracto en ellos y se incuba a 37°C por 24 h, se mide el halo de inhibición. La concentración mínima

inhibitoria, MIC se determinó con el mismo método, con diferentes diluciones del extracto.

Se utilizaron como testigos negativos los solventes utilizados y como testigos positivos, Ampicilina, Penprocilina y Amikacina.

2.7.3. Curva de actividad de Ampicilina.

La presentación comercial de ampicilina equivalente a 500 mg en 2 mL fué diluida en forma seriada para obtener concentraciones de 250 mg/mL, 25 mg/mL y 2.5 mg/mL, con el objeto de tener el parámetro de medición de los halos de inhibición de los extractos. (fig No.5).

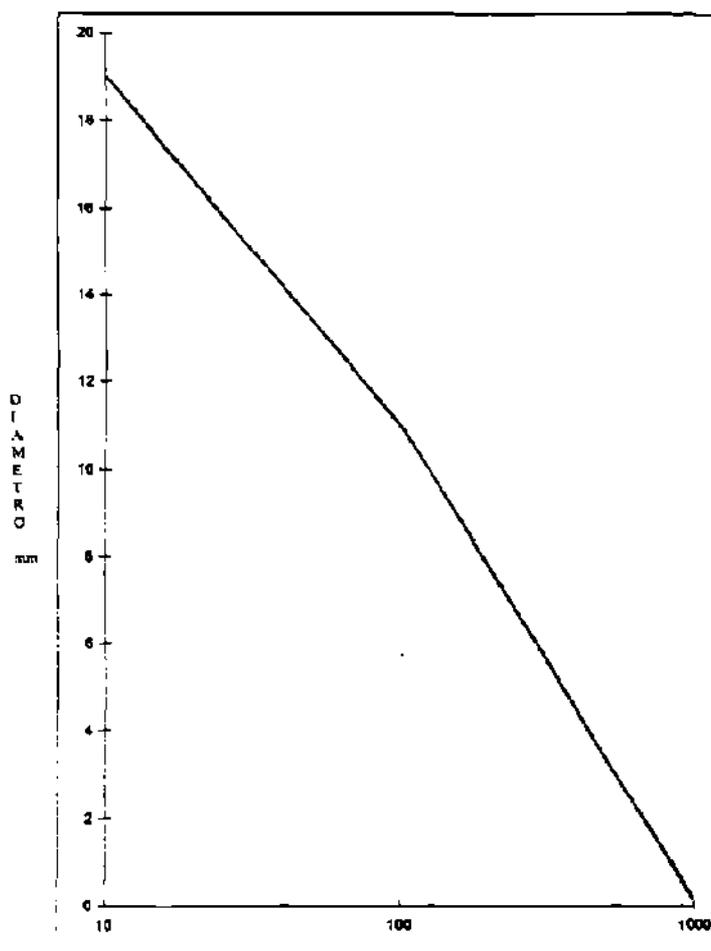


Fig. No. 5 Curva de inhibición Ampicilina contra *E. coli*

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Pruebas preliminares para elegir tipo de extracción.

3.1.1. Preparación de extractos

Se pesaron 3 porciones de 30 g cada una de *Sargassum fluitans* y de *Ulva fasciata*, se colocaron respectivamente en un matraz erlenmeyer, en una columna de vidrio y en un equipo de extracción continua Soxhlet (2.2.1, 2.2.2, 2.2.3.), se extrajeron exhaustivamente añadiendo cada vez 150 mL de éter de petróleo, cloroformo, acetona, etanol y metanol .por siete días, se evaporó el solvente en un rotavapor a presión reducida, se realizó cromatografía en capa fina utilizando benceno/acetona 8:2 como eluyente. Los extractos así obtenidos se esterilizaron por filtración con una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm. Los extractos estériles se recolectaron en tubos viales y fueron almacenados a 5°C.

3.1.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

3.1.2.1 Activación y viabilidad de cepas. Se utilizó el medio infusión cerebro-corazón (BHI), se incubaron a 37 °C por 16 h. Para confirmar la pureza de las cepas se resembraron en cajas Petri por el método convencional (109), el *Staphylococcus aureus* en agar soya tripticasa, *Candida Albicans* en saboraud (dextrosa 4%), *Escherichia. coli* en EMB, *Streptococcus faecalis* en agar sangre, *Staphylococcus epidermidis* en Vogel y Johnson, *Salmonella enteritidis* en EMB y

Pseudomonas aeruginosa en Ceftrimida. Se guardaron en tubos con tapón de rosca en medio BHI mas cisteína al 1% a 5°C.

Para llevar a cabo el conteo de las colonias se sembró una asada del microorganismo en 5 mL de caldo de soya tripticasa por 16 hrs a 37°C, de este cultivo se hicieron diluciones en solución salina estéril 1:10, 1:100, 1:1,000, etc, hasta completar 9 tubos; se realizó una cuenta viable con estas diluciones: para ello se midió 1 ml de la disolución y 9 ml de agar soya tripticasa en una caja petri estéril, se mezclaron e incubaron a 37° por 24 horas, en un contador de colonias; la cuenta viable debía resultar con una diferencia en cada caja de 1:10 colonias. Se probó la dilución y cantidad mas apropiada para evaluar los extractos.

3.1.2.2 Ensayo de actividad de extractos

Se utilizó la dilución 1×10^5 unidades formadoras de colonias y 100 μ L de esta dilución, se sembró en agar Muller Hinton (Difco), esparciendo el cultivo con una asa de Driblasky, se hicieron orificios con una pipeta Pasteur de 6 mm de diámetro, se agregó 50 μ L del extracto con una micropipeta Eppendorf, se incubó por 24 hrs., se midió el halo de inhibición formado. El procedimiento se repitió utilizando discos estériles de papel filtro impregnados con 10 μ L del extracto. Todos los experimentos se llevaron a cabo un mínimo de tres veces.

3.2 *Sargassum fluitans*

3.2.1. Preparación de los extractos

Como está representado en la fig no. 6, se colocaron 30 g de la alga seca y molida *Sargassum fluitans* en un matraz erlenmeyer cerrado y en obscuridad y se extrajeron exhaustivamente por maceración con éter de petróleo por siete días a temperatura ambiente, se filtró y en la parte no soluble (marco), se repitió la extracción con cloroformo, acetona, etanol, metanol y agua; al término de este procedimiento los extractos se evaporaron en rotavapor a presión reducida; cada uno de los residuos se disolvió selectivamente en diferentes solventes, se obtuvieron 11 extractos numerados de Sf 1.1 a Sf 6.11, se procuró tener una concentración final de cada extracto de 2 a 3 mg / mL.

3.2.2 Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Cada uno de los 11 extractos obtenidos se esterilizó con filtros de nitrocelulosa de 0.45 μm . Se tomó una asada de cada uno de los microorganismos utilizados, se activaron en tubos con BHI a 37°C por 16 horas, los cultivos fueron diluidos en serie (3.1.2.1) para obtener una concentración microbial de 10^5 unidades formadoras de colonias; de esta dilución se tomaron 100 μL y se inocularon en placas con agar Muller Hinton, se dispersaron con un tubo L, se hicieron 4 orificios de 6 mm de diámetro en cada caja Petri, con una pipeta Pasteur y en ellos se agregaron 50 μL de cada extracto en orificios y con 10 μL en discos de 6mm de diámetro de papel filtro Whatman No. 4, después de incubarlos a 37°C por 24 horas, se midió el halo de inhibición.

3.2.3 EXTRACTO Sf 1.1

3.2.3.1 Separación cromatográfica

Se pesaron 380 g de *Sargassum fluitans*, se extrajeron con éter de petróleo por siete días, se evaporó el solvente a presión reducida, se obtuvieron 3.3 g de extracto etéreo, se llevaron a cabo CCF preliminares y posteriormente se montó una columna cromatográfica empacada con sílica gel; la muestra disuelta en etanol se mezcló con sílica gel, se evaporó el solvente y se colocó en la cima de la columna. Las eluciones se realizaron con hexano, cloroformo, acetona, cloruro de metileno, metanol y etanol en diferentes proporciones. Se obtuvieron 15 fracciones las cuales se enumeraron de Sf 1.1 f 1 al Sf 1.1 f 15 Fig. No. 7

3.2.3.2. Evaluación microbiológica

La evaluación se llevó a cabo con *S. aureus* y *C. albicans*, microorganismos que representan un problema intrahospitalario ya que son causa de infecciones importantes. Se realizó con el método de difusión, con 100 µL de una dilución de 10^5 UFC inoculadas en agar Muller Hinton y 50 µL de extracto en orificios y con 10 µL en discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman No. 4; después de incubarlos a 37°C por 24 horas, se midió el halo de inhibición.

MIC: La concentración mínima inhibitoria se determinó de la siguiente manera: Se pesaron 2.5 mg del extracto, se hicieron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 y 2.50 mg/mL, y se siguió el método de evaluación microbiológica ya explicado, con estas diluciones.

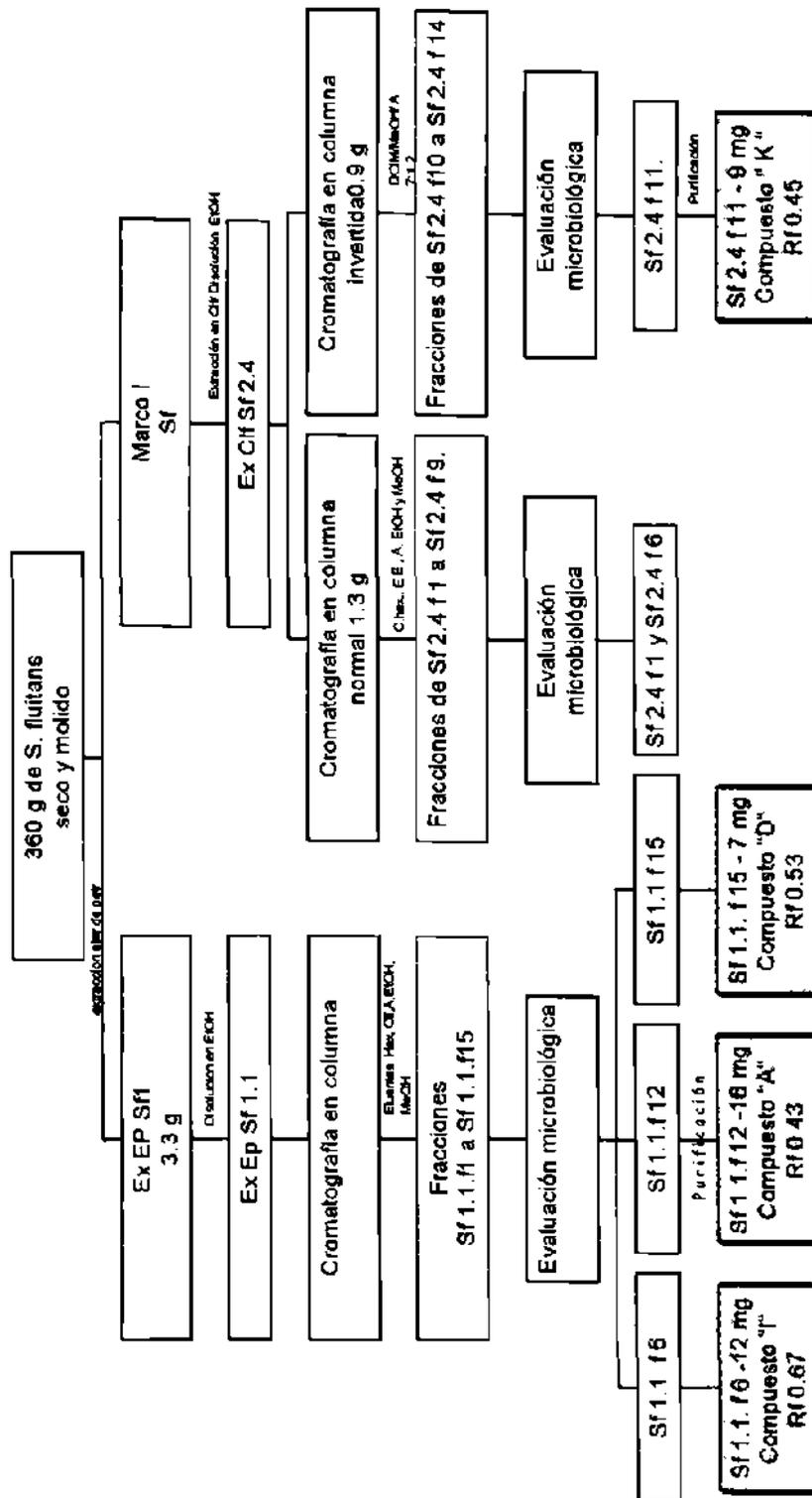


Fig. No. 7 Separación de fracciones de extractos de *Sargassum fluitans*

3.2.3.3 Fracción Sf 1.1 f 6.

De la fracción eluída con cloruro de metileno, se obtuvo un material ceroso que fue purificado por el método de columna invertida con una columna de 17 cm de longitud por 2 cm de diámetro que contenía 14 g de sílica gel 60 G para CCF, como se describe en 2.3.3, se separaron 12 mg de un aceite al cual se nombró compuesto " I ".

3.2.3.4 Fracción Sf 1.1 f 12.

De la fracción eluída con cloruro de metileno/ metanol 9:1, se obtuvo una grasa que fue purificada utilizando el método de cromatografía en columna invertida explicado en 2.3.3 utilizando benceno/acetona 9:1 como eluyente, se obtuvieron 16.7 mg de un aceite que se nombró compuesto " A ".

3.2.3.5. Fracción Sf 1.1.f 15

Esta fue obtenida con la elución de acetona/metanol 9:1, se evaporó el solvente quedando un polvo blanco al que se le hizo la prueba de ignición y se purificó por cristalizaciones con acetona, se obtuvieron 7 mg de un compuesto al que se le denominó " D ".

3.2.4. EXTRACTO SF 2.4

3.2.4.1 Separación cromatográfica

La parte no soluble en éter de petróleo (marco) se extrajo exhaustivamente con cloroformo y se evaporó a sequedad, el residuo del extracto clorofórmico Sf 2.4 se dividió en dos partes, 1.3 g se disolvieron en etanol, se hicieron CCF preliminares y se montó una columna; la muestra disuelta en etanol se mezcló con 2 g de sílica y se evaporó el solvente; se colocó en la

cima de la columna cromatográfica , se hicieron eluciones con ciclohexano, acetona, éter etílico, etanol y metanol en diferentes proporciones. El extracto restante se disolvió en etanol, se realizó una CCF y se mezcló con 1 g de sílica gel, para realizar una columna de cromatografía invertida (2.3.3.) con una mezcla de diclorometano, metanol, acetona en la proporción 7:1:2 como eluente, se separaron 5 fracciones Sf 2.4 f 10 a Sf 2.4 f 14, se extrajeron de la sílica con acetona y se filtraron (Fig No 7).

3.2.4.2 Evaluación microbiológica.

Las catorce fracciones obtenidas con los dos tipos de cromatografía señalados, fueron probadas en *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, por el método mencionado (3.1.2.2.).

3.2.4.3 Fracción Sf 2.4 f 11

Esta fracción fue separada de la columna invertida por disolución en etanol, filtrada la sílica, se le purificó con otra columna invertida, usando como eluente benceno/acetona 9:1 y con posteriores extracciones sucesivas en etanol, se obtuvieron 9 mg de un aceite al que se le denominó compuesto "K" .

3. 3 *Ulva fasciata*

3.3.1.Preparación de los extractos

La muestra seca y molida de *Ulva fasciata* (30 g) se colocó en un matraz erlenmeyer cerrado y en la obscuridad, se extrajo exhaustivamente por maceración con porciones de 150 mL de éter de petróleo por siete días a temperatura ambiente; esta extracción se repitió con cloroformo, acetona, etanol, metanol y agua. Al término de este procedimiento, los extractos se evaporaron en rotavapor a presión reducida, se separaron por disolución en diferentes solventes procurando tener una concentración final de cada extracto de 2 a 3 mg / mL como está representado en la Fig. No. 8 procediéndose a esterilizarlos por filtración con filtros de 0.45 μ m. Se guardaron en viales estériles a 5°C para el bioensayo.

3.3.2.Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Se tomó una asada de cada uno de los microorganismos utilizados, se activaron en tubos con BHI a 37°C por 16 horas, los cultivos fueron diluidos en serie (3.1.2.1) para obtener una concentración microbiana de 10^5 Unidades formadoras de colonias, de esta dilución se tomaron 100 μ L y se inocularon en placas con agar Muller Hinton, se dispersaron con un tubo L, se hicieron 4 orificios de 6 mm de diámetro en cada caja Petri, con una pipeta Pasteur y en ellos se agregaron 50 μ L de cada extracto con una pipeta Eppendorf, se incubaron por 24 horas a 37°C y se midió el halo de inhibición.

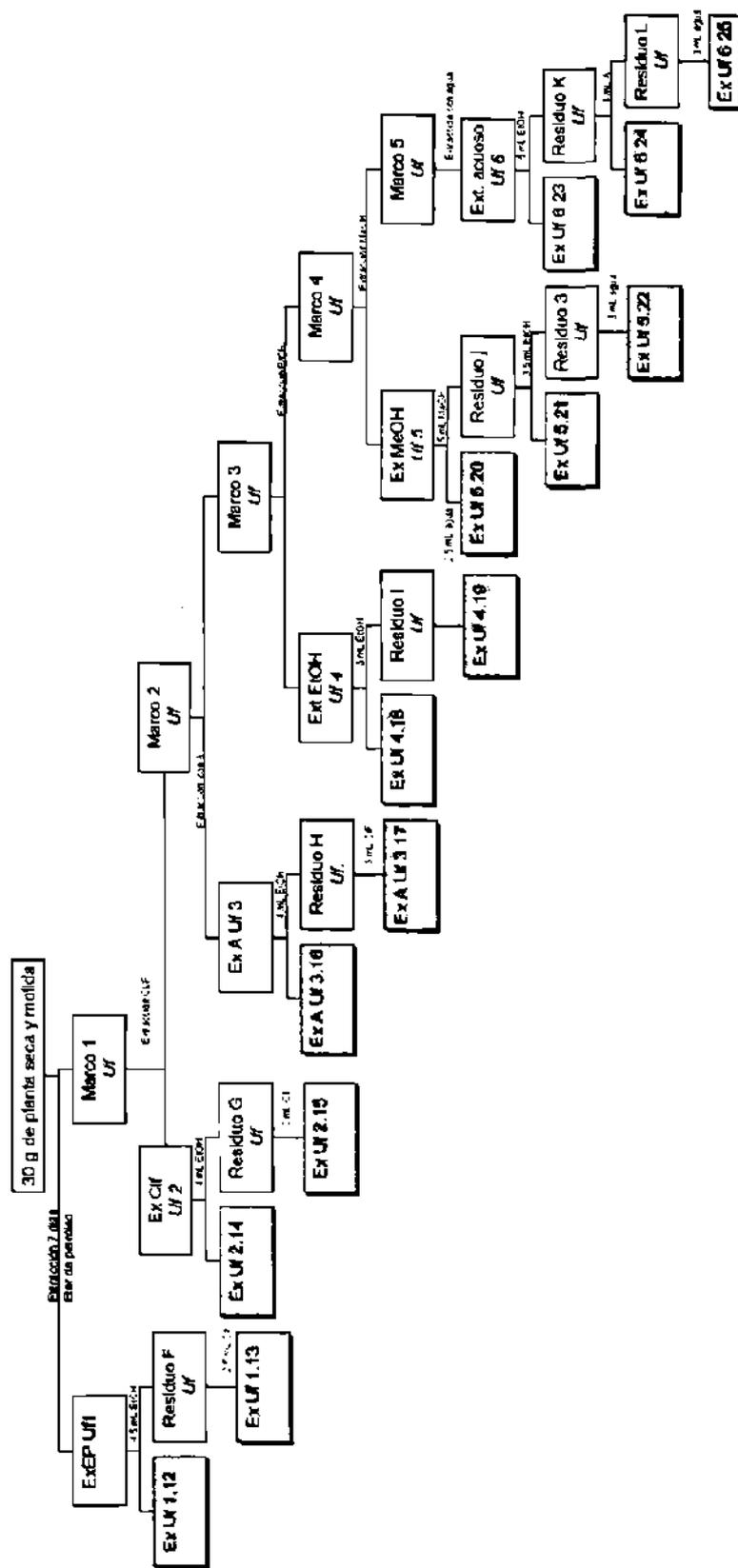


Fig. No.8 Obtención de extractos de *Ulva Fasciata*

3.4 *Gracilaria foliifera* o *tikvahiae*

3.4.1. Preparación de los extractos En la Figura No, 9 se observa el procedimiento para obtener estos , se pesaron 30 g de la muestra seca y molida de *G. foliifera*, se colocaron en un recipiente cerrado y en la obscuridad, se extrajeron exhaustivamente por maceración con éter de petróleo por siete días a temperatura ambiente, esta extracción se repitió con cloroformo, acetona, etanol, metanol y agua, al término de este procedimiento se evaporaron en rotavapor a presión reducida, se separaron por disolución en diferentes solventes procurando tener una concentración final de cada extracto de 2 a 3 mg / mL. Los 10 extractos obtenidos se esterilizaron con filtros de 0.45 µm, se guardaron en viales estériles a 5°C para probar su poder antibiótico.

3.4.2. Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Se llevó a cabo utilizando el método de difusión explicado en 3.1.2.1, los siguientes extractos: Ex Gf 1.26 (extracto etéreo soluble en cloroformo), Ex Gf 3.29 (extracto acetónico soluble en etanol) y el ExGf 4.30 (extracto etanólico disuelto en etanol/A), fueron elegidos para realizar un ensayo biodirigido.

3.4.3 EXTRACTO Gf 1. 26

3.4.3.1. Separación cromatográfica

La muestra de *G. foliifera* (390 g) seca y triturada en molino tipo Wiley, se extrajo con éter de petróleo 7 días por maceración, se evaporó el solvente y se obtuvo el Ex Gf 1.26 se disolvió en cloroformo; se realizó CCF para posteriormente llevar a cabo una CC utilizando hexano, acetato de etilo, acetona y

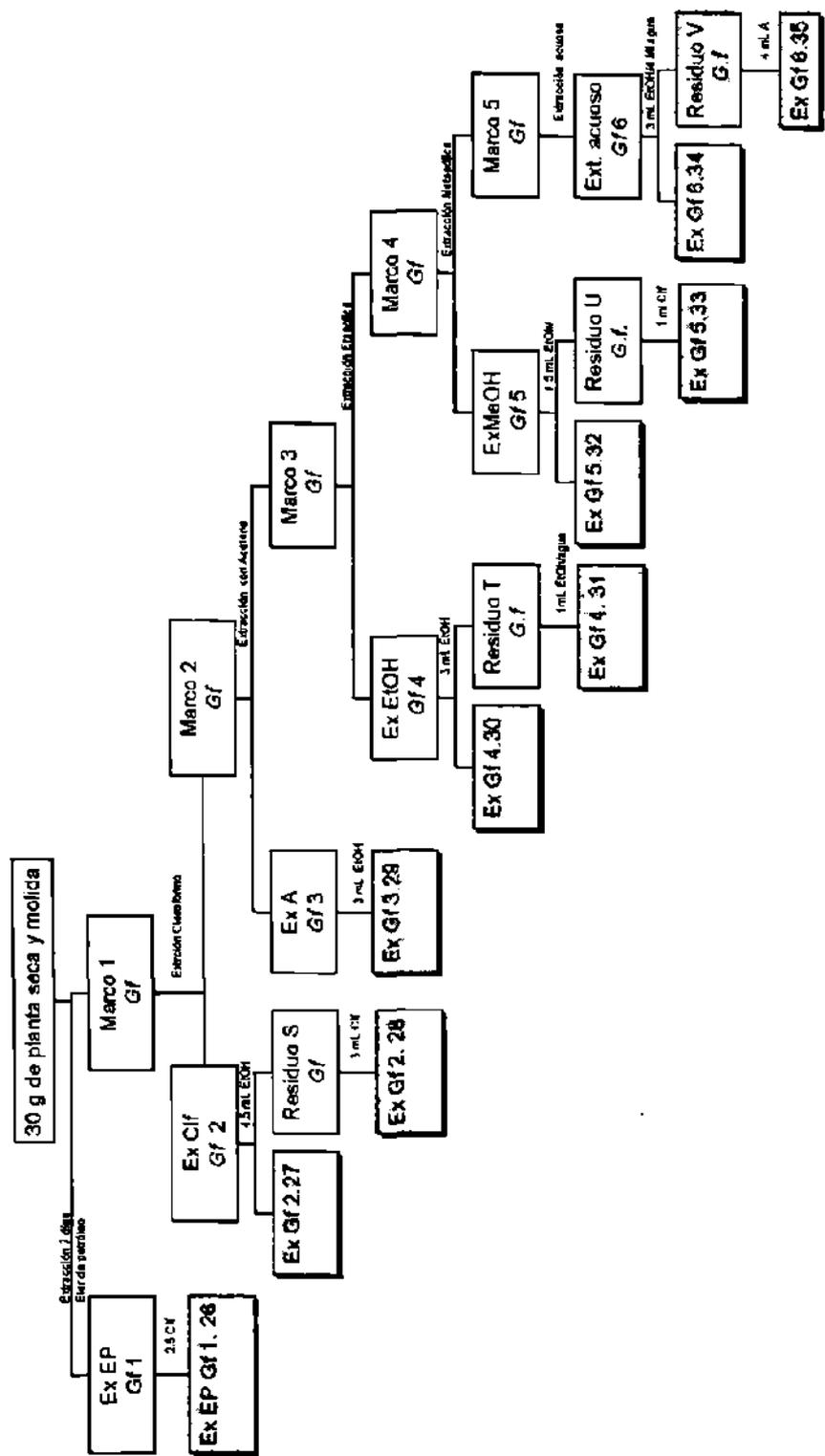


Fig. No. 9 Obtención de extractos de *Gracilaria foliifera*

metanol o bien mezclas de ellos en diferentes proporciones, la CC se monitoreó con CCF recolectando fracciones de 250 mL las cuales se evaporaron a presión reducida, se obtuvieron 16 fracciones que fueron inscritas como Gf 1.26 f 1 a Gf 1.26 f 16. Fig No. 10.

3.4.3.2 Evaluación microbiológica de las fracciones obtenidas.

Una parte de cada fracción aproximadamente entre 2 y 3 mg se disolvieron en 1 mL de etanol, se evaluó su actividad antimicrobiana por el método explicado anteriormente y se purificaron las fracciones: Gf 1.26 f 4 y Gf 1.26 f 8

3.4.3.3. Fracción Gf 1.26 f 4

La fracción Gf 1.26 f 4 obtenida con la elución hexano/acetona 8:2 se purificó con cromatografía en columna invertida, se obtuvieron 21 mg de un aceite con un Rf 0.29 obtenido en diclorometano/metanol 9:1, al que se le denominó compuesto "J".

3.4.3.4 .Fracción Gf 1.26 f 8

La fracción eluida con A/MeOH 8:2 Gf 1.26 f 8 fue purificada por sucesivas extracciones en un embudo de separación con tetracloruro de carbono/acetona, al evaporar el tetracloruro se obtuvieron 68 mg de un aceite con un Rf 0.62 en cloroformo/acetona 8:2 al cual se le denominó compuesto "G"

3.4.4. EXTRACTO Gf 3.29

La parte no soluble en éter de petróleo (marco), se extrajo con cloroformo por 7 días en frío, el solvente fue eliminado quedando el residuo Gf 2.28 el cual fue desechado ya que con las pruebas realizadas comprobamos que no tenía actividad significativa por lo que el marco que quedó de esta extracción se maceró

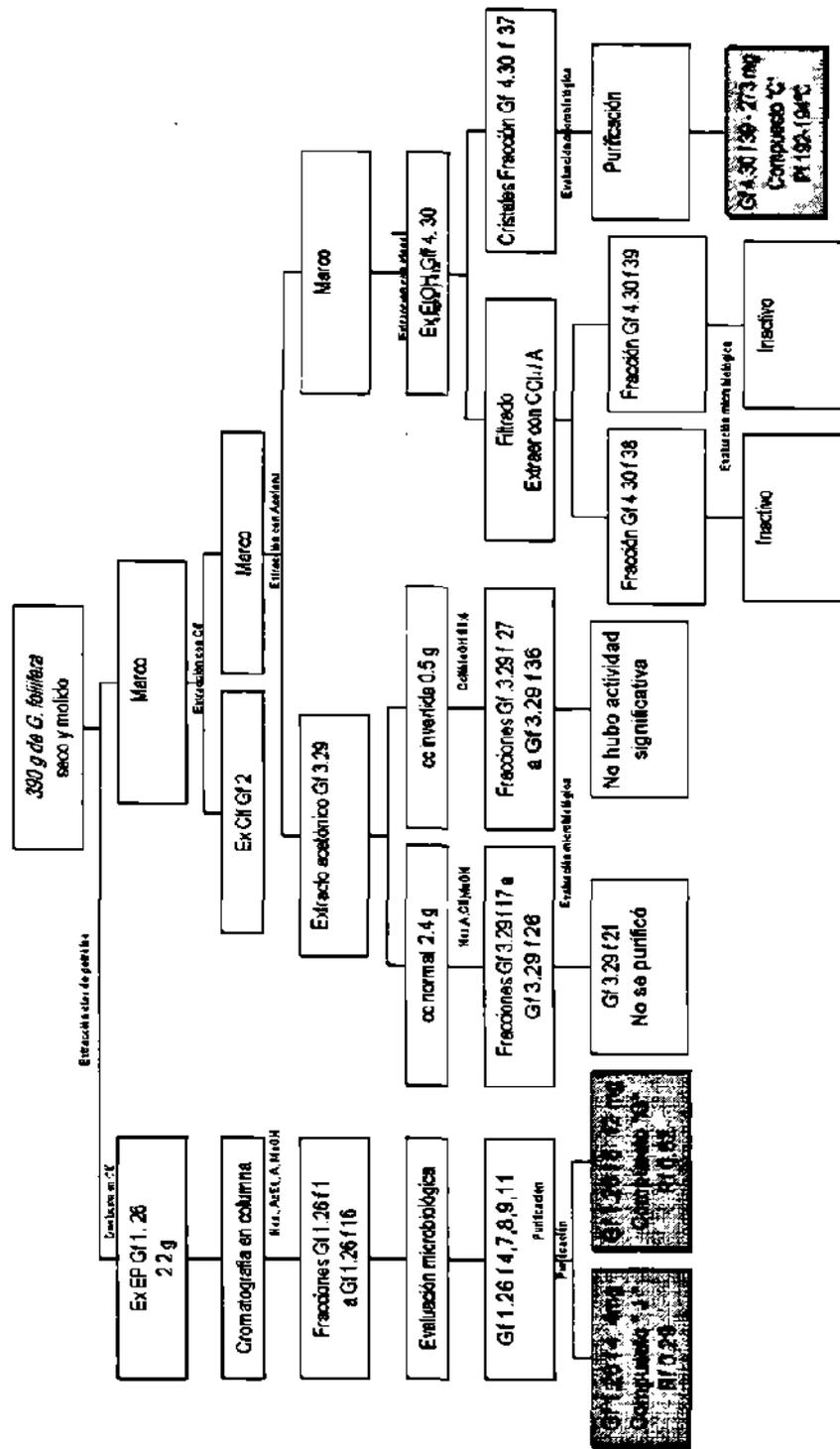


Fig. No. 10 Separación de fracciones de extractos de *Gracilaria foliifera*

con acetona con el mismo procedimiento obteniendo el residuo (2.9 g) denominado Gf 3.29 éste se dividió en dos partes; 2.4 g se separaron en CC con hexano, cloroformo, metanol y acetona en diferentes combinaciones , se obtuvieron 10 fracciones Gf 3.29 f 17 a Gf 3.29 f 26 y se les hizo la evaluación microbiológica.

La otra parte del extracto acetónico (0.5 g), se corrió en una columna preparativa invertida utilizando como eluente cloroformo/metanol 96:4; se obtuvieron las fracciones Gf 3.29 f 27 a Gf 3.29 f 36, las cuales fueron evaluadas microbiológicamente con el método ya descrito.

3.4.5. EXTRACTO Gf 4. 30

Este extracto fue obtenido por maceración continua con etanol de la parte no soluble en los solventes anteriores (marco) . Después de la evaporación bajo presión reducida del solvente en el residuo (3.09g), se obtuvieron cristales incoloros (2 g), a los que se les hizo la prueba de ignición y se les denominó Gf 4.30 f 37, el filtrado se extrajo con tetracloruro de carbono/ acetona para obtener los extractos Gf 4.30 f 38 y f 39 para realizarles la evaluación microbiológica posteriormente.

3.4.5.1 Fracción Gf 4 .30 f 37

Esta fracción fue purificada por medio de cristalizaciones con acetona y etanol. Se obtuvieron cristales incoloros alargados con un punto de fusión de 192-194°C al que se le denominó Compuesto " C ".

3.5 *Ulva lactuca*.

3.5.1.Preparación de los extractos. En la Fig. No. 11 se muestra el procedimiento que se llevó a cabo para obtener los extractos de esta especie: 30 g de la muestra seca y molida de *Ulva lactuca* se colocaron en un recipiente cerrado en un lugar oscuro, se extrajeron exhaustivamente por maceración con éter de petróleo por siete días a temperatura ambiente, esta extracción se repitió con cloroformo, acetona, etanol, metanol y agua; al término de este procedimiento, los extractos se evaporaron en rotavapor a presión reducida, se separaron por disolución en diferentes solventes procurando tener una concentración final de cada extracto de 2 a 3 mg / mL, se procedió a esterilizarlos con filtros de 0.45 μm y se guardaron a 5°C para el bioensayo.

3.5.2. Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos. Se tomó una asada de cada uno de los microorganismos utilizados, se activaron en tubos con BHI a 37°C por 16 horas, los cultivos fueron diluidos en serie, para obtener una concentración microbiana de 10^5 Unidades formadoras de colonias, de esta dilución se tomaron 100 μL y se inocularon en placas con agar Muller Hinton, se dispersaron con un tubo L, se hicieron 4 orificios de 6 mm de diámetro en cada caja Petri, con una pipeta Pasteur y en ellos se agregaron 50 μL de cada extracto con una pipeta Eppendorf, se incubaron por 24 horas a 37°C y se midió el halo de inhibición se repitió el procedimiento utilizando discos de papel filtro estéril impregnados con 10 μL del extracto.

4.- RESULTADOS

4.1.- Pruebas preliminares para elegir tipo de extracción

Para elegir el tipo de extracción se llevó a cabo CCF de los extractos obtenidos por los tres métodos probados; en el de percolación en columna se observaron menos manchas por lo que se optó hacer la evaluación microbiológica con los otros dos, maceración y Soxhlet. De acuerdo a los datos presentados en la tabla No. 1, el método de extracción en maceración en frío presenta mayor actividad antimicrobiana por lo que fue elegido para el desarrollo de este trabajo.

<i>Sargassum fluitans</i>								
Solvente	Tipo de Extracción	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. faecalis</i>
EP	Soxhlet	Neg	++	-	Neg	Neg	Neg	Neg
	Maceración	+++	++	+++	+	+	++	Neg
Clf	Soxhlet	++	-	+	Neg	Neg	Neg	-
	Maceración	+	+	++	Neg	+	+++	Neg
A	Soxhlet	+	+	Neg	+	Neg	Neg	Neg
	Maceración	+++	-	+	+	+	+	Neg
EtOH	Soxhlet	+++	Neg	Neg	+	Neg	Neg	-
	Maceración	++	+	+	++	Neg	+	Neg
MeOH	Soxhlet	-	-	-	-	+	+	+
	Maceración	+	-	Neg	+++	+	+	+++

<i>Ulva fasciata</i>								
Solvente	Tipo de Extracción	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. faecalis</i>
EP	Soxhlet	Neg	Neg	+	Neg	Neg	Neg	Neg
	Maceración	+++	+++	+	++	+++	+++	++
Clf	Soxhlet	-	-	-	-	-	-	-
	Maceración	+++	+	Neg	++	Neg	Neg	Neg
A	Soxhlet	+	Neg	++	+	-	Neg	-
	Maceración	++	Neg	+++	+	Neg	+	Neg
EtOH	Soxhlet	+	Neg	Neg	+	Neg	+	Neg
	Maceración	+++	Neg	+	+	+	+	Neg
MeOH	Soxhlet	+	+	Neg	+	+	-	+
	Maceración	+++	+	+	++	++	+	++

Tabla No. 1 Resultados comparativos de los halos de inhibición contra diferentes microorganismos de extractos obtenidos con extracción en soxhlet y maceración: (+++) mayor de 15 mm, (++) de 12 a 14 mm, (+) de 8 a 11 mm, (Neg) no hay actividad, (-) no se efectuó.

Sargassum fluitans

4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Con solventes de polaridad creciente, se obtuvieron 11 extractos que se enumeraron del Sf 1.1 a Sf 6.11, los datos representados en la tabla No. 2 indican que los extractos con mayor actividad fueron : el Sf 1.1 que corresponde al extracto etéreo soluble en etanol y el Sf 2.4 correspondiente al extracto clorofórmico soluble en etanol; estos fueron elegidos para fraccionarlos, probar la actividad de cada una de las fracciones y caracterizar su estructura química.

<i>Sargassum fluitans</i>									
Sf	Extraído	Soluble	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. faecalis</i>
1.1	Ep	EtOH	+++	++	+++	+	+	+++	Neg
1.2	Ep	A	-	+++	-	Neg	-	-	-
1.3	Ep	Clf	-	+++	-	-	-	-	-
2.4	Clf	EtOH	+	Neg	+++	+	Neg	+++	Neg
2.5	Clf	A	-	Neg	-	-	++	-	-
2.6	Clf	Clf	-	-	-	-	+	-	-
3.7	A	EtOH	+++	+++	+++	+	Neg	++	Neg
4.8	A	EtOH	++	+	+	Neg	+	++	Neg
4.9	EtOH	CH ₂ Cl ₂	-	-	-	++	Neg	-	Neg
5.10	MeOH	EtOH	+	Neg	+++	Neg	Neg	+	+++
6.11	Agua	Agua	-	-	-	Neg	Neg	Neg	-

Tabla No. 2. Resultados de la evaluación microbiológica de los extractos de *Sargassum fluitans*

4.3 Separación y evaluación biológica de los extractos activos.

4.3.1 Extracto Sf 1.1

Las 15 fracciones del extracto Sf 1.1 correspondiente al extracto etéreo soluble en etanol que se separaron por CC y se numeraron del Sf 1.1 f 1 al Sf 1.1 f 15

fueron evaluadas por su poder antibiótico contra *C. albicans* y *S. aureus* con el método ya explicado y de acuerdo a los datos presentados en la tabla No. 3, las fracciones que presentaron mayor actividad fueron las Sf 1.1 f 6, Sf 1.1 f 11 y Sf 1.1 F 15.

Fracciones de <i>Sargassum fluitans</i>					
Extracto etéreo			Extracto Clorofórmico		
Cromatografía en columna	Normal		Cromatografía en columna	Normal	
Fracción	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	Fracción	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Sf 1.1 f 1	Neg	Neg	Sf 2.4 f 1	+++	Neg
Sf 1.1 f 2	++	+	Sf 2.4 f 2	Neg	Neg
Sf 1.1 f 3	+	Neg	Sf 2.4 f 3	Neg	Neg
Sf 1.1 f 4	++	++	Sf 2.4 f 4	Neg	Neg
Sf 1.1 f 5	+	Neg	Sf 2.4 f 5	+++	+++
Sf 1.1 f 6 "I"	+++	+++	Sf 2.4 f 6	++	++
Sf 1.1 f 7	+++	++	Sf 2.4 f 7	+	Neg
Sf 1.1 f 8	Neg	++	Sf 2.4 f 8	+	Neg
Sf 1.1 f 9	++	+++	Sf 2.4 f 9	Neg	Neg
Sf 1.1 f 10	Neg	+	<u>Cromatografía</u>	<u>en columna</u>	<u>invertida</u>
Sf 1.1 f 11 "A"	+++	++++	Sf 2.4 f 10	++	+
Sf 1.1 f 12	+	Neg	Sf 2.4 f 11 "K"	+++	+++
Sf 1.1 f 13	Neg	Neg	Sf 2.4 f 12	+	Neg
Sf 1.1 f 14	Neg	+	Sf 2.4 f 13	+	Neg
Sf 1.1 f 15 "D"	+++	+++	Sf 2.4 f 14	+++	++

Tabla No. 3 Evaluación microbiológica de las fracciones del extracto etéreo y clorofórmico de *S. fluitans*.

4.3.1.1 Fracción Sf 1.1 f 6 Compuesto "I"

La fracción eluida con cloruro de metileno, la Sf 1.1 f 6 compuesto denominado "I" se separó en forma de aceite con un Rf 0.67, sus datos espectroscópicos son los siguientes:

Espectro de masas: m/z (abund). M⁺ no aparece 86.05 (2), 85.05 (2), 84.05 (52), 83.15 (2), 68.05 (6), 67.05 (2), 66.05 (100), 64.05 (3) Fig. 12 a.

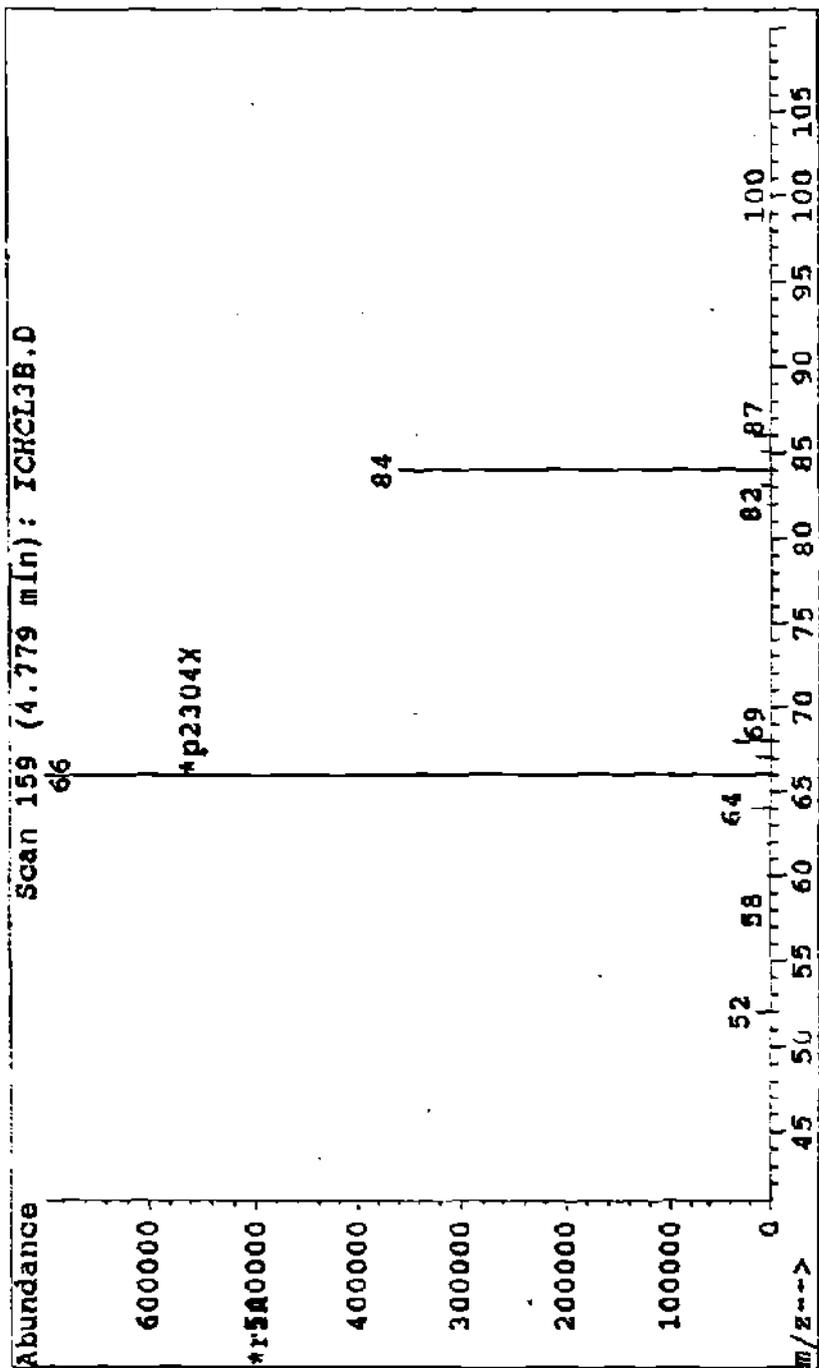


Fig. No. 12^a Espectro de masas del compuesto I

Muestra 1
 90% de TH

Current Data Parameters
 NAME Muestra1
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 9/16/13
 Time 15 01
 INSTRUM voice
 PROCNO 5
 PULPROG zgpg30
 TD 28
 FIDRES 32768
 SFO1 400.146
 NS 178
 DS 2
 SM 3183 908 Hz
 FIDRES 0.216235 Hz
 AQ 2.2607028 sec
 RG 40.3
 DN 65 800 usec
 DE 6 00 usec
 TE 300.2 K
 O1 1.50000000 sec
 D2 12 50 usec
 SFO1 400.146004 MHz
 MUC1 14
 PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
 S1 6192
 S2 400.1299976 MHz
 ROW no
 SSB 0
 LB 0 00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

10 MHz sub parameters
 C1 20 00 cm
 P1P 10 000 pas
 S1 400 30 Hz
 F2P 0 000 pas
 F2 0 00 Hz
 PPRC# 0 000000000
 MZCA 200 00000 107CA

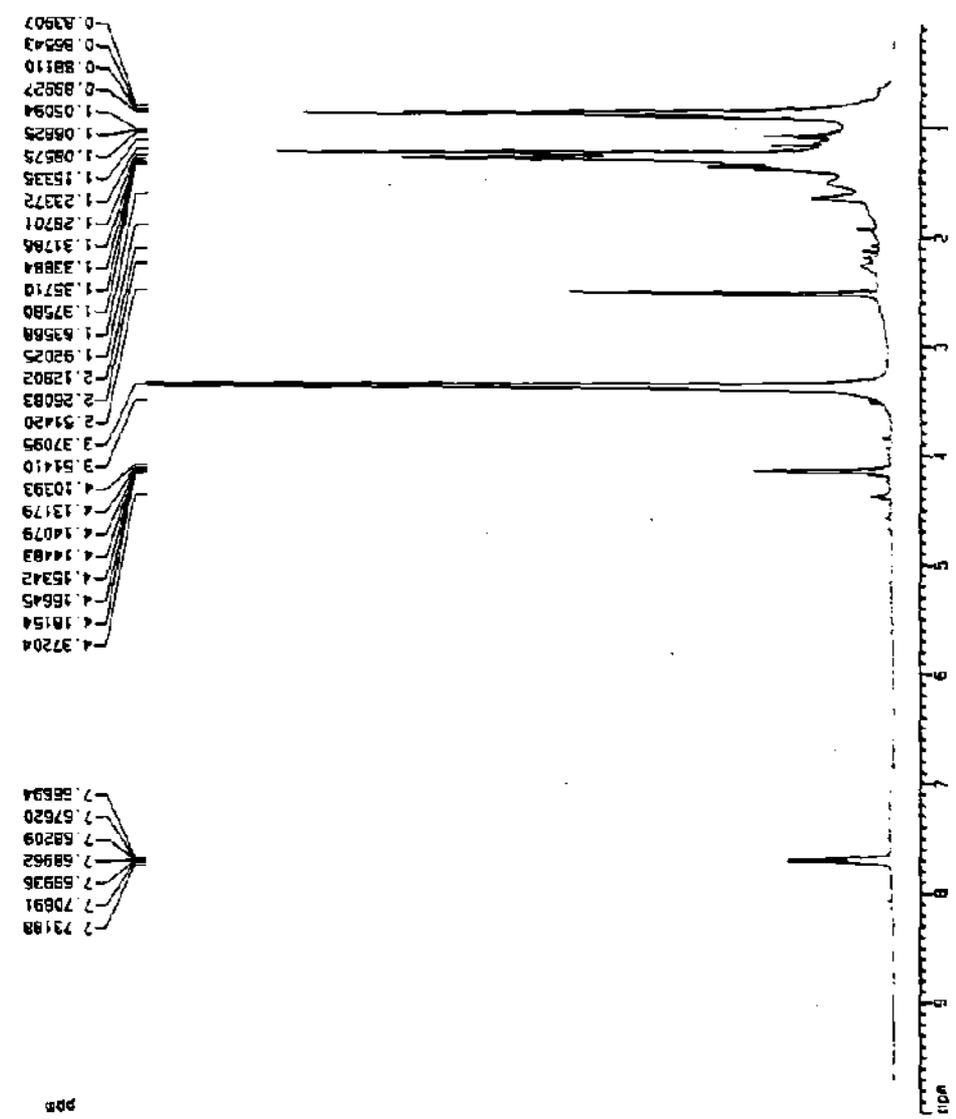


Fig. No. 12 Espectro ¹H del compuesto 1

MUGL132 I
 RMN DE 13C DM50

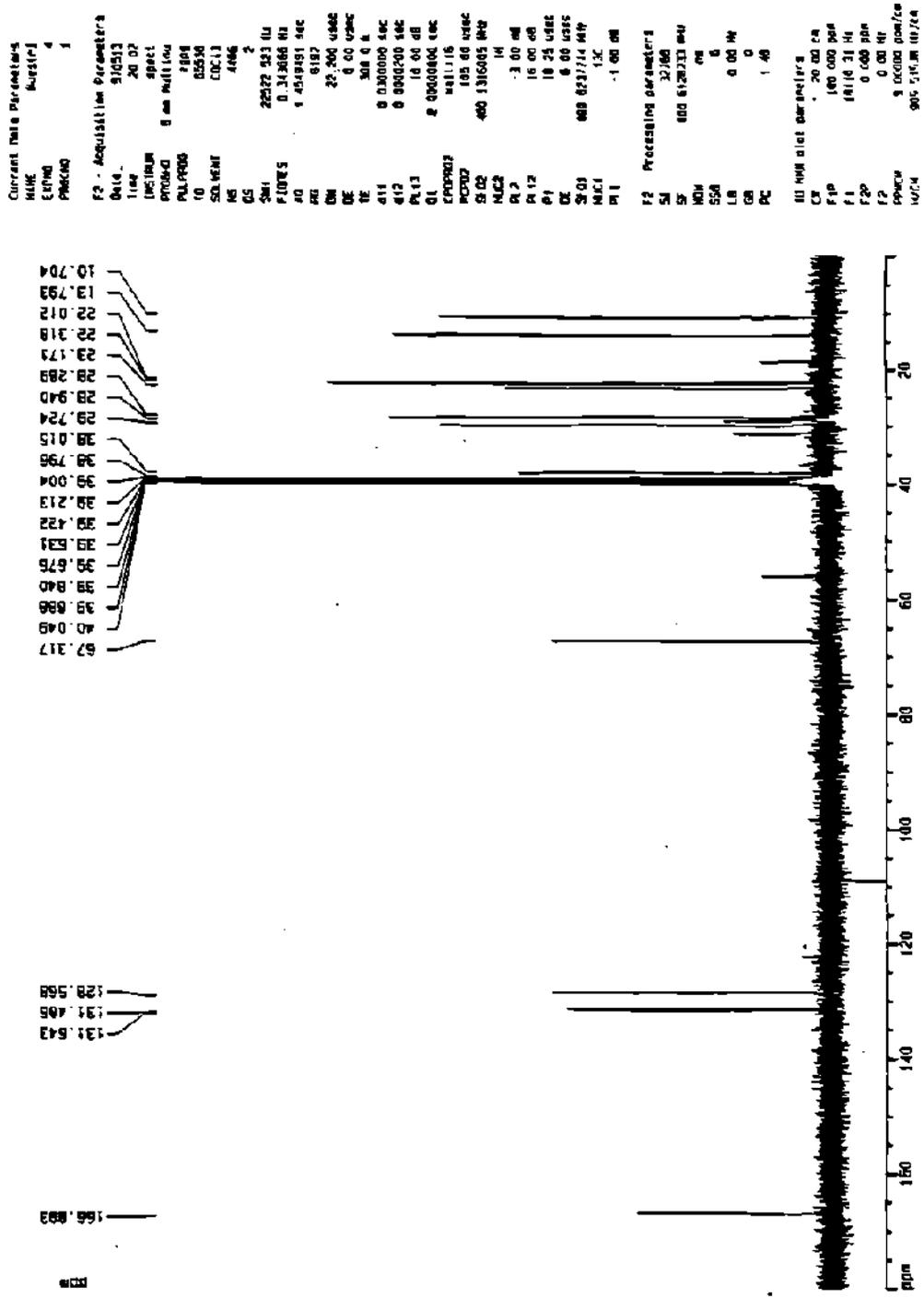
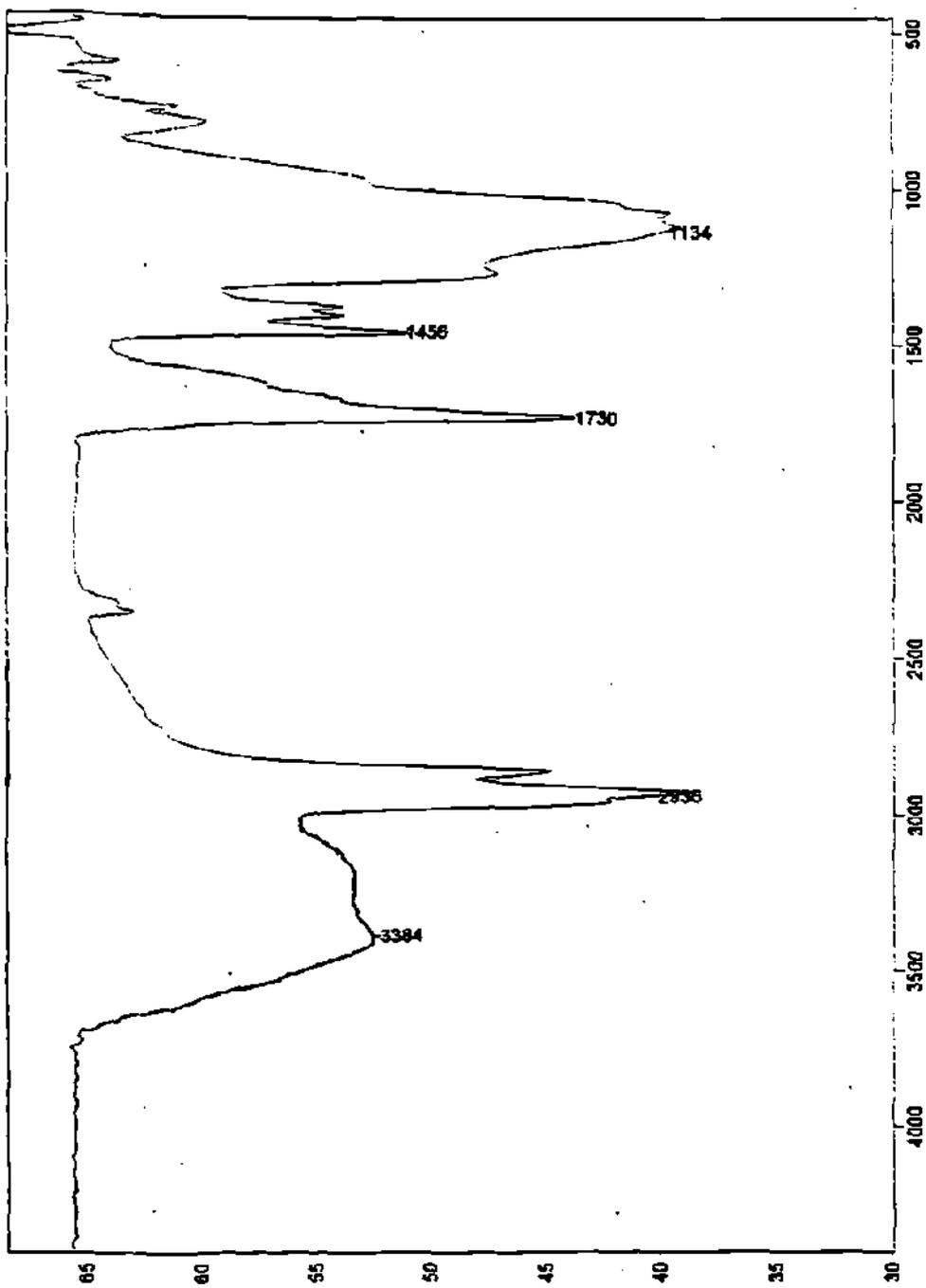


Fig. No. 13 Espectro ¹³C RMN del compuesto I



Number of Scans= 10 Apodization=

2/07/87 3:01 PM Res=4 cm-1

Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 2 . 1

Fig. No. 14 Espectro IR del compuesto I

Espectro de RMN ^1H : en ppm 0.88 (t), 1.28 (m), 4.15 (s), 7.67 (m) Fig. No. 12.

Espectro de RMN ^{13}C : en ppm. 10.71, 13.79, 22.32, 28.95, 29.73, 38.02, 67.32, 128.57, 131.49, 131.65, 166.90 Fig. No. 13

Espectro de IR: en cm^{-1} : 1730 (f), 1134 (f) Fig. No. 14

4.3.1.2. Fracción Sf 1.1 f 11, Compuesto "A"

El compuesto "A", fracción eluida con cloruro de metileno/ metanol 9 : 1 con un R_f 0.43 tiene los siguientes datos espectroscópicos:

Espectro de masas: m/z (abund). 312 M^+ (9.3), 269 (7.9), 157 (14.5), 143 (6.1), 129 (11.2), 101 (49.8), 88 (100), 69 (47.7), 55 (67.4) Fig. No. 15.

Espectro de RMN ^1H en ppm: 0.82 (6 H, m), 1.02 (3 H, t, J 6.9), 1.22 (25 H, m), 1.43 (3H d), 2.17 (2 H, t, J 6.9), 3.42 (2 H, t J 4.2), 4.13 (2H, s) Fig. No. 16.

Espectro de RMN ^{13}C : en ppm 13.52 (CH_3), 13.74 (CH_3), 18.14 (CH_3), 22.01 (CH_2), 24.41 (CH_2), 28.48 (Multiplete para 10 C), 31.22 (CH_2), 33.57 (CH_2) 56.94 (CH_2), 67.28 (CH_2), 174.35 (C=O) Fig. No. 17.

Espectros RMN de doble dimensión.

HETCOR: en ppm. Se encuentran coordinaciones entre los siguientes:

C 13 : H 0.8, C 18 : H 1.0, C 22 : H 1.2, C 24 : H 1.2, C 28 : H 1.2, C 31 : H 1.2, C 33 : H 2.1, C 56 : H 3.4, C 67 : H 4.1 Fig No. 18

DEPT: El DEPT 135° nos muestra un pico a 13.56 (CH_3), a 13.74 (CH_3) a 18.18 (CH_3), de 20 a 35 (cadena de CH_2) en 56.94 (CH_2) y 67.28 (CH_2) Fig. No. 19.

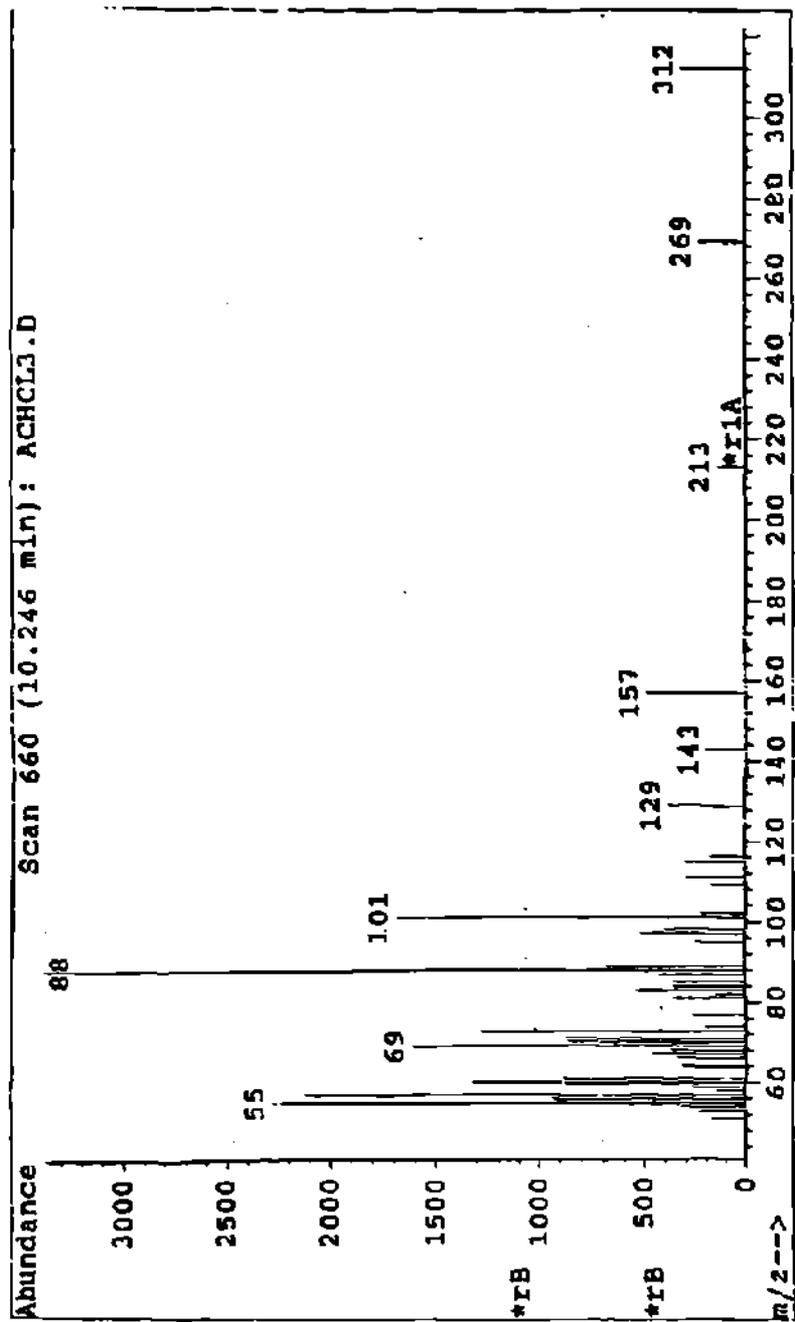
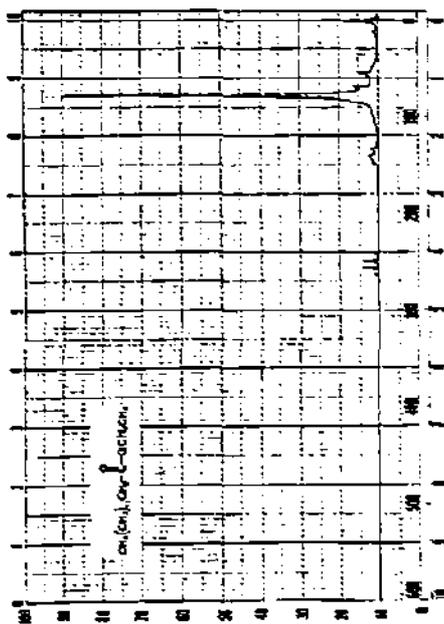


Fig. No. 15 Espectro de masas del compuesto A

MUSIELTA A

21331-A
 Ethyl acetate, 95%
 CH₃CO₂CH₃, Fw 12.54 mg 3335°
 Da 213.213143mm Bal. 2.378 W 3.2640
 Disp C



Current Data Parameters
 Name: Muselta
 ExpNo: 1
 Probnm: 1

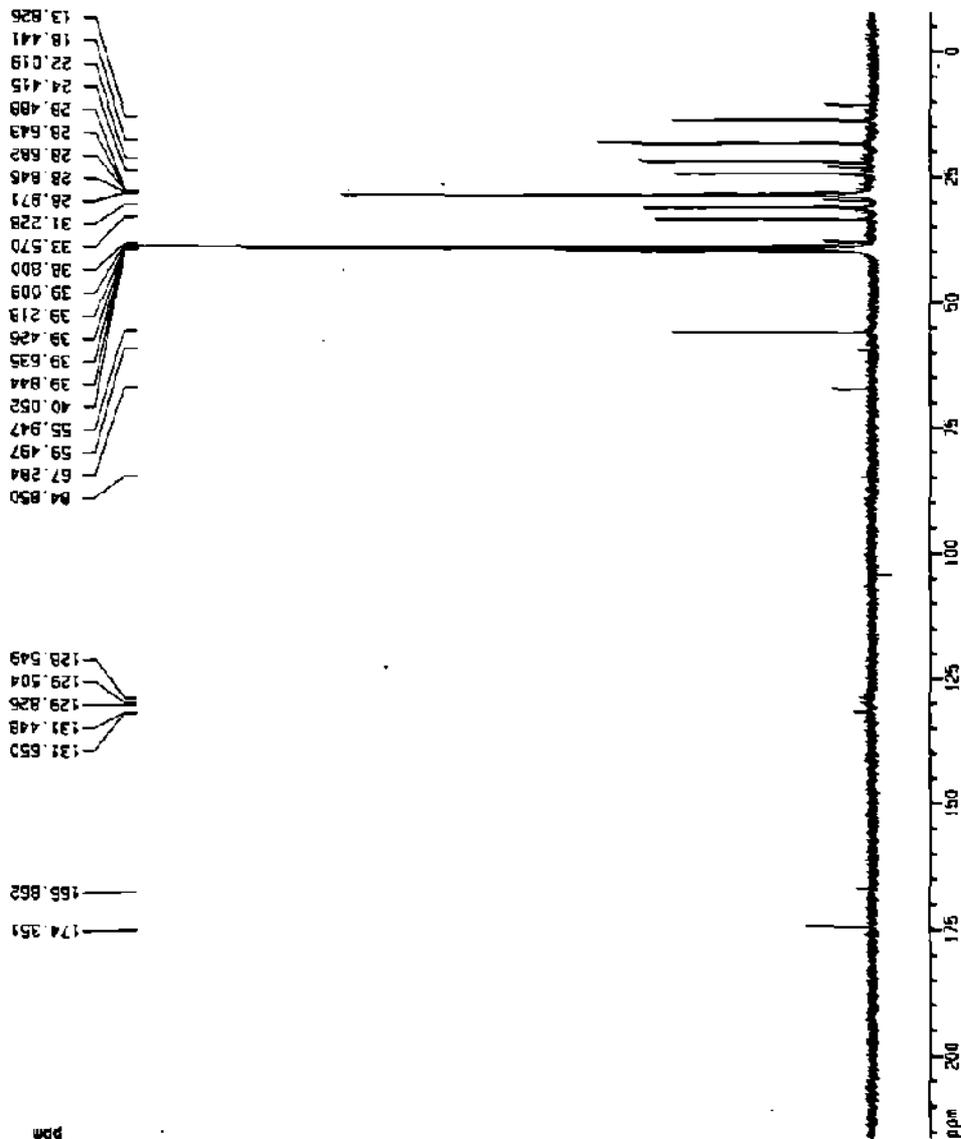
F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 9/25/05
 Time: 1.05
 Instnm: spect
 Prgnm: 5 mm Multinu
 PULPROG: zg
 TD: 32768
 SOLVENT: CDCl3
 NS: 128
 DS: 2
 SWH: 7483.908 Hz
 FIDRES: 0.219235 Hz
 AQ: 2.2007028 sec
 RG: 35.8
 DE: 68.000 usec
 QE: 6.00 usec
 TE: 300.2 K
 F1: 1.80000000 sec
 F2: 12.50 usec
 DE: 6.00 usec
 SFO: 400.1228084 MHz
 NUC1: 1H
 P1: 1.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI: 8192
 SF: 400.1315070 MHz
 KM: 6k
 SFO: 0
 LB: 0.30 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00

10 MHz plot parameters
 CX: 20.00 cm
 FIP: 15.000 ppm
 F1: 5601.71 Hz
 F2P: 0.000 ppm
 F2: 0.00 Hz
 PRACH: 0.65000 cm/cx
 WZCM: 280.08632 Hz/cx

Fig. No. 16 Espectro ¹H RMN del compuesto A

RMN 13C
MUESTRA A



Current Data Parameters
NAME Muestra
EXPNO 3
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 970503
Time 1 00
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Multinu
PULPROG zgpg
TD 65536
FIDRES 0.0013
SOLVENT CDCl3
NS 1627
DS 2
SWH 22522.523 Hz
FIDRES 0.34366 Hz
AQ 1.151491 sec
RG 32788
DF 22.200 usec
DE 6.00 usec
TE 300.0 K
AQ 0.000000 sec
RG 0.000000 sec
SI 2.0000000 sec
CROSSP2 waltz16
PCP02 105.08 usec
SFO2 400.1315005 MHz
NUC2 1H
PL2 -3.00 dB
PL12 15.00 dB
P1 10.25 usec
DE 8.00 usec
SFO1 160.629774 MHz
NUC1 13C
PL1 -1.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 32168
SF 100.6133017 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.40 Hz
GB 0
PC 1.41

NOISE 2188 parameters
CK 20.00 sec
FIP 216.045 ppm
F1 21736.95 Hz
F2P -7.807 ppm
F2 -785.54 Hz
PUNCH 11.19262 ppm/cm
MTCM 1128.12610 Hz/cm

Fig. No. 17 Espectro ¹³C RMN del compuesto A

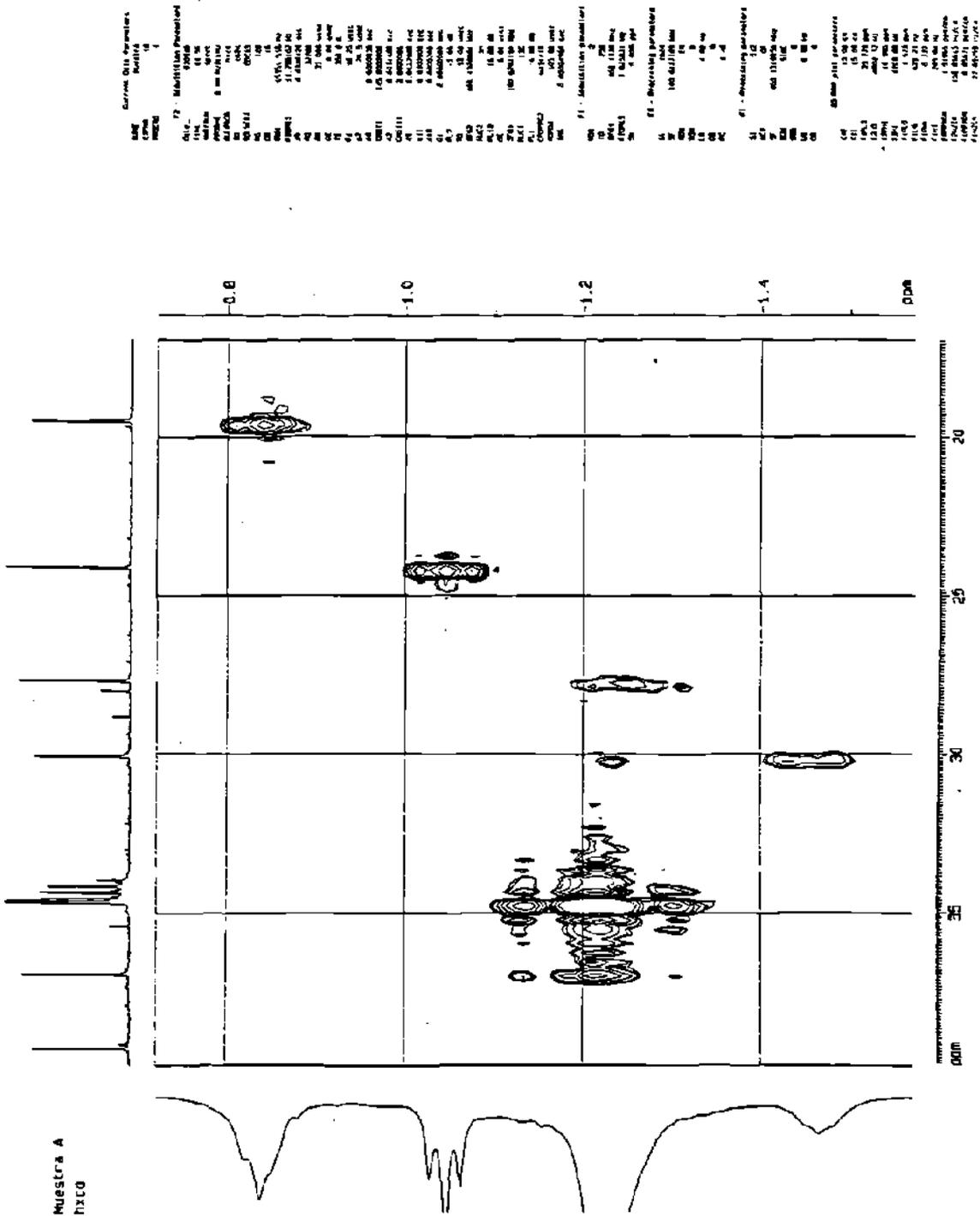


Fig. No. 18 Espectro HETCOR del compuesto A

DEPT 135
MUESTRA A

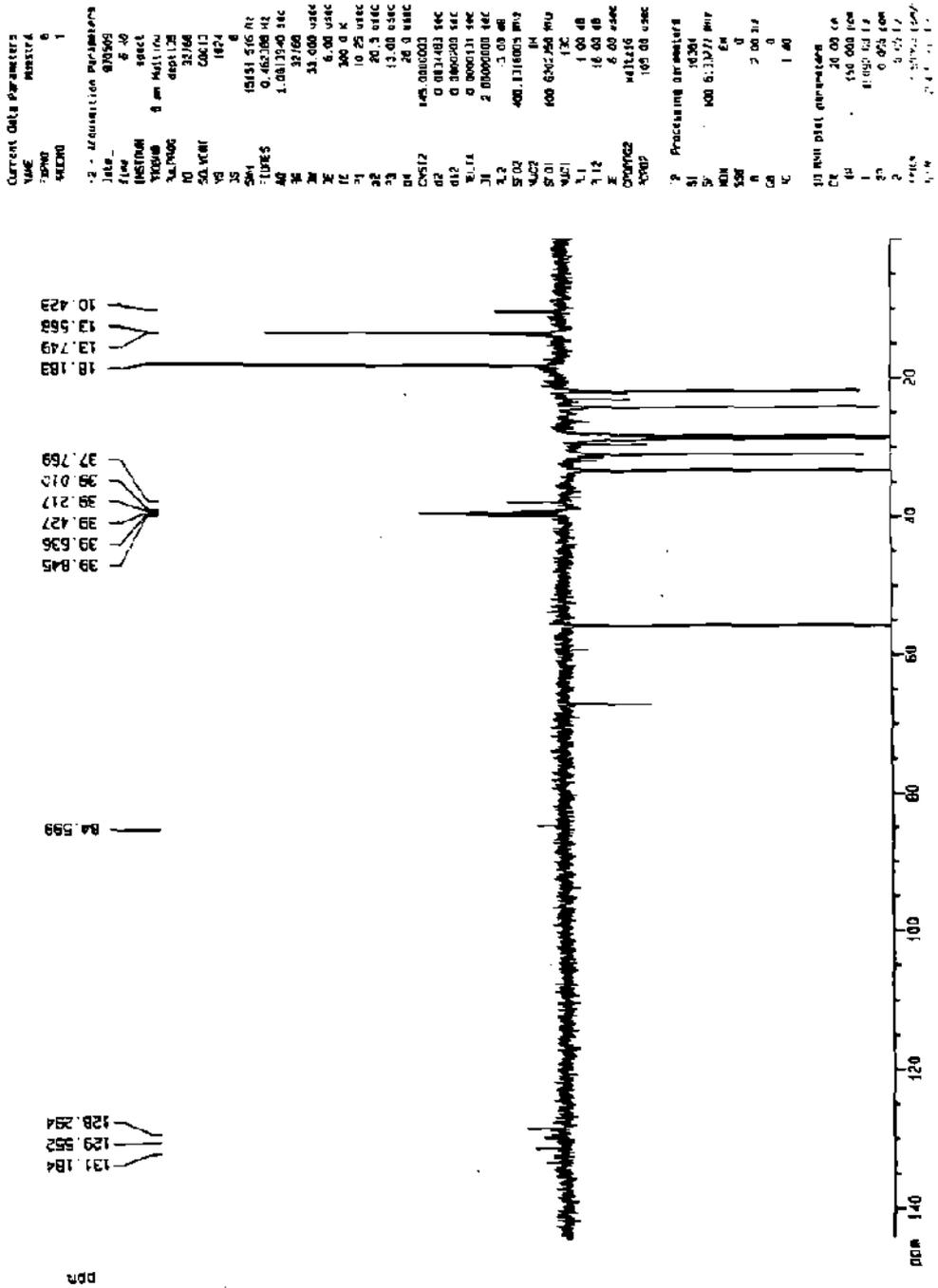


Fig. No. 19 Espectro DEPT 135° del compuesto A

Dept. 95
Muestra A

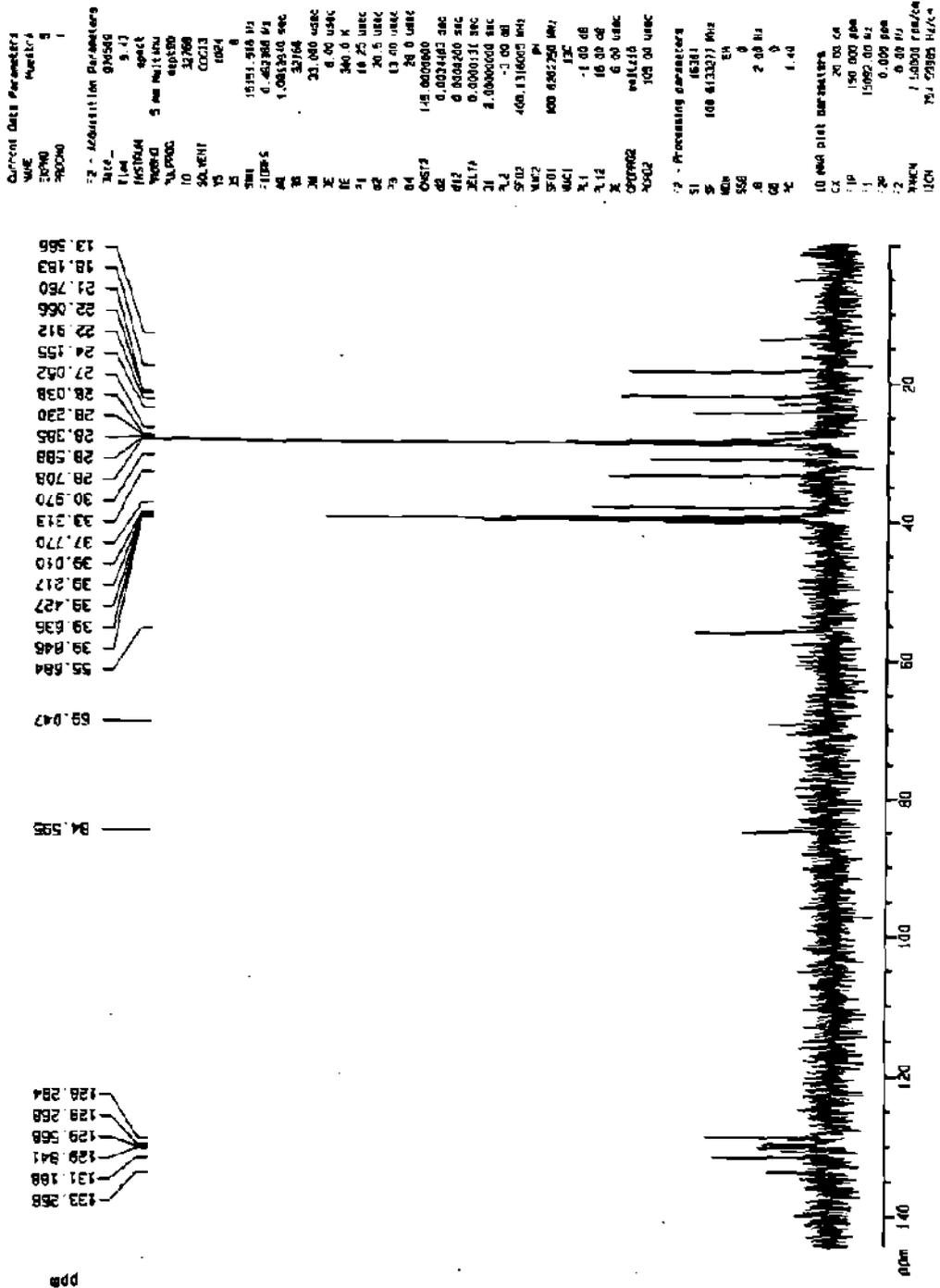


Fig. No. 20 Espectro DEPT 90° del compuesto A

Dept. 45
Muestra A

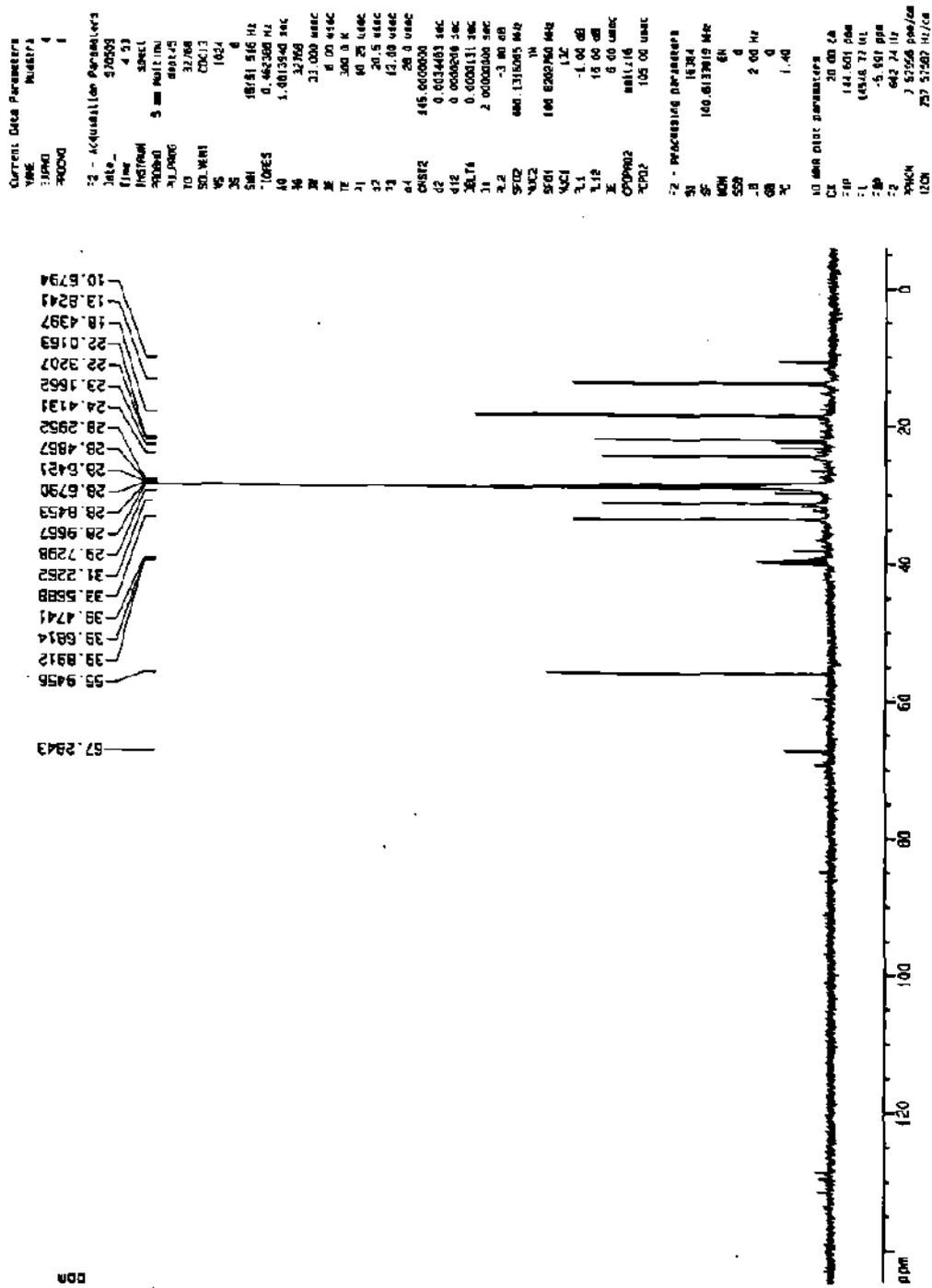
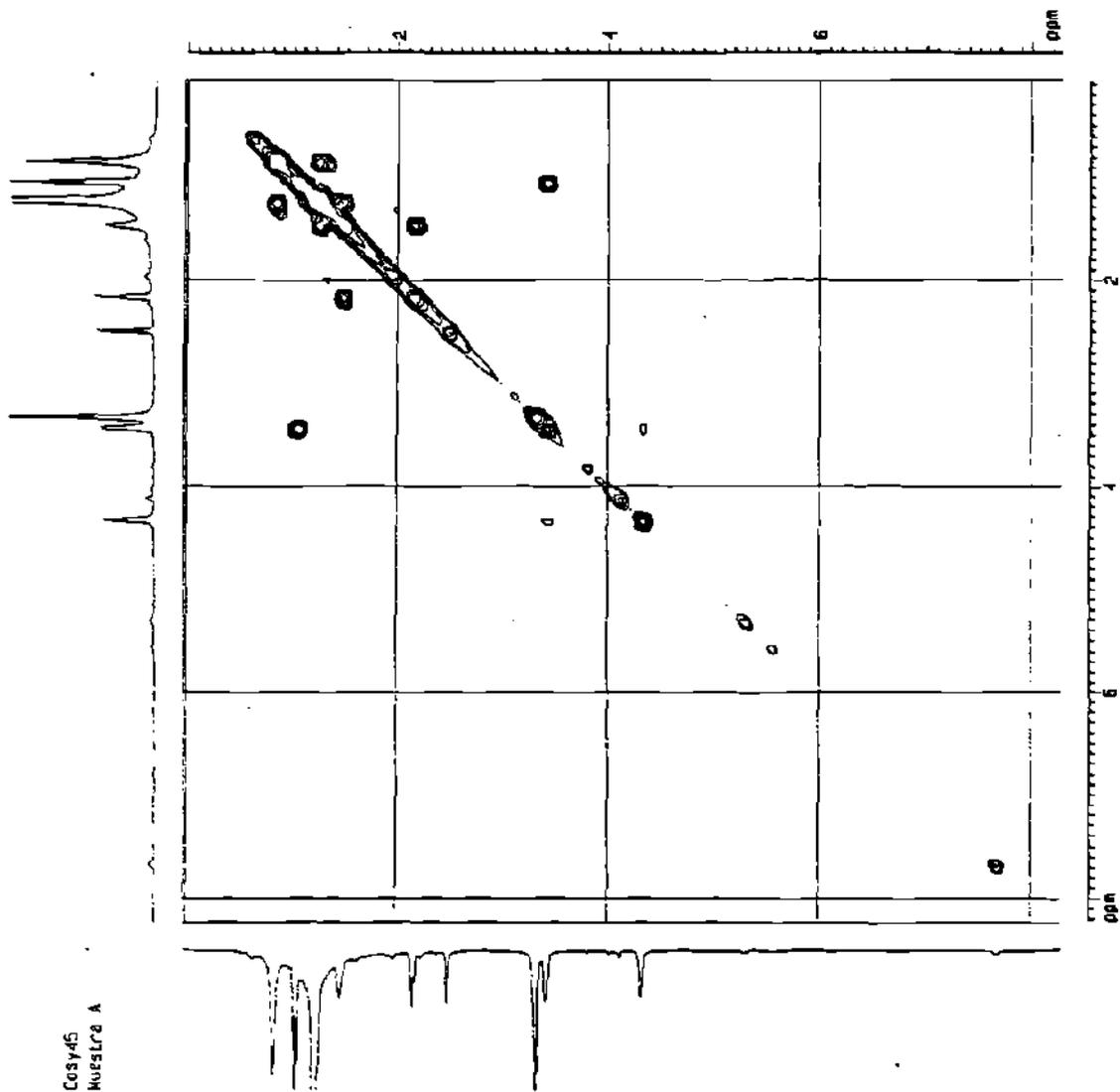


Fig. No. 21 Espectro DEPT 45° del compuesto A

Cosy45
Muestra A



Current Cell Parameters
Name: Muestra
Pulse: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_: 5/29/95
Time: 9:54
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Multicou
PULPROG: zgpg30
AQ: 1.00
RG: 655
ORIG: 0
FIDRES: 0.100000 Hz
SFO: 400.126061 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0
PC: 0.001250 sec

F1 - Acquisition Parameters
NUC1: 1
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Multicou
PULPROG: zgpg30
AQ: 1.00
RG: 655
ORIG: 0
FIDRES: 0.100000 Hz
SFO: 400.126061 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0
PC: 0.001250 sec

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 400.126061 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0
PC: 1.00

F1 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 400.126061 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0
PC: 1.00

2D NMR File Parameters
CEN: 15.00 MHz
CE1: 15.00 MHz
FPROG: zgpg30
PULPROG: zgpg30
AQ: 1.00
RG: 655
ORIG: 0
FIDRES: 0.100000 Hz
SFO: 400.126061 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0
PC: 1.00

Fig. No. 22 Espectro COSY del compuesto A

En el DEPT 90° : en ppm 13.56 (CH₃), 13.74 (CH₃), 18.18 (CH₃), 22.06 (CH₂), 24.15 (CH₂), 28 (Multiplete para 10 C), 31.01 (CH₂), 33.97 (CH₂), 56.68 (CH₂), 67.04 (CH₂) Fig. No.20.

En el DEPT 45° como principal señal tenemos a 28.67 ppm de un CH Fig. No. 21.

COSY: encontramos correlación entre los protones 0.8 (2 CH₃ m) : 1.2 (cadena de CH₂), 3.4 (CH₂) : 1.0 (CH₃), 2.1 (CH₂) : 1.8 (CH₂) Fig. No. 22.

Concentración Mínima Inhibitoria del compuesto "A"

La fracción Sf 1 f 11, Compuesto "A" fue la que presentó mayor halo de inhibición contra *C. albicans*, por lo que se hicieron diluciones para conocer la Concentración Mínima Inhibitoria, pudiéndose observar actividad en todas las concentraciones : 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 y 2.50 mg/mL, por lo que se reporta el MIC como 0.16 mg/mL.

4.3.1.3 Fracción Sf 1.1 f 15 Compuesto "D" El compuesto "D" corresponde a la fracción eluída con acetona/metanol 9 :1, con Rf 0.53 y cuyos datos espectroscópicos son los siguientes:

RMN ¹H en ppm: 0.89 (t) J 7, 1.25 (s), 1.46 (s), 2.35 (t) J 7, 4.21 (t) J 6, 7.71 (d) J 3, 7.53 (d) J 3 Fig. No. 23.

4.3.2 Extracto Sf 2.4 Este corresponde al clorofórmico y de él se obtuvieron 9 fracciones separadas por CC (Sf 2.4 f 1 a Sf 2.4 F 9) y 5 por cromatografía en columna invertida (Sf 2.4 f 10 a Sf 2.4 f 14) Fig. No. 7, a las cuales se les probó su actividad contra *C. albicans* y *S. aureus*, de acuerdo a los resultados presentados en la tabla No. 3, las fracciones más activas fueron Sf 2.4

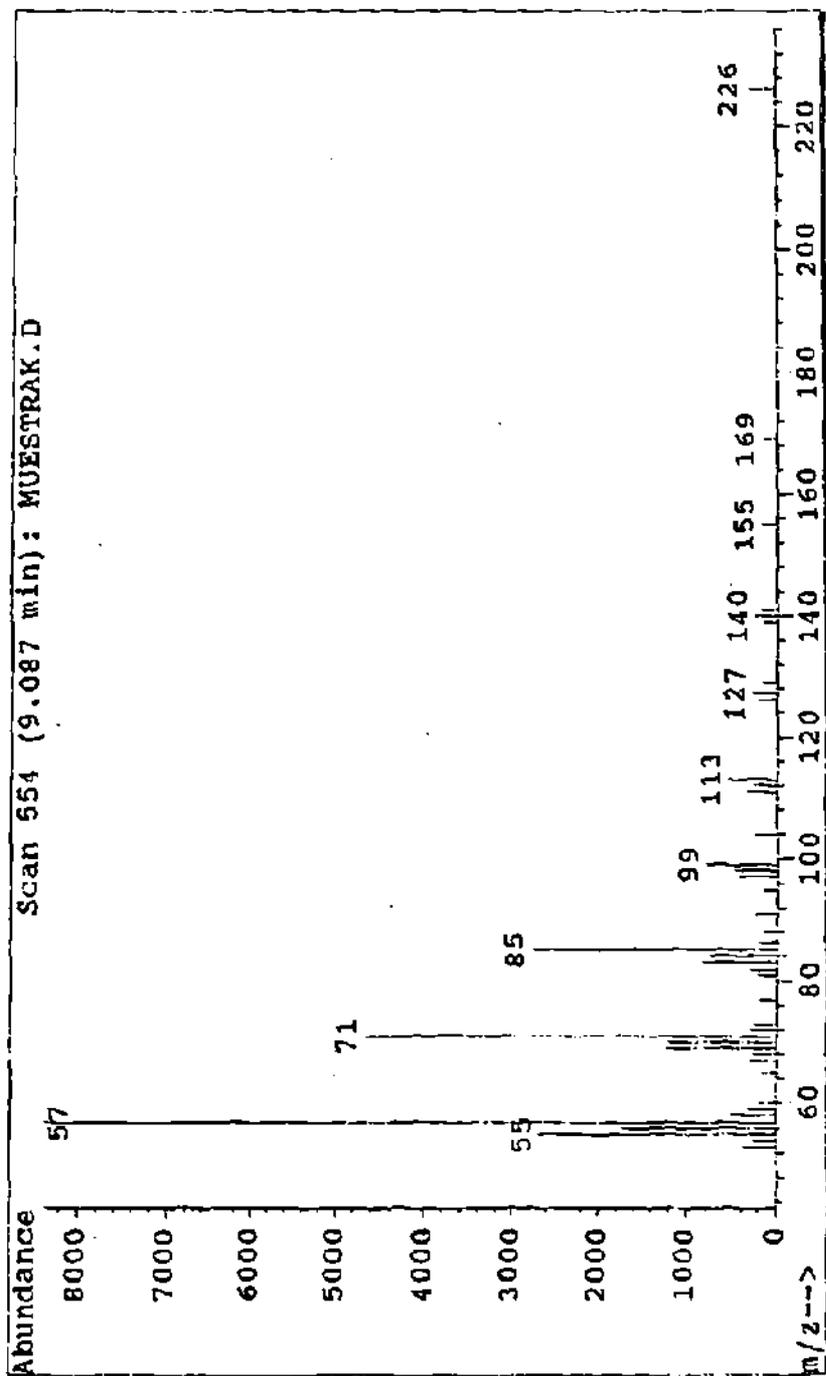


Fig. No. 24 Espectro de Masas del compuesto K

Muestra K

Current Data Parameters
NAME Muestrak
EXPNO 3
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 9/24/15
Time 18.35
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Nal110u
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 6
DS 2
SWH 6774.000 Hz
FIDRES 0.206358 Hz
AQ 2.416283 sec
RG 161
DM 73.000 UHRZ
DE 8.00 UHRZ
TE 300.0 K
D1 1.5000000 sec
P1 12.00 uhrz
DE 8.00 uhrz
SFO1 50.0
NUC1 13C
PL1 48
PL2 -3.00 48
F2 - Processing parameters
SI 6152
SF 400.1300146 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00
1D NMR parameters
CX 28.00 sec
F10 8.466 sec
F1 3201.04 Hz
F2 0.000 sec
F3 6.46 Hz
PCNCH 0.40000 sec/can
NCH 100.05258 Hz/can

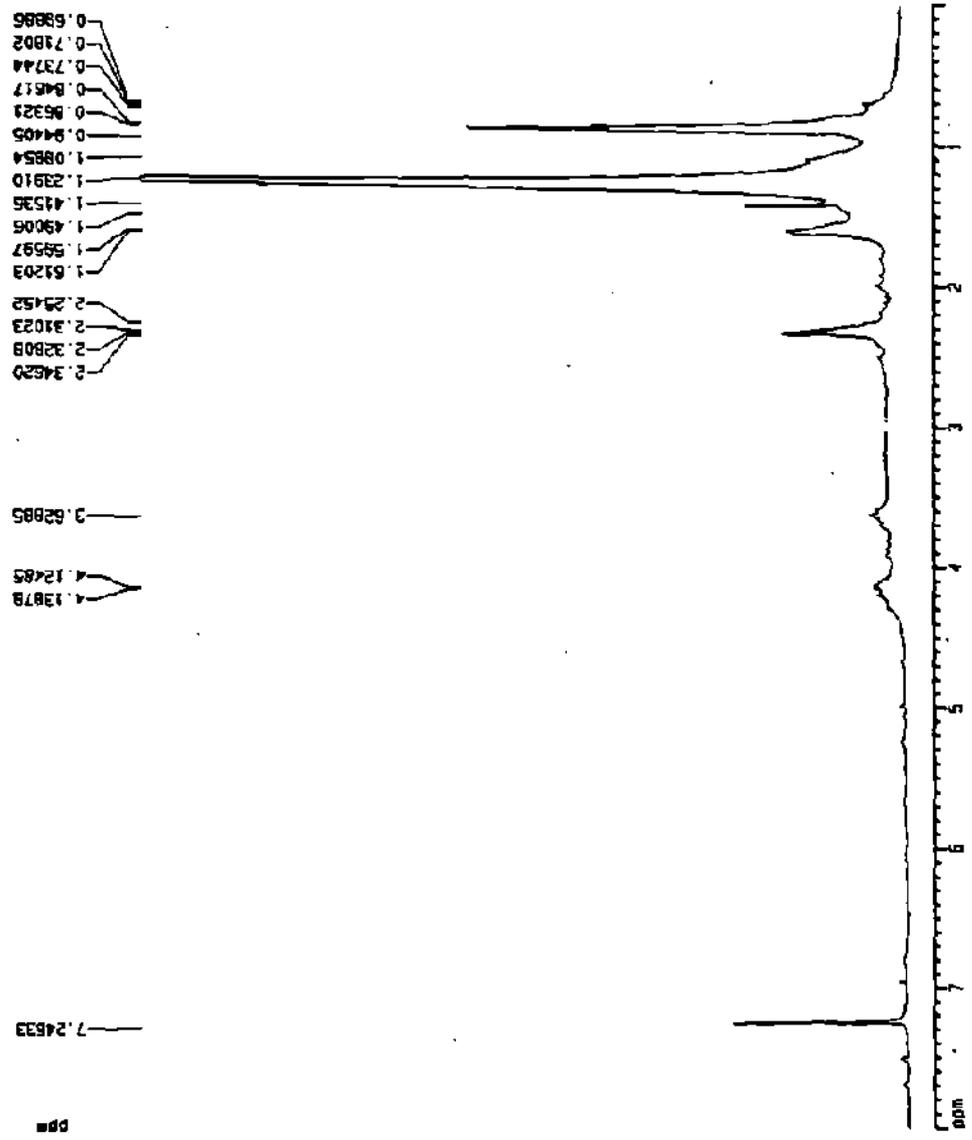
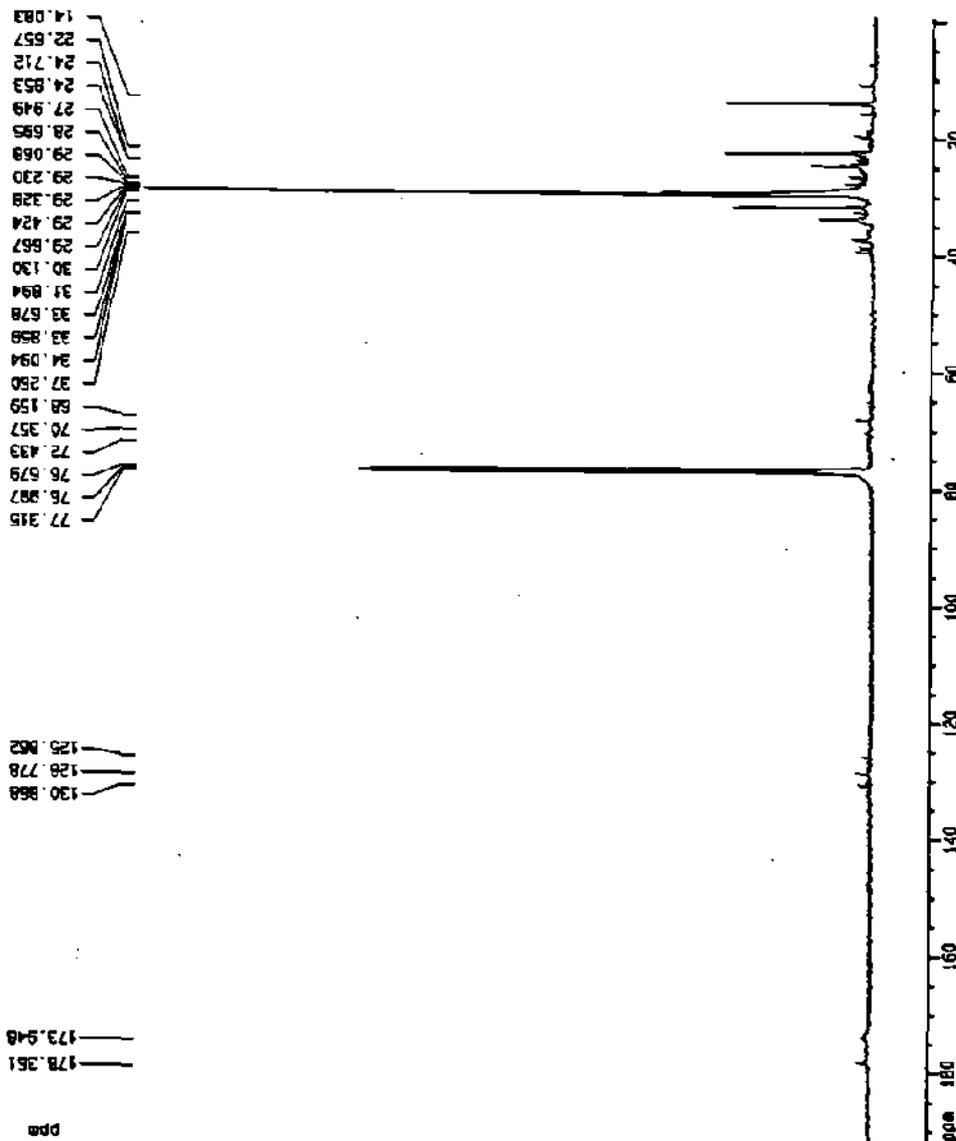


Fig. No. 25 Espectro ¹H RMN del compuesto K

Muestra K



Current Data Parameters
 NAME MuestraK
 EXPNO 2
 PROCNO 1

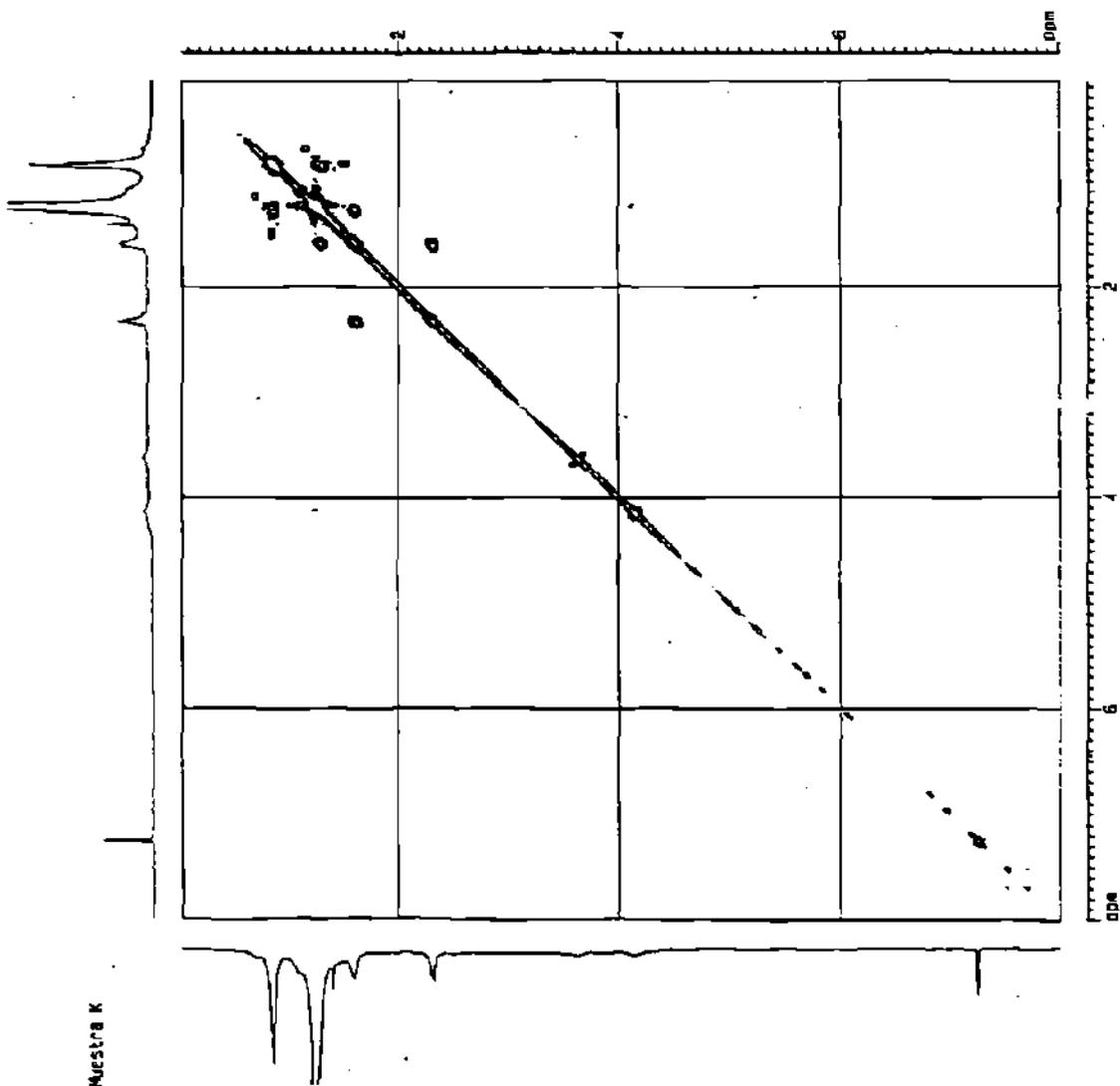
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 070720
 Time 12 33
 INSTRUM spect
 PROBR0 6 mm Multinu
 PULPROG zgpg30
 TO 2409
 SFO500 499.813
 CQC13 16.264
 NS 4
 SFO1 317.46531 MHz
 FIDRES 0.487400 MHz
 AQ 1.0322419 sec
 RG 32768
 DC 16.750 usec
 DE 0.00 usec
 TE 300.2 K
 D1 0.0200000 sec
 D12 0.0000000 sec
 PL13 16.04 dB
 D1 2.0000000 sec
 CPO4002 melt118
 SFO2 105.80 usec
 SFO3 400.1316063 MHz
 H1
 PL1 -1.00 dB
 PL2 -3.00 dB
 PL3 16.00 dB
 PL4 10.25 usec
 DE 6.00 usec
 SFO1 100.6261756 MHz
 H1C1 130
 PL1 -1.00 dB

F2 - Processing parameters
 S1 32768
 SF 100.6127113 MHz
 RM 64
 SSB 0
 LB 3.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

10 MHz shift parameters
 C3 20.00 Hz
 FIP 191.445 dB
 L1 19261.93 Hz
 C20 -4700.00 Hz
 C2 70.75 Hz
 PPM0 5.61195 ppm/Hz
 MUM 567.08591 Hz/Hz

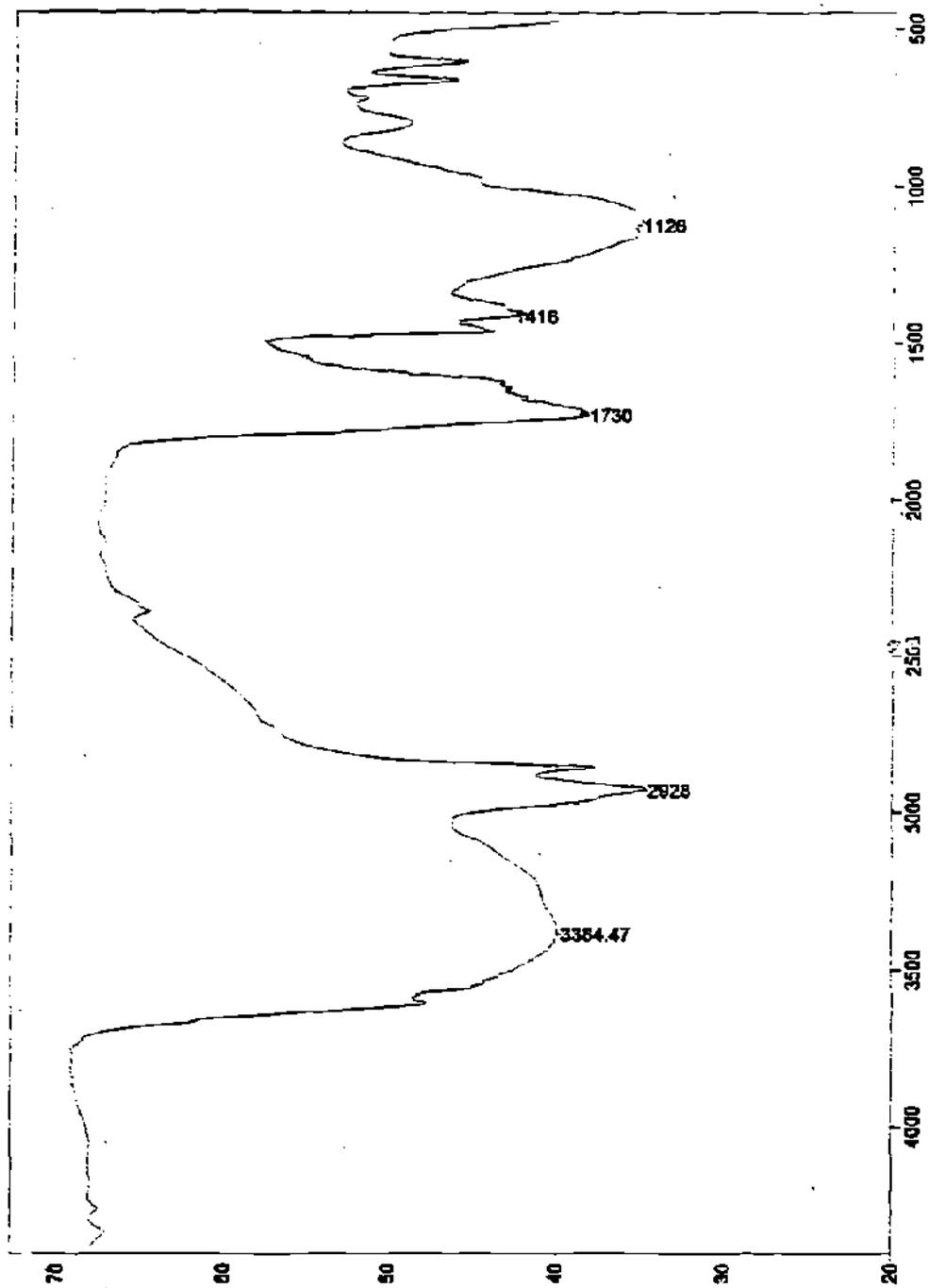
Fig. No. 26 Espectro ¹³C RMN del compuesto K

Muestra K



Name: Muestra K
 Exp: 1
 Proc: 1
 Date: 11/11/82
 Time: 11:11:11
 P1: 12.00
 P2: 12.00
 P3: 12.00
 P4: 12.00
 P5: 12.00
 P6: 12.00
 P7: 12.00
 P8: 12.00
 P9: 12.00
 P10: 12.00
 P11: 12.00
 P12: 12.00
 P13: 12.00
 P14: 12.00
 P15: 12.00
 P16: 12.00
 P17: 12.00
 P18: 12.00
 P19: 12.00
 P20: 12.00
 P21: 12.00
 P22: 12.00
 P23: 12.00
 P24: 12.00
 P25: 12.00
 P26: 12.00
 P27: 12.00
 P28: 12.00
 P29: 12.00
 P30: 12.00
 P31: 12.00
 P32: 12.00
 P33: 12.00
 P34: 12.00
 P35: 12.00
 P36: 12.00
 P37: 12.00
 P38: 12.00
 P39: 12.00
 P40: 12.00
 P41: 12.00
 P42: 12.00
 P43: 12.00
 P44: 12.00
 P45: 12.00
 P46: 12.00
 P47: 12.00
 P48: 12.00
 P49: 12.00
 P50: 12.00
 P51: 12.00
 P52: 12.00
 P53: 12.00
 P54: 12.00
 P55: 12.00
 P56: 12.00
 P57: 12.00
 P58: 12.00
 P59: 12.00
 P60: 12.00
 P61: 12.00
 P62: 12.00
 P63: 12.00
 P64: 12.00
 P65: 12.00
 P66: 12.00
 P67: 12.00
 P68: 12.00
 P69: 12.00
 P70: 12.00
 P71: 12.00
 P72: 12.00
 P73: 12.00
 P74: 12.00
 P75: 12.00
 P76: 12.00
 P77: 12.00
 P78: 12.00
 P79: 12.00
 P80: 12.00
 P81: 12.00
 P82: 12.00
 P83: 12.00
 P84: 12.00
 P85: 12.00
 P86: 12.00
 P87: 12.00
 P88: 12.00
 P89: 12.00
 P90: 12.00
 P91: 12.00
 P92: 12.00
 P93: 12.00
 P94: 12.00
 P95: 12.00
 P96: 12.00
 P97: 12.00
 P98: 12.00
 P99: 12.00
 P100: 12.00

Fig. No. 27 Espectro COSY del compuesto K



Number of Scans= 10 Apodization=
2/07/97 3:11 PM Res=4 cm-1

Transmittancia / Wavenumber (cm-1)
File # 2 : K

Fig. No. 28 Espectro IR del compuesto K

f 1 1 y Sf 2.4 f 5 de la cromatografía normal y la Sf 2.4 f 11 de la cromatografía invertida que fue la única que pudo purificarse

4.3.2.1 Fracción Sf 2.4 f 11, Compuesto “ K ”

Fracción obtenida en cromatografía en columna invertida usando benceno/ acetona 9 : 1, con un Rf 0.45 cuyos datos espectroscópicos fueron los siguientes:

Espectro de masas: m/z (abund). M^+ 226 (4), 169 (2.1), 140 (2.1), 127 (2.3), 113 (6.3), 99 (9.4), 85 (326), 71 (55.5), 57 (100), 55 (31.5) Fig No. 24.

RMN 1H en ppm. 0.86 (CH_3), 1.23 (cadena de CH_2), 1.61 ($(CH_3)_2$), 3.21 (CH_2), 3.62 (CH), 4.18 (CH) Fig. No. 25.

RMN ^{13}C en ppm. 14.08 (CH), 22.65 (CH), 24.71 (CH), 29 (cadena de CH_2), 33.67 (CH), 130.88 (CH), 128.77 (CH), 178.35 $C=O$ Fig. No. 26.

COSY Se encontró correlación entre los siguientes desplazamientos de protones:

0.8 con 1.2, 4.2 con 1.2 y 1.6 con 2.3 Fig. No. 27.

IR en cm^{-1} 2928 (f), 1730 (m), 1126 (f) Fig. No. 28

Ulva fasciata

4.4. Evaluación de los extractos obtenidos

Los datos representados en la tabla No. 5 nos indican que los extractos no tuvieron una actividad relevante en los microorganismos que nos interesan en este estudio (*Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*) por lo que no se llevó a cabo la separación ni evaluación de sus fracciones.

<i>Ulva fasciata</i>									
No.	Extraido	Soluble	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. faecalis</i>
Uf.1.12	EP	EtOH	+++	+	+	++	++	+++	+
Uf.1.13	EP	Clf	-	-	-	-	++	-	-
UF1.14	Clf	EtOH	+++	+	Neg	Neg	++	Neg	Neg
Uf 2.15	Clf	Clf	+++	-	++	Neg	Neg	Neg	Neg
Uf 3.16	A	EtOH	++	Neg	+	Neg	+	+	Neg
Uf 3.17	A	Clf	-	Neg	-	Neg	+	-	-
Uf 4.18	EtOH	EtOH	+++	-	Neg	++	Neg	++	Neg
Uf 4.19	EtOH	Agua	-	-	-	-	Neg	-	-
Uf 5.20	MeOH	EtOH	+++	+	++	++	++	+	++
Uf 5.21	MeOH	Agua	Neg	Neg	-	-	Neg	Neg	Neg
Uf 5.22	MeOH	EtOH	+++	Neg	-	-	Neg	-	-
Uf 6.23	Agua	EtOH	-	-	Neg	++	Neg	+++	Neg
Uf 6.24	Agua	A	+++	+	+	-	+	-	-
Uf 6.25	Agua	Agua	Neg	Neg	Neg	-	Neg	Neg	-

Tabla No. 5 Actividad de extractos obtenidos de *Ulva fasciata*.

Gracilaria foliifera

4.5. Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Se obtuvieron 10 extractos que fueron numerados como Gf 1.26 a Gf 1.35, se les realizó la evaluación microbiológica, y de acuerdo a los datos de la tabla No.6 encontramos que los siguientes tuvieron actividad : Ex Gf 1.26 (extracto etéreo soluble en cloroformo), Ex Gf 3.29 (extracto acetónico soluble en etanol) y el ExGf 4. 30 (extracto etanólico disuelto en etanol/A), los cuales fueron elegidos para realizar un fraccionamiento biodirigido.

<i>Gracilaria foliifera</i> ó <i>tikvahiae</i>									
Gf	Extraído	Soluble	E.coli	S. aureus	C.albicans	S.enteritidis	P.aeruginosa	S.epidermidis	S. faecalis
1.26	EP	Clf	-	+++	+++	++	-	+++	Neg
2.27	Clf	EtOH	++	+	+++	++	++	+++	Neg
2.28	Clf	Clf	+++	-	-	-	+	-	-
3.29	A	EtOH	+++	+++	+++	+	+++	++	Neg
4.30	EtOH	EtOH	+++	+++	+++	+	++	+	Neg
4.31	EtOH	EtOH-A	+++	-	++	Neg	Neg	Neg	Neg
5.32	MeOH	EtOH	++	+++	Neg	+++	++	++	-
5.33	MeOH	Clf	Neg	-	Neg	Neg	Neg	Neg	-
6.34	Agua	EtOH-A	Neg	Neg	Neg	-	++	Neg	-
6.35	Agua	A	+++	Neg	-	-	-	-	-

Tabla No. 6 Actividad antimicrobiana de extractos de *Gracilaria foliifera* o *tikvahiae*

4.5.1 Separación y evaluación microbiológica de extractos activos.

Se separaron 16 fracciones por medio de CC que fueron inscritas como Gf 1.26 f 1 a Gf 1.26 f 16, se evaluó su actividad antimicrobial por el método descrito y según los datos de la tabla No. 7, 5 fracciones resultaron activas: Gf 1.26 f 4, Gf 1.26 f 7, Gf 1.26 f 8, Gf 1.26 f 9 y Gf1.26 f 11, de las cuales solamente se pudieron purificar la Gf 1.26 f 4 y Gf 1.26 f 8.

<i>Gracilaria foliifera</i>								
Extracto etéreo			Extracto clorofórmico					
Columna normal			Columna Normal			Columna invertida		
Fracción	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	Fracción	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	Fracción	<i>S.aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Gf			Gf			Gf		
1.26 f 1	+	Neg	3.29 f 17	Neg	Neg	3.29 f 27	Neg	Neg
1.26 f 2	+	+	3.29 f 18	Neg	Neg	3.29 f 28	Neg	Neg
1.26 f 3	++	Neg	3.29 f 19	Neg	Neg	3.29 f 29	Neg	+++
1.26 f 4 "J"	++	+++	3.29 f 20	Neg	Neg	3.29 f 30	++	+
1.26 f 5	+	Neg	3.29 f 21	+++	Neg	3.29 f 31	Neg	+
1.26 f 6	Neg	+++	3.29 f 22	Neg	Neg	3.29 f 32	Neg	Neg
1.26 f 7	+++	++	3.29 f 23	Neg	Neg	3.29 f 33	Neg	Neg
1.26 f 8 "G"	+++	++	3.29 f 24	+	++	3.29 f 34	Neg	++
1.26 f 9	+++	+	3.29 f 25	Neg	Neg	3.29 f 35	Neg	Neg
1.26 f 10	Neg	+++	3.29 f 26	+	+++	3.29 f 36	Neg	Neg
1.26 f 11	+++	+						
1.26 f 12	Neg	Neg	Extracto etánolico					
1.26 f 13	Neg	Neg	Fracción					
1.26 f 14	Neg	+	Gf					
1.26 f 15	++	+	4.30 f 37 "C"	++				
1.26 f 16	Neg	Neg	4.30 f 38	Neg				
			4.30 f 39	+				

Tabla No. 7 Actividad inhibitoria de fracciones de extractos de *Gracilaria foliifera* contra diferentes cepas de microorganismos.

4.5.1.1. Fracción Gf 1.26 f 4 Compuesto " J "

La fracción Gf 1.26 f 4 obtenida con la elución hexano/acetona 8:2 con un Rf 0.29, presenta los siguientes datos de espectros:

RMN ¹H en ppm. 0.80 (CH₃), 1.30 (CH₂), 4.82 y 5.41 H vinílicos Fig No 29

RMN ¹³C en ppm . 14.21 (CH₃), 19.78 (CH₃), 29 (cadena de CH₂), 118 a 129 (carbonos de dobles enlaces) Fig. No. 30

4.5.1.2.Fracción Gf 1.26 f 8. Compuesto " G "

La fracción eluída con A/MeOH 8:2 Gf 1.26 f 8 compuesto " G " con Rf 0.62, presenta los siguientes datos espectroscópicos:

Muestra J
RMN de 1H

Current Data Parameters
 NAME MuestraJ
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 970513
 Time 15.42
 PROBR1 5 nm Multispec
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 17
 DS 2
 SWH 1163.966 Hz
 FIDRES 0.219235 Hz
 AQ 2.2607026 sec
 RG 8
 DM 60.000 usec
 DE 0.00 usec
 TE 300.0 K
 O1 1.50000000 sec
 F1 13.00 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 400.1320032 MHz
 NUC1 1H
 PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 6192
 SF 400.1300216 MHz
 WCN EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

30 MHz list parameters
 CH 20.00 cm
 F1P 10.000 ppm
 F1 4681.50 Hz
 F2P 0.000 ppm
 F2 0.00 Hz
 POUCH 0.00000 ppm/cm
 HZCM 260.06558 Hz/cm

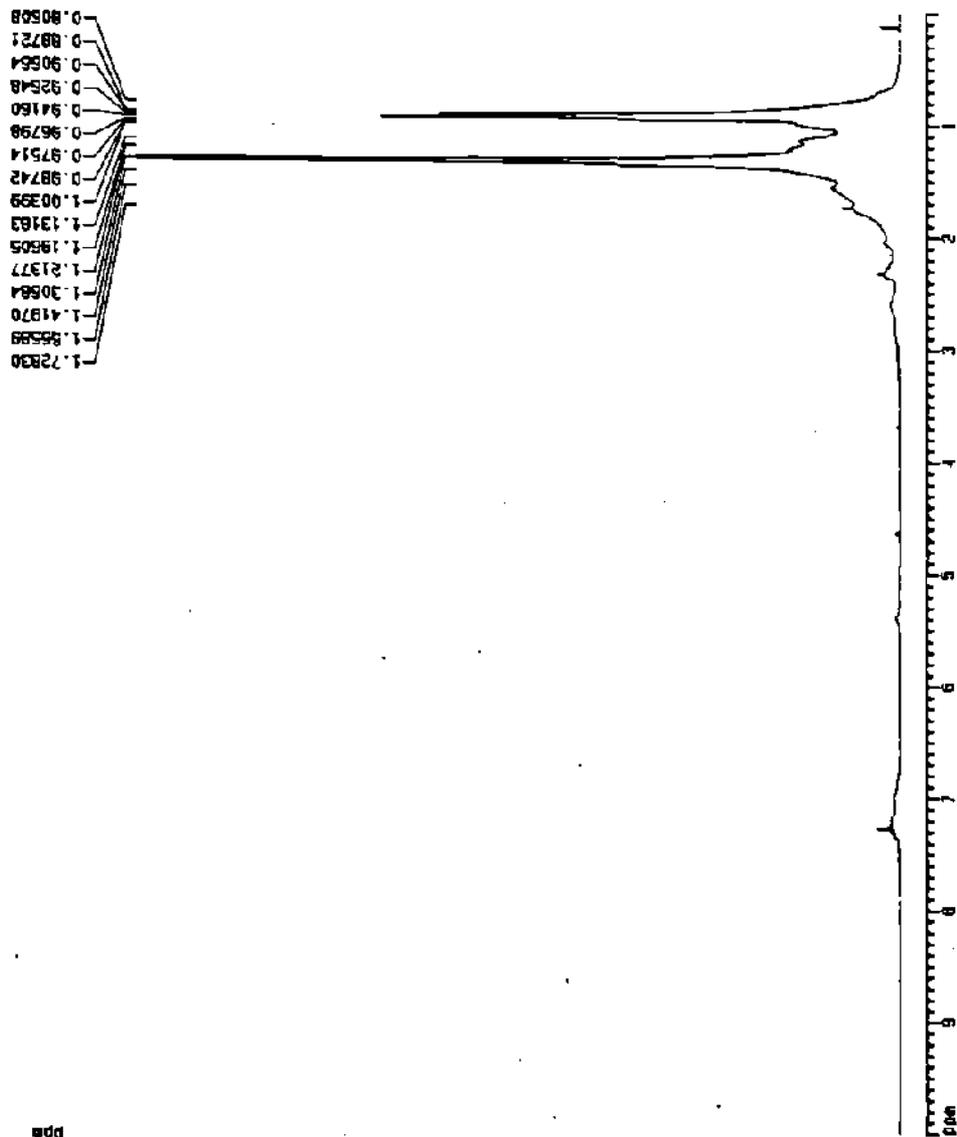


Fig. No. 29 Espectro ¹H RMN del compuesto J

Muestra J
 RMN de ¹³C

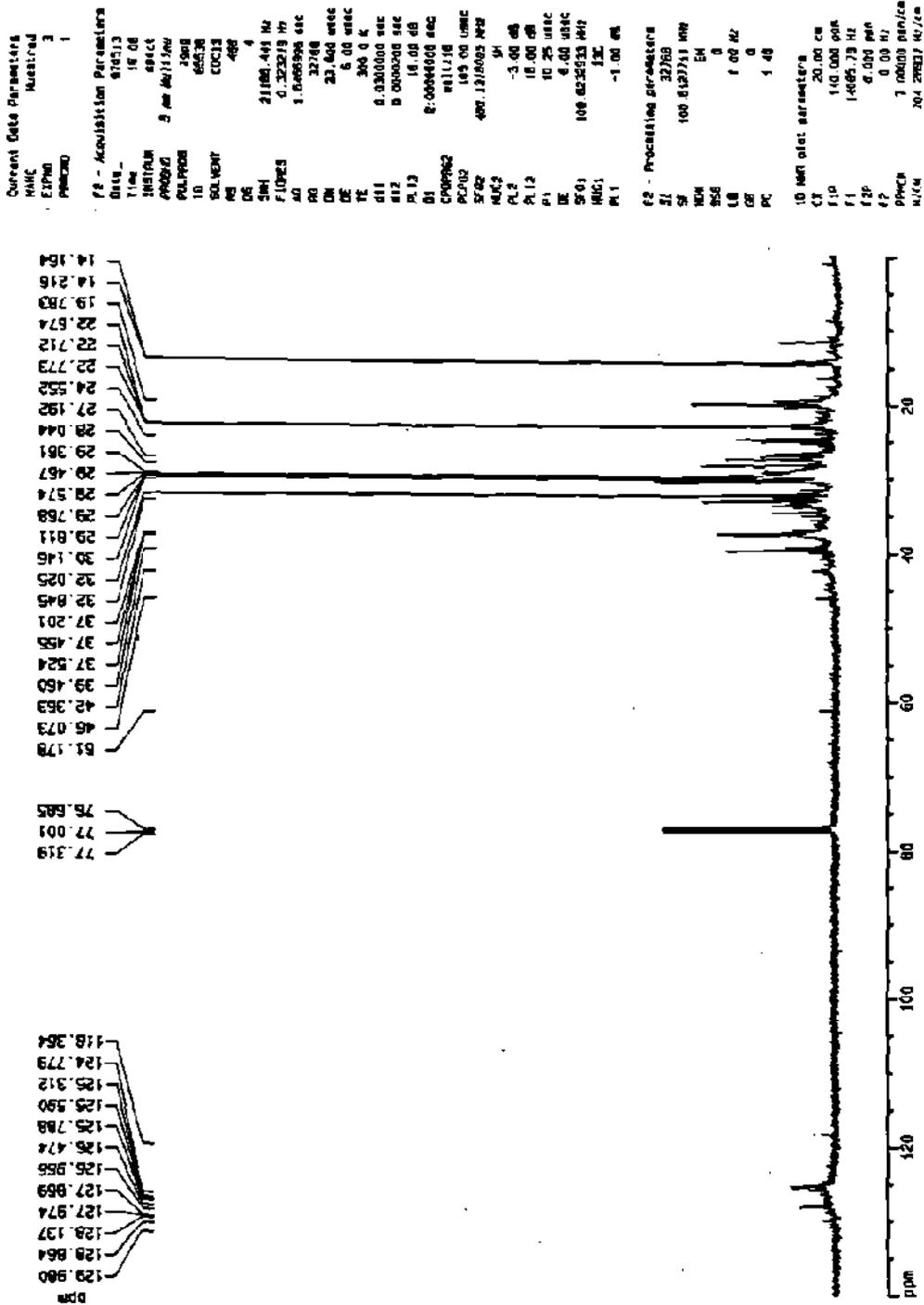


Fig. No. 30 Espectro ¹³C RMN del compuesto J

Espectro IR. 3384 (f), 2986 (m), 1667 (f), 1406 (m), 1035 (d).Fig No.31

Espectro de masas. m/z (abundancia) No aparece ión molecular, 173 (1.4), 161 (0.52), 143 (4.5), 98 (18.5), 83 (33.2), 71 (100), 56 (41.1) Fig. No. 32.

Espectro RMN ¹H en ppm. 1.28, 1.35 (J 17),1.66 (J 5), 2.31, 2.65, 2.97, 3.04, 3.40, 3.48, 3.55, 3.63, 3.98, 4.05, 4.15 , 4.18 (J 10), 4.26, 4.348, 4.47, 4.49, 5.16 (J 16), 6.43, 7.24, 8.15 Fig. No.33.

COSY. Coordinación de protones 6.43 con 2.31 y con 2.65, 3.63 con 4.34, 4.26 con 4.49, 1.66 con 3.04, 1.28 con 1.66, 1.98 con 1.66 Fig. No. 34.

Espectro RMN ¹³C en ppm. 13.93, 20.73, 22.47, 23.40, 25.46, 27.59, 28.49, 29.07, 31.72, 52.95, 53.89, 55.09, 69.68, 69.84, 71.03, 95.91, 125.98, 128.55, 156.71, 157.91, 209.67, 213.27 Fig. No. 35.

4.5.2. Extracto Gf 3.29

El extracto Gf 3.29 correspondiente al obtenido con acetona y disuelto en etanol, se separó por CC, se obtuvieron 10 fracciones Gf 3.29 f 17 a Gf 3.29 f 27, a las cuales se les hizo la evaluación microbiológica (Tabla No.7) teniendo actividad relevante dos de ellas: la Gf 3.29 f 21 y la Gf 3.29 f 26, pero no se pudieron purificar ni caracterizar químicamente.

La otra parte del extracto acetónico (0.32 g), se corrió en una columna preparativa invertida utilizando como eluente cloroformo/metanol 96:4; se obtuvieron las fracciones Gf 3.29 f 27 a Gf 3.29 f 36 las cuales resultaron inactivas en los bioensayos que se realizaron (Tabla No. 7).

Transmittance / Wavenumber (cm⁻¹)
File # 2 : G

Number of Scans = 10 Apodization =
2/07/97 2:54 PM Res = 4 cm⁻¹

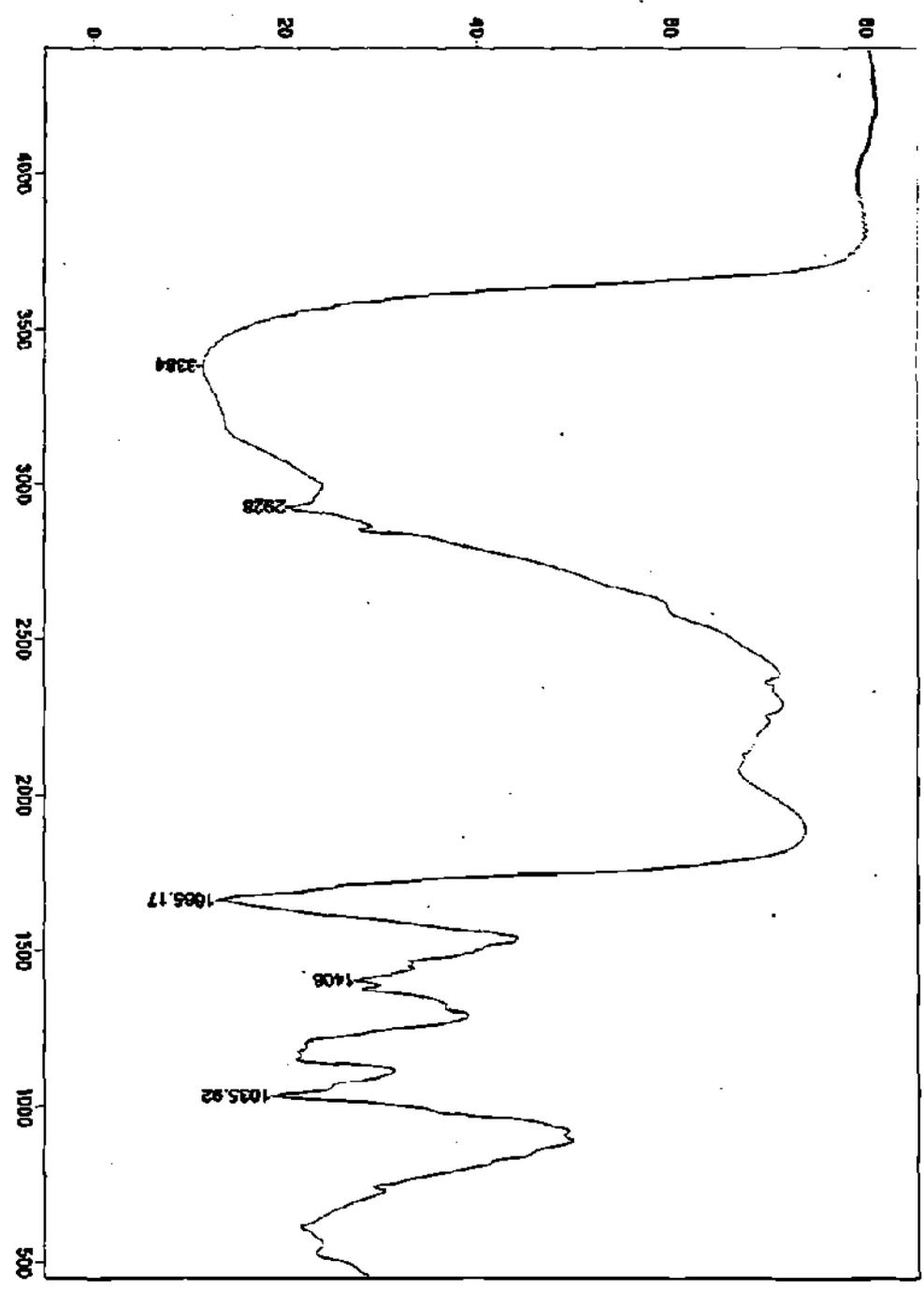


Fig. No. 31 Espectro IR del compuesto G

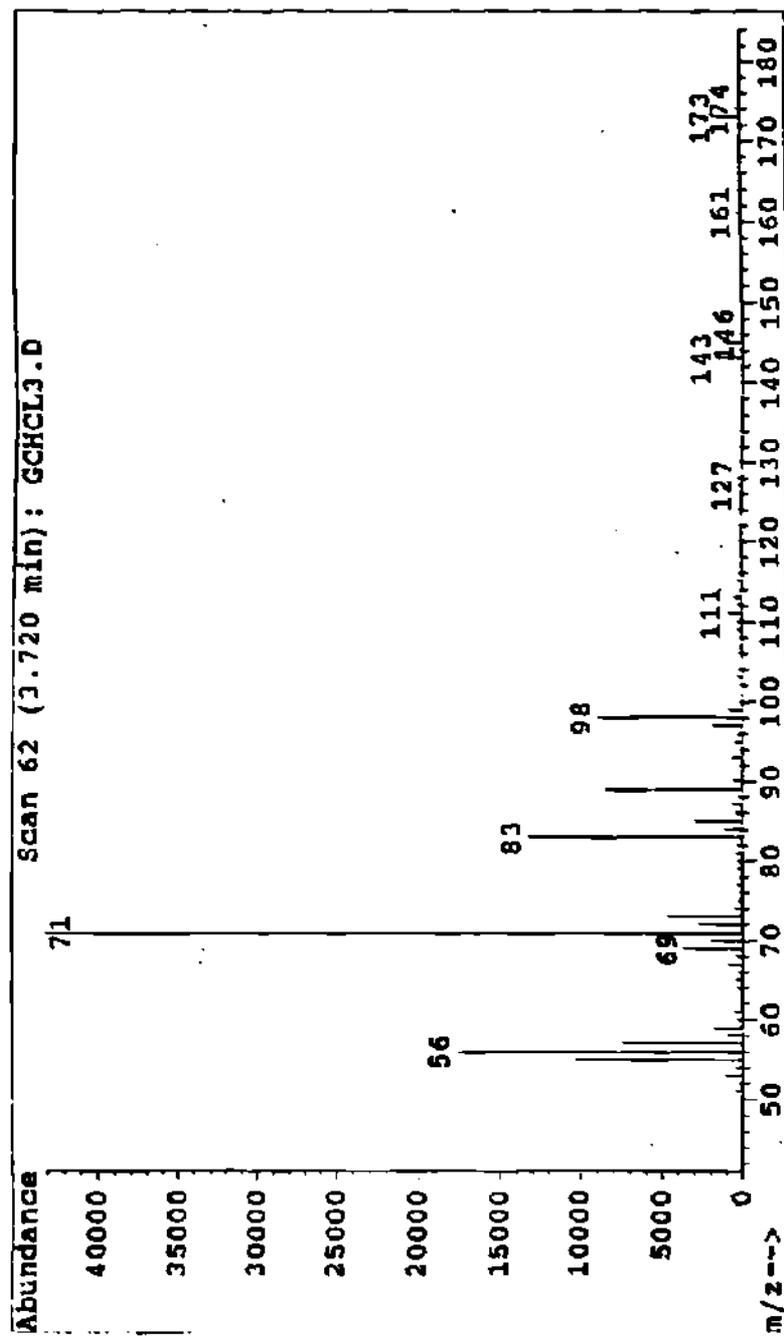


Fig. No. 32 Espectro Masas del compuesto G

Muestra G
 100% de H₂O

Current Data Parameters
 NAME MuestraG
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 3/05/22
 Time 13:58
 INSTRUM spect
 PROBR1 5 HP Mult line
 PULPROG zg
 10 32768
 SFO1 400.136064 MHz
 NS 8
 DS 2
 SWH 8175.058 MHz
 FIDRES 0.266758 Hz
 AQ 2.468283 sec
 RG 5
 CW 73.800 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.0 K
 DT 1.5000000 sec
 P4 12.50 usec
 DE 8.00 usec
 SFO4 400.136064 MHz
 HZC1 1M
 PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 8192
 SF 400.128023 MHz
 WHW EN
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

10 Real data parameters
 CI 20.00 ca
 F1F 10.000 ppm
 F1 400.130 MHz
 F2F 0.000 ppm
 F2 0.00 MHz
 PPMCH 0.26200 ppm/cm
 VZCX 200.06480 Hz/cm

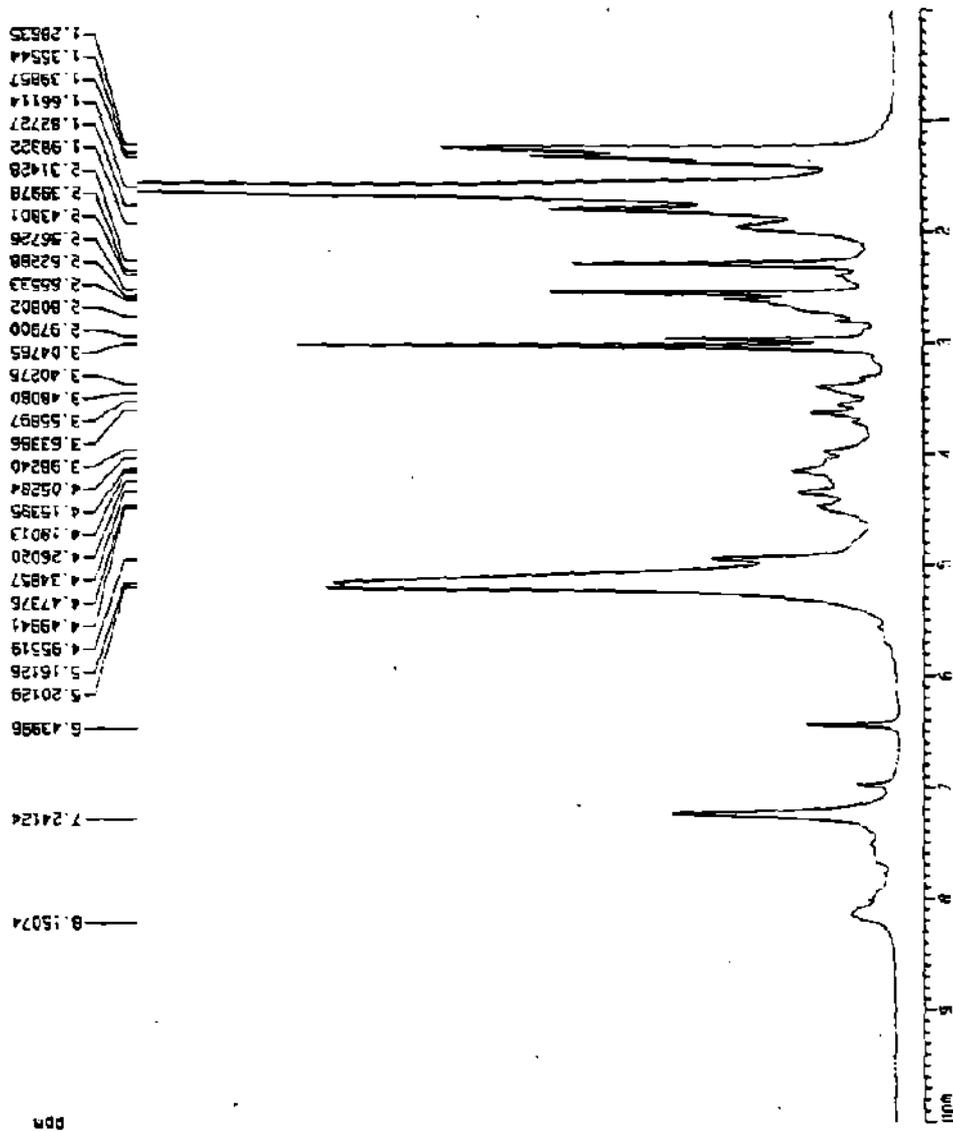


Fig. No. 33 Espectro ¹H RMN del compuesto G

4.5.3. Extracto Gf 4. 30

Las tres fracciones separadas por partición de este extracto fueron evaluadas microbiológicamente contra los microorganismos ya mencionados y de acuerdo a los resultados de la tabla No. 7 elegimos la fracción Gf 4.30 f 37 para su caracterización.

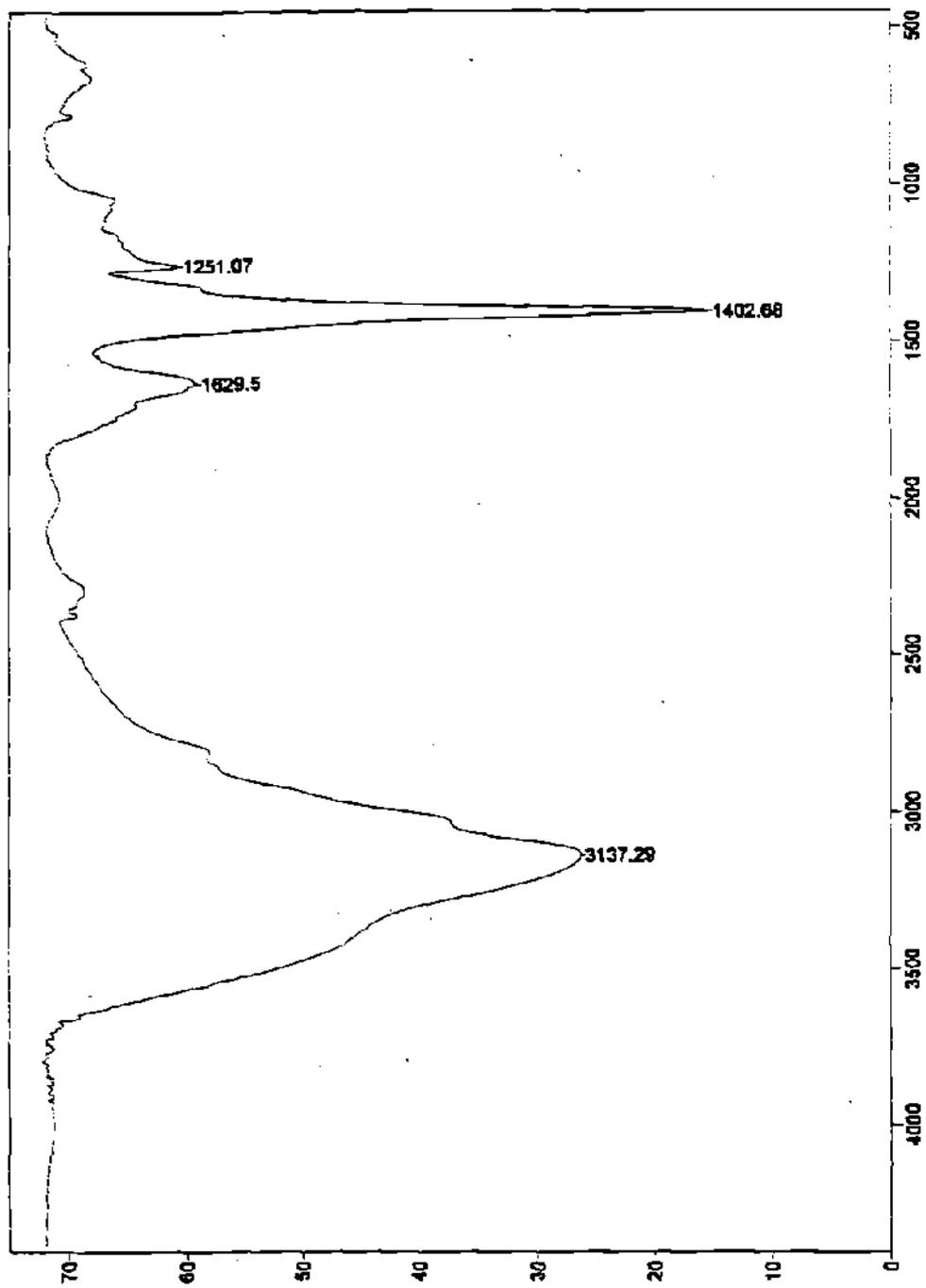
4.5.3.1. Fracción Gf 4.30 f 37, Compuesto "C"

Esta fracción se obtuvo en forma de cristales incoloros alargados con un punto de fusión de 192-194°C y sus datos espectrales son los siguientes:

Espectro IR en cm^{-1} : 3137 (f), 1629 (d), 1402 (f), 1251 (d) Fig. No.36.

Espectro RMN ^1H con supresión de agua en ppm 0.95 (J 7), 1.07, 1.19, 2.04, 2.49 (J 7), 3.06 (J 6), 3.71 (J 7), 8.22 Fig. No. 37.

COSY en ppm: se correlacionan los siguientes protones 3.9 con 3.7, 3.6 con 2.4 Fig.38.



Transmittance / Wavenumber (cm-1) Number of Scans= 10 Apdizations=
File # 2 : C 2/07/87 4:05 PM Res=4 cm-1

Fig. No. 36 Espectro IR del compuesto C

Muestra C

Current Data Parameters
NAME MuestraC
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 27/05/02
Time 21.03
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Nal11mm
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 32
DS 2
SWH 5160.257 Hz
FIDRES 0.170350 Hz
AQ 2.834028 sec
RG 101
RO 89.500 us/cic
DE 5.00 us/cic
TE 300.2 K
D1 1.50000000 sec
D2 12.50 us/cic
DE 5.00 us/cic
SFO1 400.1326062 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 6155
SF 400.1300653 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
F1P 5.000 cps
F1 300.17 Hz
F2P 0.000 cps
F2 0.00 Hz
PPhCM 0.45000 cps/cm
MZN 160.05850 Hz/cm

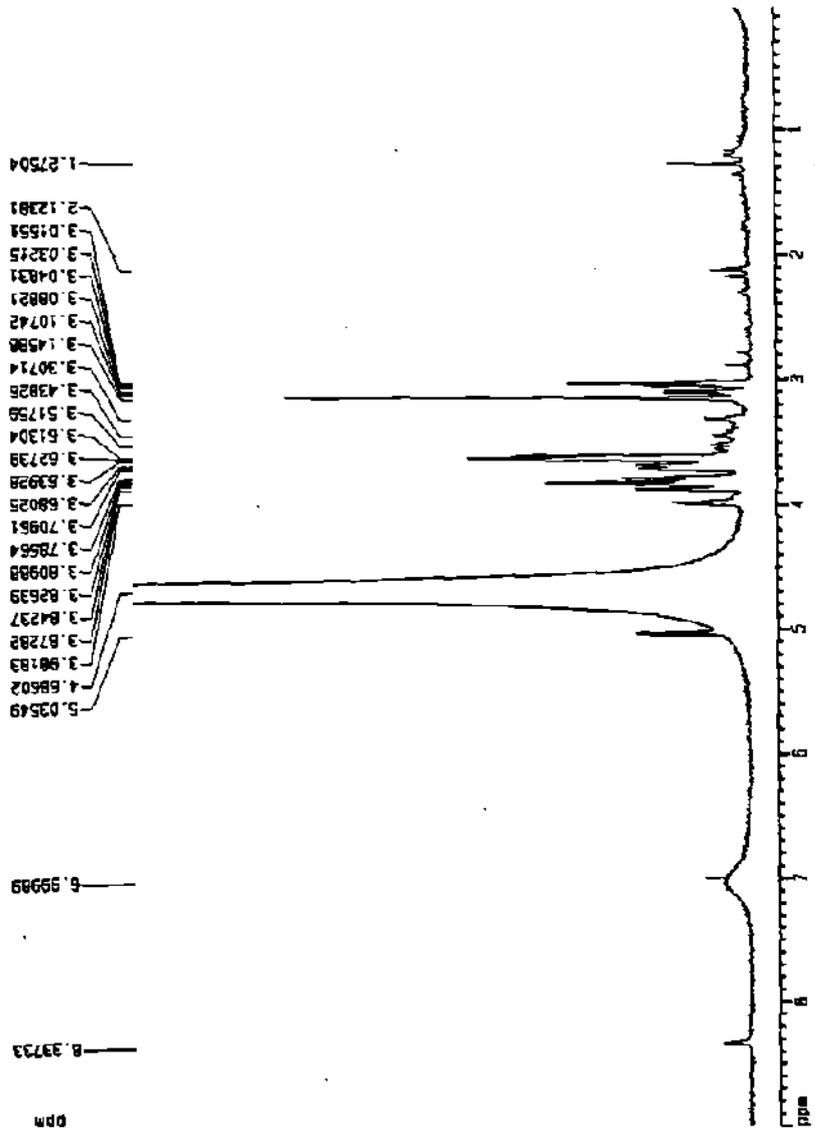


Fig. No. 37 Espectro ¹H RMN del compuesto C

Ulva lactuca

4.6. Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos

La actividad biológica de los 7 extractos obtenidos con los diferentes solventes se analizó en los microorganismos mencionados. Los datos representados en la tabla No.8 nos indican que los extractos no tuvieron una actividad relevante en los microorganismos que nos interesan en este estudio (*Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*) por lo que no se llevó a cabo la separación ni evaluación de sus fracciones.

<i>Ulva lactuca</i>								
Extraído	Soluble	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.enteritidis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.faecalis</i>
EP	Clf	-	+	++	+++	-	+++	Neg
Clf	EtOH	++	+	+	+++	++	+++	Neg
Clf	Clf	+++	-	-	-	+	-	-
A	EtOH	+++	+	+	+++	+++	++	Neg
EtOH	EtOH	+++	++	+	+++	++	+	Neg
EtOH	EtOH/A	+++	-	Neg	++	Neg	Neg	Neg
MeOH	EtOH	++	++	++	Neg	++	++	-

Tabla No. 8 Actividad Inhibitoria de extractos de *Ulva lactuca*

5.-DISCUSION

De acuerdo a la hipótesis que nos planteamos, la elección de las algas fue realizada en base a los antecedentes de la actividad presentada por otras especies del mismo género estudiado y por su localización en las costas de Tamaulipas, dando resultados similares las colectadas en Soto La Marina y en San Fernando Tamps.

El método de extracción con los que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a la actividad biológica, (tabla No.1), fue el de maceración, esto concuerda con lo reportado en la mayoría de los trabajos publicados sobre organismos marinos, en los que los autores utilizan material fresco (30) o seco (43), y realizan las extracciones en frío en sus diferentes modalidades : el método de centrifugación, lo utiliza De Lara (25), para buscar propiedades antibióticas en algas bentónicas, la percolación lo reporta Clark (87) para realizar ensayos biodirigidos con el objeto de descubrir y desarrollar nuevos antibióticos, otros autores utilizan la maceración con agitación continua; este último método, aunque no fue utilizado en este trabajo, por pruebas realizadas posteriormente, nos parece el más recomendable ya que con él se obtiene mayor cantidad de extracto.

Para la evaluación antimicrobiana se utilizaron los métodos de bioautografía y difusión (85,86), y aunque el primero resultaba muy atractivo porque es rápido y eficiente, ya que es posible localizar la actividad de un extracto, directamente sobre el cromatograma, no fue posible llevarlo a cabo por problemas de contaminación, por lo que se utilizó el de difusión que según reportan Rios y

Cols. (65) , de acuerdo a una revisión bibliográfica que realizaron de 1947 a 1987 es el más utilizado para este tipo de bioensayos en productos naturales

Se utilizó la Cromatografía en columna líquida y la Cromatografía en columna invertida, esta última tiene la ventaja que se usa menor cantidad de sílica y eluentes que en la anterior, pero es muy importante la CCF previa para elegir la mezcla de eluentes más apropiada, esta se basa en la diferencia de Rf entre dos manchas la cual debe ser mayor de 0.05 y además para una mejor separación la cantidad de muestra deberá ser aproximadamente 0.5% de la sílica utilizada.

Ulva fasciata

Se registró actividad en esta especie en los extractos obtenidos a partir de solventes no polares (Tabla No. 5), particularmente el del éter de petróleo Uf 1.12, pero acción relevante solo la encontramos contra *Escherichia coli*, por lo que el proceso de separación no fue continuado ya que en este trabajo nos interesa la actividad contra *C. albicans* y *S. aureus*.

Ulva lactuca

La *Ulva lactuca* al igual que otras especies de este género ha sido utilizada en medicina popular, sobre todo en Asia (6), ya que poseen actividad antimicrobial por el ácido acrílico que contienen, sin embargo en los microorganismos de nuestro interés *C. albicans* y *S. aureus* , los extractos obtenidos no tuvieron actividad relevante por lo que siendo este un estudio biodirigido no fueron tomados en cuenta para seguir con el proceso de separación y elucidación de estructuras.

Gracilaria foliifera o tikvahiae

Otra especie cuyo estudio nos pareció importante dado los resultados obtenidos (tabla No. 6) fue la *Gracilaria foliifera o tikvahiae*; en esta alga encontramos actividad antimicrobiana tanto en los extractos obtenidos con solventes no polares como en los polares por lo que continuamos con la separación de los extractos activos contra *C. albicans* y *S. aureus*. (Fig No. 25), el obtenido con éter de petróleo (Gf 1.26), con acetona (Gf 3.29) y con etanol (Gf 4.30),

Del extracto Gf.1.26 de *Gracilaria foliifera*, se separaron y purificaron 2 fracciones, la Gf 1.26 f 4 a la que se le denominó compuesto "J", y la Gf 1.26 f 8 compuesto "G".

Compuesto " J "

El compuesto "J", extraído con un solvente no polar como el éter de petróleo, presenta desplazamientos químicos en el espectro ^1H RMN (Fig. No. 26) en la región de metilos, 0.9 y 1.3 ppm, de metilenos característicos de una cadena de hidrocarbonada y los de 4.8 y 5.4 ppm nos indican protones de carbonos insaturados; estos, en el ^{13}C RMN (Fig No. 27) aparecen entre 118 y 129 ppm, de lo que se desprende que tenemos una cadena alifática insaturada.

Compuesto " G "

En el espectro de IR (Fig. No.28), observamos una banda muy ancha en 3335 cm^{-1} , y otra en 1035 cm^{-1} que nos hacen suponer varios

enlaces O-H y C-O que no son de un ácido porque el carbonilo aparece con una banda fuerte en 1665 cm, propia de una cetona conjugada con un doble enlace o de una amida, por estos valores dedujimos que en nuestro compuesto podríamos tener estos grupos funcionales; en el espectro ^{13}C RMN (Fig. No. 32), encontramos el pico que nos confirma el carbonilo de la cetona a 213 ppm, en la región de carbonos unidos a OH entre 55 y 69 ppm y varios picos entre 29 y 31 ppm de carbonos adyacentes a posiciones vinílicas (69); en la región de insaturaciones, 124 a 130 ppm encontramos varios picos que nos hacen suponer que en nuestro compuesto tenemos dobles enlaces y esto lo confirmamos con el espectro de masas (Fig. No 29) , donde aparecen picos con diferencia de 12 unidades como m/z 173-161, 83-71 que indican este tipo de estructura, no encontramos diferencias de 18 unidades que corresponderían a eliminación de agua por grupos oxhidrilos porque seguramente esta parte se eliminó previamente ya que no aparece el ión molecular, el pico base m/z 71 puede corresponder a $\text{C}_3\text{H}_7\text{C}=\text{O}$, propio de cetonas, estos datos, además de los del ^1H RMN (Fig. No. 30), con un pico con desplazamiento químico en 5.2 ppm $J = 15.4$ característico de protones vinílicos en trans y varios picos entre 3 y 4 ppm que corresponden a oximetinos de glucósidos (75), que de acuerdo al COSY (Fig. No. 31) están correlacionados entre sí, nos hacen suponer que tenemos un compuesto insaturado con un grupo carbonilo cetónico que se encuentra como glicósido.

Los cristales obtenidos del extracto etanólico Gf 4.30 f 37, que tuvieron actividad (Tabla No. 6) ya purificados con punto de fusión $192^\circ\text{-}194^\circ$ se denominaron Compuesto "C".

Compuesto " C "

De acuerdo a los datos del espectro de IR (Fig. No. 33) suponemos que se trata de una sal de amonio por la bandas fuertes a 3137 y a 1402 cm^{-1} de estiramiento y flexión respectivamente, del enlace N-H propios de estos compuestos según Pasto y Johnson (92). En el espectro ^1H RMN (Fig. No. 34) aparece un pico con desplazamiento químico a 3.7 ppm J 7 correspondiente a metilenos unidos al nitrógeno (89) y los relativos a metilos y metilenos aparecen a un campo más bajo que de ordinario, de acuerdo a estos datos suponemos que es una sal de amonio con pocos átomos de carbono.

Sargassum fluitans

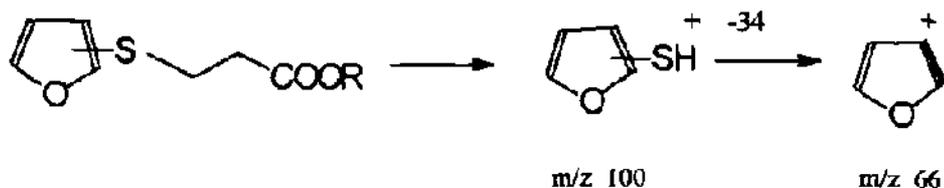
Los extractos obtenidos de *Sargassum fluitans* (tabla 2), presentaron actividad antimicrobiana relevante, en especial el S.f.1.1, que corresponde al extraído en éter de petróleo, la actividad biológica reportada para algas café es predominantemente citotóxica y antimicrobiana y Tringali (9) reporta esta acción en extractos lipofílicos. Además el S.f.2.4, extraído en cloroformo también presentó halos de inhibición importantes por lo que estos dos extractos fueron elegidos para su separación por métodos cromatográficos (Fig No. 7).

Del extracto S.f.1.1, *Sargassum fluitans* extraído en éter de petróleo se obtuvieron tres fracciones con actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (tabla No 3) la fracción Sf 1.1 f 6, denominada Compuesto " I " ; la Sf 1.1 f 11, compuesto " A " y la Sf 1.1 f 15, compuesto " D ".

Del extracto S.f. 2.4 *Sargassum fluitans* extraída en cloroformo, sólo pudo ser purificada una fracción que denominamos compuesto "K", separada por cromatografía en columna invertida; particularmente nos interesaba esta fracción por haberla obtenido con un método en el que utilizamos el 20 % de la silica y el 10 % de los eluentes usados en CC.

COMPUESTO "I"

El espectro de masas (Fig 9) nos indica un compuesto que se descompone fácilmente, esto lo deducimos por que no aparece el ión molecular, las fracciones $F^+ - 16$ y $F^+ - 18$, la presencia de Oxígeno y el pico $F^+ - 34$, de azufre, además el espectro en general y el pico base m/z 66 nos indica un heterocíclico aromático (88), lo cual confirmamos con el RMN 1H que presenta un multiplete en 7.6 ppm con una $J = 3.9$ que de acuerdo a Silverstein (89) se trata de un anillo de furano y en el ^{13}C RMN, lo corroboramos con la absorción en la región de aromáticos . El pico fuerte en el IR (Fig. 10 a) a 1134 cm^{-1} nos confirma la unión C - O. y la presencia del grupo carbonilo a 1730 cm^{-1} típico de un éster, lo que confirmamos con el ^{13}C RMN con la absorción a 166 ppm, por lo que suponemos tenemos un compuesto con una función éster un anillo de furano y una cadena con azufre, de acuerdo a los datos anteriores suponemos que el compuesto "I" tenga una parte de su molécula de la siguiente manera:

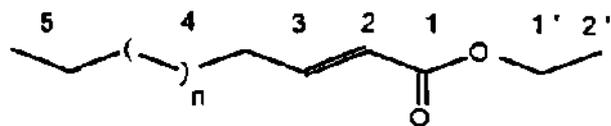


COMPUESTO " D "

Debido a que se obtuvo muy poca cantidad de este compuesto sólo fue posible realizar el ^1H RMN (Fig. No. 19) el cual presenta picos a campo alto de metilos y metilenos y dobletes en la región aromática que de acuerdo a su $J = 3$ pudiera tratarse de un compuesto aromático con sustitución en meta.

COMPUESTO "K"

De acuerdo al espectro ^1H RMN (Fig. No. 20) encontramos picos característicos de un éster de ácido graso insaturado; Carballeira (68), reporta valores similares en el ácido 7-metil-6 octadecenoico obtenido en *Holoturia mexicana*. El triplete a 0.8 ppm está correlacionado de acuerdo al COSY (Fig. No. 22) al pico de la cadena de metilenos a 1.2 ppm, además (Fig. No. 22a), encontramos correlación de los picos con 3.6 con 4.1 ppm con una $J = 5.6$ correspondiente a protones de doble enlace conjugado con carbonilo (110), y 1.6 con 2.3 correspondientes a radical etilo; para confirmar lo anterior, analizamos el espectro de ^{13}C RMN (Fig No. 21), que presenta desplazamiento químico en la región de carbonilo de ésteres a 178 ppm, los picos entre 125.8 y 130.8 ppm correspondientes a carbonos insaturados , los picos característicos de la cadena hidrocarbonada alrededor de 29 ppm y el del metilo unido a la cadena a 14 ppm, por lo que proponemos la siguiente estructura.



Asignación de señales:

Posición	¹ H en ppm	¹³ C en ppm
1		178
2	3.6	130
3	4.1	125
4	1.2	29
5	0.8	14
1'	2.3	68
2'	1.6	22

COMPUESTO "A"

Fue el mas importante en nuestro trabajo ya que presentó mayor actividad antimicrobiana que todos los aislados, con un MIC contra *C. albicans* de 0.16 mg/mL, por tal motivo se siguió con el proceso de purificación para determinar su estructura química por métodos espectroscópicos.

El pico base del espectro de masas (Fig. No. 11), m/z 88, es característico de un éster etílico, no aparecen picos con diferencia de 12 unidades de masa y por el ion molecular m/z 312 suponemos una fórmula $C_{20}H_{40}O_2$, con un índice de insaturación igual a 1, la deflexión del pico m/z 143 entre los de m/z 129 y m/z 157 nos indica una arborescencia de un radical metilo, (89,90) en esta posición; con estos datos suponemos que se trata de un éster etílico de un

ácido graso de 17 átomos de carbono con un metilo como ramificación en el carbón No. 6.

Para confirmar esta estructura nos basamos en el espectro ^1H RMN (Fig. No 12) lo comparamos con el del éster etílico del ácido estearico (Fig. 12 a) que aparece en el catálogo de Aldrich (91), en el cual observamos que entre el pico del protón con desplazamiento químico 0.8 ppm y el de 1.2 ppm que pertenece a la cadena de metilenos común en ácidos grasos (67,90) no aparece otro pico; a diferencia del éster del catálogo que es de cadena lineal, en nuestro compuesto aparece un triplete en 1.0 ppm, que integra para 3 protones, unido de acuerdo al COSY (Fig. No. 18), al que tiene desplazamiento químico 3.4 ppm que integra para 2; en este campo tenemos además otro en 0.82 ppm que integra para 6 protones y que de acuerdo al COSY está correlacionado con la cadena de metilenos que aparece a 1.2 ppm que integra para 25 protones, esto concuerda con Choudury y Traquair (90) que reportan en los datos espectrales del ácido 4 metil-heptadecanoico, dos metilos de la cadena, el terminal y el ramificado con el mismo desplazamiento y en la cadena de metilenos, el CH donde está unido este último; otros picos que aparecen son : un triplete en 2.1 ppm correspondiente a un metileno unido al carbonilo y otro a 1.4 que integra para dos y está unido a la cadena de metilenos, (Fig. No. 18) .Estos datos los corroboramos con el ^{13}C RMN y los espectros de doble dimensión: DEPT 45°, 90°, y 135° y HETCOR.

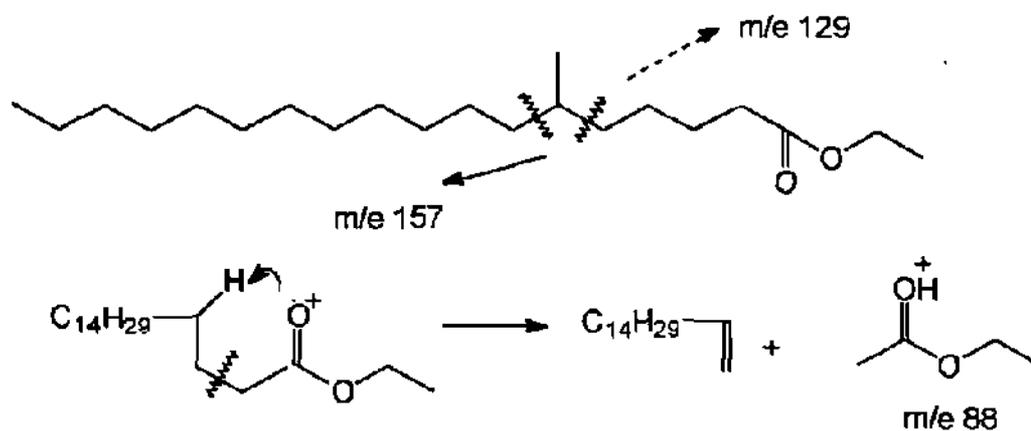
En el espectro de ^{13}C RMN (Fig. No. 13) encontramos a campo bajo el pico correspondiente al carbón del carbonilo del éster con un desplazamiento químico de 172 ppm, como lo reporta Silverstein (89) , uno a 33

ppm, otro a 31 ppm y el conjunto de picos de los metilenos característicos de una cadena de ácidos grasos en 28 ppm (90), además de los desplazamientos del radical etilo del éster, 56 ppm para el metileno y 18 ppm para el metilo, estos datos los corroboramos con los DEPT : en el de 45° (Fig. No. 17) encontramos como señal principal la de 34.5 ppm correspondiente a un CH; en el de 135° (Fig. No 15) los tres metilos a 13.56, 13.74 unidos a la cadena y 18.13 ppm el del radical etilo, de este mismo radical el metileno a 56 ppm y el conjunto de metilenos de la cadena hidrocarbonada.

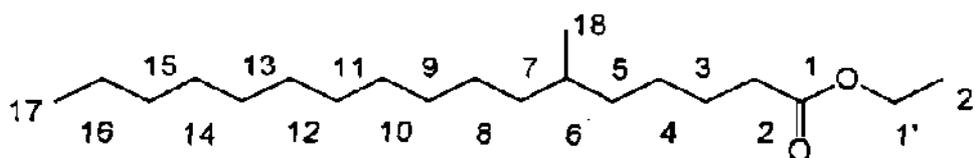
Todos los datos anteriores son corroborados por el HETCOR (Fig. No. 14) que nos correlaciona los picos siguientes: los carbonos (metilos) 13.5 y 13.7 con los protones 0.8 ppm, el metilo 18 ppm con el protón 1.0 ppm, los metilenos de la cadena hidrocarbonada empezando con el unido al carbonilo 33 con 2.1 ppm, 31 con 1.4 ppm y los localizados entre 28.2 y 28.9 ppm con el multiplete a 1.2 ppm, además del metileno del radical etilo 56 ppm con 3.4 ppm que aparece a campo mas bajo por estar unido directamente con el oxígeno.

Por los datos expuestos anteriormente proponemos que la estructura del compuesto "A" es la del **ÉSTER ETÍLICO DEL ACIDO 6 METIL HEPTADECANOICO**, el hecho que lo obtengamos como éster etílico puede ser un artefacto y deberse al proceso de extracción como lo indica Guerreiro (77) ya que los ácidos grasos como tales son comunes en los organismos marinos y su actividad biológica ha sido reportada científicamente desde Pratt en 1951 (51) hasta Caballeira en 1997 (71).

La fragmentación en el Espectro de masas es la siguiente:



La asignación de las señales de ¹H RMN y de ¹³C RMN se proponen de la siguiente manera:



Posición	¹ H en ppm	¹³ C en ppm
1		174
2	2.17	33
3	1.40	31
4 al 16	1.20	28.2 a 28.9
17 y 18	0.88	13.5 y 13.7
1'	3.43	56
2'	1.0	18

Una vez que la estructura química de este compuesto fue determinada, se hizo una exhaustiva búsqueda bibliográfica a través del Banco de Información del Chemical Abstracts System (CAS); no encontrándose referencia alguna sobre este compuesto en organismos marinos, solamente ácidos grasos de 15 a 19 átomos de carbón con un radical metilo en las posiciones 6, 7, 8 ó 9 están reportados (93) en un insecto del género *Muscidae*, pero específicamente, el Acido 6-metil-heptadecanoico es la primera vez que se encuentra en organismos marinos.

6.- CONCLUSIONES

- Corroborando nuestra hipótesis, los extractos de las algas estudiadas, mostraron actividad antimicrobiana relevante, contra los microorganismos utilizados.
- Los extractos no polares de *Sargassum fluitans*, presentaron el mayor índice de inhibición contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, y *S. epidermidis*, los de *Gracilaria foliifera* contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. enteritidis* y *S. epidermidis*.
- Del extracto éter de petróleo de *S. fluitans*, se obtuvieron tres compuestos con actividad antimicrobiana, un derivado del furano sustituido con una cadena que contiene azufre, un éster etílico de un ácido graso ramificado y un compuesto aromático.
- De la *Gracilaria foliifera* se obtuvieron tres compuestos activos : una sal de amonio, un compuesto con una cadena insaturada y un glicósido.
- El compuesto que presentó mayor actividad antibiótica contra *Candida albicans*, con un MIC de 0.16 mg/mL fue obtenido del extracto de éter de petróleo de *S. fluitans* y su estructura corresponde al ESTER ETILICO DEL ACIDO 6 METIL HEPTADECANOICO
- El compuesto anterior no ha sido reportado en la literatura referente a organismos marinos.
- Con el método de cromatografía invertida se logró separar e identificar compuestos activos, utilizando el 10 % de la cantidad de reactivos usados en CC, por lo que se recomienda para el estudio de productos naturales.

RECOMENDACIONES

Dado que el compuesto que se obtuvo presenta una actividad antimicrobiana relevante sería interesante continuar su estudio, por ejemplo su síntesis ó su mecanismo de acción a nivel celular.

Los extractos de *Sargassum fluitans* presentaron también actividad contra *S. epidermidis* y *S faecalis* por lo que sería importante hacer un estudio de ellos y elucidar las estructuras de los compuestos activos, así como ampliar las pruebas con otros microorganismos.

Los métodos químicos y microbiológicos utilizados en la búsqueda de metabolitos activos de productos naturales, deberán ser objeto de permanente estudio para hacerlos más eficientes y económicos.

7 REFERENCIAS

1. Monroe, E., Wall y Mansukh, C.W. Camptothericin and analogues. Human Medicinal Agents from plants. A. Douglas Kinghorn, Manuel F. Balandrin Edit. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C. pp 282-286. (1993).
2. Zertuche, G.J. Situación actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en América Latina y el Caribe. (Documento de campo No. 13 del programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia. Editor. Zertuche Gonzalez pp 47-54 (1993).
3. Gonzalez, G. J. Flora ficológica de México: Concepciones y estrategias para la integración de una flora ficológica nacional. Ciencias, No. Especial 6 pp 13-39, 6 Nov. (1992).
4. New, Harold, C. The crisis in antibiotic resistance. Science Vol. 257 pp 1064-1068 (1992).
5. Zhouyao, Z., Min, J., Yang, J., Pawliszyn, N. Solid-Phase Microextraction. Analytical Chemistry , Vol. 66, No. 17 pp 134-138 Sept 1, (1994).
6. Heinz, A. H. Marine Algae and their products and constituents in Pharmacy . Marine algal Pharmaceutical Science. Heinz . A.H., Tore L., Yukin T. Ed., Walter de Gruyter, Berlin, New York,N.Y: pp 25-34 (1979).
7. Murakami, S., Takemoto, T. y Zhimizu, Z. Studies of the effective principles of *Digneia simplex*. Chem. Abstr. 48 : 12676 (1954).
8. Nouerddine, B., Danielle , P., Puel, D. y Corrado, T. Citotoxic diterpenoids from the brown alga *Dilophus Ligulatos*. Journal of Natural Products. Vol. 56 No. 10 pp 1747-1752 (1993).

9. Tringalli, C., Oriente, J., Piatelli, M., Geraci, C., Nicolosi, G., y Breitemaeir, E. Antimicrobial crenuladial from the brown alga *Dilophus ligulatos*. Canadian Journal Chemistry No. 66 pp 2799-2802. (1988).

10. Koing, G. M., Wright, A.D. y Sticher, O. Diterpenes from the brown alga *Dyctiota divaricata*. Phytochemistry, Vol. 30, No. 11 pp 3679-3682. (1991).

11. Konig & Wright. Algal Secondary Metabolites. Human medicinal agents from plants. A. Douglas Kinghorn, Manuel, F Balandrin Ed. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C. pp 282-286. (1993).

12. Kajiwara, T., Akakabe, Y., Matusi, K., Kodoma, K., Koga, H., y Nagakura, T. (+) - (3S,4S) - 3- Butyl - 4 - vinylcyclopentene in brown algae of the genus *Dictyopteris*. Phytochemistry, Vol. 45, No. 3 pp 529-532. (1997).

13. Amico, V., Cunsolo, F., Neri, P., Piatelli, M. Antimicrobial tetraprenyltolquinol derivatives from *Cystoseira Spinosa var Squarrosa*. Phytochemistry 27 pp 1327-1331 (1988).

14. Milkova T., Talev, G., Christov, R., Dimitrova - Konaklieva, S., y Popov, S. Sterols and volatiles in *Cystoseira barbata* and *Cystoseira crinita* from the Black Sea. Phytochemistry, Vol. 45, No. 1 pp 93-95. (1 997).

15. Glombitza K. W., Wegner, H. S., Schulten, H. R. Antibiotics from algae. Phlorotannins from the brown alga *Cystoseira granulata*. Planta Medica No. 2 pp 116-120. (1994).

16. Muruyama, K., Kimura, S., Fujimoto, K., Kida, N. Antioxidant from seaweed for food and cosmetic preparation. Chemical Abstracts. Vol.114 pp 162793k. (1991).

17. Martínez, N. G., Rodríguez, L.V. Isolation and characterization of Sargarin complex, a new broad-spectrum antibiotic isolated from marine algae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. pp 191. (1964).

18. García M.N. Antibiotic antifungal and antifouling substances obtained by solvent extraction of *Sargassum natans* . *Journal American Chemistry Society*. No.18 Vol. 117 pp 4112 (1995).

19. Sreenviasa , S. Antifungal activity of different fractions of extracts from Indian Seaweeds. *Marine algae in Pharmaceutical Science*, Vol 2. H.A. Hoppe and T. Levring Eds. Walter de Gruyter, Berlin pp 93-98. (1982).

20. Levring, G.T., Hoppe, *Marine Algae* Cram de Gruyter & Co., Hamburgo pp 421 (1969).

21. Glombitza, K.W. Antibiotics from algae. *Marine algae Pharmaceutical Science*. Heinz A. Hoppe. Tore Levring , Ed. Walter de Gruyter. Berlin. New York: pp 303-325. (1979).

- 22.- Ito H. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum turbergii*. *Bull Tokyo* Vol. 24 No. 5 pp 1114-1115. (1976).

23. Faulkner, D. J. Interesting aspects of marine natural products *Chemistry*. *Tetrahedron report* No. 28. Vol. 33 pp 12 .Pergamon Press (1978).

24. De Lara, Y.G., Sobrino, F. A. Lozano , R.C., Ponce, M. E., y Dreckman, E.K., Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de las costas de Michoacán, Mexico.*Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela. Univ. Oriente*, 28 pp 99 - 104 (1989).

25. De Lara I.G. Propiedades antibióticas de algunas especies de algas marinas bentónicas. *Hidrobiológica*. Vol 1 pp 2 (1991).

26. Mabeau, S., Kloareg, B. y Joselau, J. P. Fractionation and analysis of Fucanes from brown algae . *Phytochemistry*, Vol 29, No. 8 pp 2441-2445. (1990).
27. Gerwick, W.M. y Bemart, M.W. *Marine Biotechnology Vol 1: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, David H. Attaway y Oskar R. Zaborsky Ed. New York pp 333 - 334. (1987).
28. Selover, S. J. y Crews, P. Kylinone, a New Sesquiterpene skeleton from the marine alga *Laurencia pacifica*. *Journal of Organic Chemistry*, 45 pp 69 - 72. (1980).
29. Suzuki, M., Kurosawa, E. y Irie, T. Three new sesquiterpenoids containing bromine, minor constituents of *Laurencia glanfulifera* Kutzing. *Tetrahedron Letters* No. 10 pp 821 - 824. (1974).
30. Shizuri, Y., Yamada, A. y Yamada, K. Laurequinone, a Cyclolaurane sesquiterpene from the red alga *Laurencia nidifica*. *Phytochemistry* Vol. 23. No. 11 pp 2672-2673. (1984).
31. Waraszkiewics, S. M. y Erickson, K. L. Halogenated sesquiterpenoids from the Hawaiian marine alga: *Laurencia nidifica*: Nidificene and Nidifidiene. *Tetrahedron Letters* No. 23 PP 2003-2006. (1974).
32. Sims, J. J. y Fenical, W. *Marine Natural Products III* . Johnstonol, an unusual halogenated epoxide from the red alga *Laurencia Johnstonii*. *Tetrahedron Letters* No. 3 pp 195 -198. (1972).
33. Fenical, W. Rhodophytin, a halogenated vinyl peroxide of marine origin. *Journal of the American Chemical Society* Vol. 96 pp 4680 - 4681. (1974).
34. Hall, S. S., Faulkner, D. J., Fayos, J. y Clardy, J. Oppositol, a brominated sesquiterpene alcohol of a new skeleton class from the red alga.

- Laurencia subopposita*. Journal of the American Chemical Society Vol. 95 pp 7187 - 7189 (1973).
35. McConnell, O. J. y Fenical, W. Ochtodene and Ochtodiol: Novel polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red seaweed *Ochtodes secundiramea*. Journal of Organic Chemistry Vol. 43 pp 4238 - 4241. (1978).
36. Fenical, W. y Sims, J. J. Cycloedesmol, an antibiotic cyclopropane containing sesquiterpene from the marine alga, *Chondria oppositoclada* Dawson. Tetrahedron Letters No. 13 pp 1137 - 1140. (1974).
37. Fenical, W. y McConell, O. Simple antibiotics from the red seaweed *Dasya pedicellata* var. *Stanfordiana*. Phytochemistry Vol. 15 pp 435 - 436. (1976).
38. Siuda, J.F., VanBlaricom, G. R., Shaw, P., Johnson, R. D. , White, R. H., Hager, L. P. y Rinehart, K. L. 1-Iodo-3,3-dibromo-2-heptanone, 1,1,3,3-Tetrabromo-2-heptanone, and related compounds from the red alga *Bonnemaisonia hamifera* . Journal of the American Chemical Society . Vol. 97 pp 937-938(1975).
39. Kirkup, M. P. y Moore, R. E. Indole alkaloids from the marine red alga *Martensia fragilis*. Tetrahedron Letters. Vol. 24. No.20. pp 2087 - 2090. (1983).
40. Crews, P. y Kho, W. E. Acyclic polihalogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium violaceum*. Journal of Organic Chemistry. Vol. 42 pp 2812 - 2815. (1977).
41. Crews, P. Monoterpene halogenation by the red alga *Plocamium oregonum*. Journal of Organic Chemistry. Vol. 42 pp 2634 - 2636. (1977).
42. Crews, P., Kho, W. E. y Montana, P. Halogenated alicyclic monoterpenes from red algae *Plocamium*. Journal of Organic Chemistry. Vol. 43 pp 116 - 120. (1978)

43. Rovirosa, J., Sanchez, Y., Palacios, Y., Darias, J. y San Martin, A. Antimicrobial activity of a new monoterpene from Antarctic Peninsula. *Chemical Abstract* Vol. 114 pp 3406v. (1991).
44. Nagai, H., Yasumoto, T. y Hokama, Y. Aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin as causative agents of a red alga *Gracilaria coronipifolia* poisoning in Hawaii. *Toxicon* Vol. 34 No. 7 pp 1523 - 1526. (1996).
45. Fernandez, L.E., Valiente, O.G., Mainardi, V., Velez, H. Y Rosado, A. Isolation and characterization of anti-tumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. *Carbohydr. Res.* 190 pp 77-83. (1989).
46. Gregson, R.P., Marwood, J.F. y Quinn, R.J. The occurrence of prostaglandins PGE₂ in a plant-the red alga *Gracilaria lichenoides*. *Tetrahedron Lett.* 20 pp 4505-4506. (1979).
47. Heinz, A. H. Marine Algae and their products and constituents in Pharmacy. Marine algae Pharmaceutical Science. Heinz. A.H., Tore L., Yukin T. Ed., Walter de Gruyter, Berlin, New York: pp 33 (1979).
48. Sakagami, Y. Anti-ulcer substances from marine algae. In Marine algae in pharmaceutical Science, Vol 2, H.A. y T. Levring Ed., Walter de Gruyter & Co. Berlin pp 99-104 (1982).
49. Ito, K. y Hashimoto, Y. Amino acids from *Gracilaria textori*. *Nature London* 211 pp 417-420. (1966).
50. Fattorusso, E. y Piatelli, M. Amino acids from *Gracilaria secundata*. Marine natural products Chemical and Biological perspectives Vol. III Paul J. Scheuer Edit. Academic Press New York, N.Y. pp 95-120. (1980).
51. Pratt, R. H. , Maunter, G.M., Gardner, Y. Y Dufmoy J. Report on the activity of seaweed extracts. *J. Amer Pharm. Ass. Sci Ed.* 40 pp 575-590. (1951).

52. Chang, T., Ohta, S. Ikegami, N., Miyata, H., Kashimoto, T. y Kondo, M. Antibiotic substances produced by a marine green alga. *Dunaliella primolecta* Bioresour Technol 44 (2) pp 149-153. (1993).
53. Valerie, J. Y Fenical, W. Novel bioactive diterpenoid metabolites from tropical marine algae of the genus *Halimeda* (Chlorophyta). Tetrahedron Vol.40 No.16 pp 3053-3062. (1984).
- 54 Valerie, J. P. Y Fenical, W. Bioactive terpenoids from Caribbean marine algae of the genera *Penicillus* and *Udotea* (Chlorophyta). Tetrahedron Vol. 40, No.15 pp 2913-2918. (1984).
55. Tetsuo, N. Ravi, B.N. y Faulkner, J. Antimicrobial constituents of *Udotea flavellum*. The Journal of Organic Chemistry Vol. 46 Num. 12 pp 2435-2437. (1981).
56. Mesmar, M.N. y Abussaud, M. The antibiotic activity of some aquatic plants and algal extracts from Jordan. Biol Abstr. 95 (1) AB 193 pp 1775. (1992).
57. Capon, R.J., Ghisalberti, E.L. y Jefferies, P.R. New sesquiterpenes from *Caulerpa flexilis* var. *Muelleri*. Aust. J. Chem. 32 pp 1627-1629. (1979).
58. Valerie, J. y Fenical, W. Toxic feeding deterrents from the tropical marine alga *Caulerpa bikiniensis* (Chlorophyta). Tetrahedron Letters, Vol.23. No. 48 pp 5017-5020. (1982).
59. Blackman, A.J. y Welle, R.J. Caulerpol, a diterpene alcohol, related to vitamin A, from *Caulerpa brownii* (algae). Tetrahedron Letters No. 31 pp 2729-2730. (1976).
60. Buchecker, R. y Eugster, C. H. Absolute Konfiguration von Alfa-Doradexanthin und von Fritschiellaxantin, einem neuen Carotinoid aus *Fritschiella tuberosa*. Helvetica Chimica Acta. Vol. 61, Fasc. 6 pp 1962-1967 (1978).

61. Dare, M.J., Parkh, R.G. Amino acids of the green algae *Ulva*. Protein hidrolates. Bot. Mar. XXI No. 5 pp 323-326. (1978).
62. Hari, S. G., Mithiesh, S., Dewan, S.B. An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva fasciata*. Tetrahedron Letters, Vol.33 No. 12, pp 1641-1644 (1992).
63. Lewis, E.J., y Gonzalvez, E.A. Amino acids from marine algae. Ann. Bot (London) No. 26 pp 317-327. (1962).
64. Abdel, A. F. y Edress, M. Seasonal Changes in the constituents of *Ulva lactuca*. Phytochemistry, Vol 12 pp 481-485. (1973).
65. Duperon, R., Thiersault, M., y Duperon, P. Occurrence of Sterylglycosides and acylated sterylglycosides in some marine algae. Phytochemistry, Vol.22, No. 2: pp 535-538. (1983).
66. Carballeira, N. M., Reyes, E. D. y Shalabi, F. Identification of novel iso/anteiso nonacosadienoic acids from the phospholipids of the sponges *Chondrosia remiformis* and *Myrmekioderma styx*. Journal of Natural Products. Vol. 56. No. 10 pp 1850 - 1855. (1993).
67. Carballeira, N. M. y Shalabi, F. Unusual lipids in the Caribbean sponges *Amphimedon viridis* and *Desmapsamma anchorata*. Journal of Natural Products. Vol. 57. No.8 pp 1152 - 1159. (1994).
68. Carballeira, N. M., Cruz, C. y Sostre, A. Identification of the novel 7-Methyl-6-octadecenoic acid in *Holothuria mexicana*. Journal of Natural Products. Vol. 59. No. 11 pp 1076 -1078. (1996).
69. Carballeira, N. M. Reyes, M. Identification of a new 6-Bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemona *Conylactis gigantea* and the Zoanthid *Palythoa caribaeorum* . Journal of Natural Products Vol. 58. No. 11 pp1689 - 1694. (1995).

70. Carballeira, N. M. y Medina, J. R. New fatty acids in the phospholipids of the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *Journal of Natural Products*. Vol. 57. No. 12 pp 1688 - 1695. (1994).
71. Carballeira, N. M. , Reyes, E. D., Sostre, A., Rodriguez, A. J. y Gonzalez, F. Identification of the novel antimicrobial fatty acid (5Z, 9Z) - 14 - methyl - 5, 9 - pentadecadienoic acid in *Eunicea succinea*. *Journal of Natural Products*. Vol. 60. No. 5 pp 502 - 504. (1997).
72. Rickrode, T. E. , Mueller, C. F. y Taylor, D. Secretions of *Plethodon cinereus*. *Am. Midl. Nat.* 115 (1) pp 198 - 200. (1986).
73. Bamathan, G., Komprobst, J. M., Doumenq, P. , Miralles, J. y Esnault, N. B. Sponge fatty acids , 5. Characterization of complete series of 2-hidroxi long-chain fatty acids in phospholipids of two Senegalese marine sponges from the family Suberitidae: *Pseudosuberites Sp.* and *Suberites massa*. *Journal of Natural Products*. Vol. 56. No. 12 pp 2104 - 2113. (1993).
74. Khotimchenko, S. V. Fatty acids composition of seven *Sargassum* species. *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 8 pp 2639-2641. (1991).
75. Rho, M. C., Yasuda, K., Matsunaga, K. y Ohizumi, Y. A monogalactopyranosyl acylglycerol from *Oftmannsiellopsis unicellularis* (NIES - 359). *Phytochemistry*. Vol. 44. No. 8 pp 1507 -1509 (1997).
76. Bell, M. V. , Dick, J. y Pond, D. W. Octadecapentaenoic acid in Raphidophyte alga, *Heterosigma akashiwo*. *Phytochemistry*. Vol. 45. No. 2 pp 303 - 306. (1997).
77. Guerreiro, A., D' Ambrosio, M. Y Pietra, F. Novel hydroxycosatetraenoic and hydroxycosapentaenoic acids and a 13-oxo analog. Isolation from a mixture calcareous red algae *Lithothamnion calcareum* and *L. corallioides* of Brittany waters. *Helv. Chim. Acta* 73 pp 2183 - 2189. (1990).

78. Ohta, S., Chang,t., Ikegami, N., Kondo, M., Miyata, H. Antibiotic substance produced by a newly isolated marina microalga. *Bull Environ Contam Toxicol* 50(2) pp 171-178 (1993).
79. Faulkner, D.J. Academic Chemistry and the discovery of bioactive marine natural products. *Marine Biotechnology*, vol. 1 Edit. David H. Attaway y Oskar R. Zaborsky. Plenum Press, New York, N.Y. pp 471.(1993).
80. Clinton J. Dawes. Botanica Marina Edit Limusa México S.A. de C.V. pp.131,182,191 (1991)
81. Abbott, A I., Dawson E.Y.,How to know the seaweeds. 2ª. Ed. The Picture Key Nature series Dubuque, Iowa. pp 53, 78, 125 (1978).
82. Hostesttmann, M., Hostesttmann, A.M. Preparative Chromatography techniques. Aplicaciones in Natural Products isolation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp6-18 (1986).
83. Touchstone, J.C., Dobbins, M.F.m Practice of thin layer Chromatography, 2ª Edición A. Wiley- Interscience Publication New York N.Y.,Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore pp 36-39 (1981).
84. Dominguez, X.A. Química Orgánica Experimental 2ª Edición. Editorial Limusa, México pp 7 (1986).
85. Rios, J.L., Recio, M.C. y Villar, A. Screening methods for Natural Products with antimicrobial activity: A review of literature. *J. Ethnopharmacology* 23 pp127-149. (1988).
86. Sidney, M. F., Baron, J. E. Scott Bailey Diagnóstico Microbiológico. 7ª Edición Editorial Médica Panamericana México pp 190 - 205 (1984).

87. Clark, A.M., Hufford, D.H. Discovery and development of novel prototype antibiotics for opportunistic infections related to acquired immunodeficiency syndrome. A. Douglas Kinghom, Manuel F. Balandrin Ed. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C. pp 282-286: (1993).
88. Mc Lafferty, F. Interpretation of Mass Spectra 2nd ed., Wiley- Interscience New York, N.Y. (1983).
89. Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Tomil, T.C. Spectrometric Identification of Organic Compounds Fifth Edition John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y. Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore (1991).
90. Choudhury, S.R., Traquair, J.A. 4-Methyl-7,11- Heptadecadienal and 4-Methyl 7,11- Heptadecadienoic acid: New antibiotics from *Sporothrix rugulosa*.. Journal of Natural Products Vol. 57 No 6 pp 700-704 (1994).
91. Pouchert Charles J. The Aldrich Library of NMR Spectra Edition II Vol. 1 pp 507 (1983).
92. Pasto, D.J. Johnson, C.R. Determinación de Estructuras Orgánicas. Edit. Reverte pp 87 (1975).
93. Gary, J., Guo, L., Gu, P., Blomquist, C., Reitz, R., Reed, J.R. Methyl-branched fatty acids and their biosynthesis in the housefly *Musca domestica* (Diptera: *Muscidae*) Insec Biochem. Mol. Biol. 24 (8) pp 803 -810 (1994).

