

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE ALGAS MARINAS CON
ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LARVAS DE
Aedes aegypti (Linnaeus)**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

POR

Q.B.P. BLANCA ALICIA PEREZ CEPEDA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DE 2000

TM

RA644

.D4

P46

2000

c.1



1080124413

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA DE
PRODUCTOS NATURALES

ESTUDIO FITOQUIMICO DE ALGAS MARINAS CON
ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LARVAS DE
Aedes aegypti (Linnaeus)

Q.B.P. BLANCA ALICIA PÉREZ CEPEDA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN QUIMICA DE PRODUCTOS NATURALES

POR

DIRECTORA: DRA. AZULENA GRANDAY CÁRDENAS

Q.B.P. BLANCA ALICIA PEREZ CEPEDA

DIRECTORA: DRA. ANA VERDE STAR

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DE 2000



TM

1 44

. 4

P46



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN QUÍMICA DE
PRODUCTOS NATURALES
POR

QB.P. BLANCA ALICIA PÉREZ CEPEDA

COMISIÓN DE TESIS:


DIRECTORA: DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS


CO-DIRECTORA: DRA. MARÍA LUISA RODRÍGUEZ TOVAR


ASESOR: DRA. JULIA VERDE STAR

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

DICIEMBRE 2000

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA Y EN EL LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA Y ARTRÓPODOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS Y LA CODIRECCIÓN DE LA DRA. MARIA LUISA RODRÍGUEZ TOVAR.

DEDICATORIA

Fátima Sofía.....

Por tí y para tí

**Busqué a Dios y no lo encontré,
busqué mi alma y no la hallé,
busqué a mi hermano
y encontré a los tres....**

**GRACIAS; Dra. Julia, Dra. Azucena, Dra. Ma. Luisa,
Dra. Caty, Dra. Angelito.**

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León a través de la Secretaría Académica por las facilidades otorgadas a los Maestros de dicha Institución para la realización de los proyectos tanto culturales como científicos, así mismo agradecer a la Dirección General de Investigaciones por el Programa de apoyo a la Investigación Científica (PAYCIT) Proyecto No. CA143-99.

Un especial agradecimiento a la Subdirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por el apoyo y por su gran esfuerzo para fortalecer el desarrollo integral de sus estudiantes, tanto de Maestría como de Doctorado.

Mi mayor y más sincero agradecimiento a la persona que hizo posible mi Maestría... Dra. Julia Verde Star, gracias por toda su ayuda, su asesoría en este trabajo, sus consejos, gracias por todo su apoyo... GRACIAS

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, mil gracias por la dirección de esta Tesis, por sus consejos, sus aportaciones, por su ayuda, por su tiempo, su paciencia y gracias por ser mi MAESTRA (la mejor).

A la Dra. María Luisa Rogríguez Tovar por la dirección de esta Tesis, gracias por todo su apoyo, por su ayuda, por sus enseñanzas, por ser mi maestra y por su tiempo.

A la Dra. Catalina Rivas por toda su ayuda, por sus valiosas aportaciones y consejos.

A la Dra. María de los Angeles Verástegui Montemayor (mi angelito), por toda la valiosa ayuda que me brindó, todas sus aportaciones, sus consejos y sus clases.

Mi agradecimiento más profundo al Sr. Director de la Preparatoria 15 de la U.A.N.L., M.C. Alejandro Ramírez Escamilla por su apoyo, su ayuda, su cooperación y lo más importante.... por su compañerismo.

Al Ing. Francisco Cruz Jáuregui, Subdirector Académico de la Preparatoria 15, por su gran ayuda, su colaboración y su apoyo.

Al Lic Jesús F. Ruíz Roque, Secretario Académico de la Preparatoria 15, por su apoyo y su gran ayuda.

A la Dra Noemí Wakxman por su valiosa ayuda en la determinación de los Espectros del RMN.

Al Dr Salomón Martínez Lozano por su valiosa ayuda en la clasificación de la Chlorophyta: *Enteromotpha prolifera*.

Al Dr. Raúl Torres Zapata por su colaboración y su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Dra. Adriana Flores y a la Dra. Leticia Hauad por sus valiosas aportaciones y por sus consejos.

Al Biól. Isaías Gómez Gómez, por toda su ayuda desinteresada en la realización de este trabajo y en los Congresos.

A la Srita. Imelda Flores Rodríguez, Isabel Vázquez Flores, al Sr. Pedro Aguilar Moreno e Inés López Vaca, mil gracias por toda la ayuda que me

brindaron.

A la Srita. María del Carmen Vázquez Peña y al Sr. Ricardo Camarena Benavides por su tiempo y su ayuda.

A las mejores compañeras de toda mi vida y mis mejores amigas: Juany y Cony...gracias por su amistad y su ayuda.

A todas las personas que por un grave descuido me olvidara de agradecer, mis más sinceras gracias por todas sus atenciones.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

2.1.1 Material Vegetal

2.1.2 Clasificación y Descripción botánica de *Enteromorpha prolifera*

2.1.3 Clasificación y Descripción botánica de *Sargassum fluitans*

2.1.4 Colecta

2.2 Extracción de Material vegetal

2.2.1 Maceración

2.3 Separación

2.3.1 Preparación de placa

2.3.2 Cromatografía en Columna

2.3.2.1 Cromatografía en Columna Seca Invertida

2.4 Caracterización de Metabolitos Secundarios

2.4.1 Pruebas para grupos funcionales de Metabolitos secundarios

2.4.1.1 Prueba de la Flama.

2.4.2 Prueba de Insaturaciones

2.4.2.1 Prueba de Permanganato de potasio

2.4.2.2 Prueba del Bromo

2.4.3 Prueba para fenoles

2.4.3.1 Prueba del Cloruro Férrico

2.4.4 Prueba para Esteroides

2.4.4.1 Prueba de Lieberman Burchard

2.4.4.2 Prueba de Salkowski

- 2.4.5 Prueba para grupo Furano
 - 2.4.5.1 Prueba de Ehrlich
- 2.4.6 Prueba para Carbohidratos
 - 2.4.6.1 Prueba de Molish
- 2.4.7 Prueba para Cumarinas
- 2.4.8 Prueba para Sesquiterpenlactonas
 - 2.4.8.1 Prueba de Baljet
- 2.4.9 Prueba para Quinonas
 - 2.4.9.1 Prueba de Borntrager
- 2.4.10 Prueba para Flavonoides
 - 2.4.10.1 Prueba de Shinoda
- 2.4.11 Prueba para Alcaloides
- 2.5 Métodos espectroscópicos
- 2.6 Métodos Entomológicos
 - 2.6.1 Establecimiento de colonias de mosquitos *Aedes aegypti*

3 PARTE EXPERIMENTAL

- 3.1 Estudio de *Sargassum fluitans*
 - 3.1.1 Preparación de Extractos
 - 3.1.2 Diagrama de flujo de *S. fluitans*
- 3.2 Estudio de *Enteromorpha prolifera*
 - 3.2.1 Preparación de extractos
 - 3.2.2 Diagrama de flujo de *E. prolifera*
- 3.3 Ensayo de Actividad

4 RESULTADOS

- 4.1 Métodos de Extracción
- 4.2 Bioensayos Preliminares

4.3 Bioensayos Finales

4.3.1 Análisis Probit

4.4 Pruebas químicas del extracto metanólico de *E. prolifera*

4.5 Métodos cromatográficos

4.6 Espectros

- 5 Discusión
- 6 Conclusión
- 7 Bibliografía

LISTA DE FIGURAS

Figura

1 Alga: *Enteromorpha prolifera*

2 Alga: *Sargassum fluitans*

3 Mosquito: *Aedes aegypti*

4 Espectro IR

5 Espectro RMN ^1H

6 Espectro ^{13}C

7 Espectro DEPT

LISTA DE TABLAS

Tabla

- 1 Resultados del Bioensayo de *Sargassum fluitans*
- 2 Análisis Probit de *S. fluitans*
- 3 Resultados del Bioensayo de *Enteromorpha prolifera*
- 4 Bioensayo final de *E. prolifera*
- 5 Análisis Probit de *E. prolifera*
- 6 Pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales
- 7 Rf y coloración de las fracciones obtenidas.

ABREVIATURAS

^{13}C : carbono 13

CCD: cromatografía capa delgada

cm: centímetro

$\text{CH}_2\text{-Cl}_2$: cloroformo

D: débil

d: doblete

F: Fuerte

g : gramos

IC: intervalo de confianza

IR: infrarrojo

LC: Límite de confianza

LUV: luz ultravioleta

M: mediano

m: multiplete

mg: miligramos

ml: mililitro

ppm: partes por millón

R_f : Relación de frente

RMN: resonancia magnética nuclear

s: singulete

1.- Introducción

La historia del hombre ha estado íntimamente unida a su medio ambiente que le ha proporcionado los elementos necesarios para su mejor desarrollo.

Tanto los productos terrestres como los marinos han sido determinantes en la evolución de la humanidad. Los vegetales son productos renovables que proporcionan alimentos, fibras textiles y también son utilizados como medicamentos. Los productos marinos son una importante fuente de metabolitos secundarios utilizados por el hombre y puesto que la población mundial se incrementa constantemente es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de alimentación y materias primas de diversas industrias, así como de compuestos de origen natural que presenten actividad biológica como bactericidas, fungicidas o larvicidas para especies vectoras de enfermedades como la malaria, dengue, encefalitis y otras.

Los seres humanos han ido aprendiendo finalmente a mantener su población dentro de ciertos límites y a vivir, no obstante la contaminación del aire y del agua pero finalmente se han dado los pasos apropiados para aliviar estos problemas.

Los vegetales en sus diversas formas han sido un factor decisivo en los fenómenos sociales y económicos determinantes en la evolución de la humanidad. Los botánicos clasificaban las plantas en función de si producían frutas, vegetales, fibras o madera y aquellas que se utilizaban como medios curativos.

Ciencias como la Biología y la Química han hecho posible el estudio del

mundo vegetal y en la actualidad del mundo marino, pues el mar ha sido un importante aporte de beneficios para el hombre.

Las algas marinas son las plantas más primitivas y están ampliamente distribuidas en agua dulce y salada, en cuanto al tamaño van desde algas microscópicas unicelulares hasta gigantes que miden más de 100 metros. y son utilizadas como fuente directa de alimento, fertilizantes, cosméticos, forrajes, fármacos, energía, y otros.

Aprovechando las propiedades de las algas se han utilizado extractos acuosos, polvos y residuos de estas para inhibir el desarrollo de plagas, reducir el daño y aumentar la resistencia a enfermedades, aunque esto se ha venido quedando en el abandono debido al uso de productos químicos sintéticos que provocan un desajuste biológico y ecológico.

México es un país extraordinariamente rico en productos marinos y por tal motivo se realizan estudios e investigaciones para el máximo aprovechamiento de los mismos y ante la apremiante necesidad de encontrar alternativas para resolver la problemática ambiental es importante estudiar los extractos de las algas marinas y una vez reconocidas sus propiedades, se podrán utilizar como medidas de control ecológico de: parásitos de plantas, microorganismos patógenos del hombre y animales y plagas de insectos de interés económico y médico-veterinario, con énfasis en la problemática que representa el control de vectores como *A. aegypti* con la finalidad de aportar alternativas viables en el control de mosquitos culícidos con metabolitos vegetales se propuso llevar a cabo la determinación de la actividad larvívora de extractos de *Enteromorpha prolifera* en *Aedes aegypti*.

El dengue de *A. aegypti* transmite padecimientos que en América cobra cada vez mayor importancia debido a la circulación de múltiples serotipos del

virus y representa una enfermedad con mayor impacto en el país, a partir de 1980, las instituciones de salud han diseñado un sistema de vigilancia epidemiológica, que permite interpretar el comportamiento de la enfermedad y la influencia de medidas más adecuadas de prevención y control, Dicho programa contempla un sistema conjunto de factores determinantes en casos de dengue: aspectos clínicos, virológicos, entomológicos y factores de riesgo (Montesanos-Castellanos, 1995).

El noreste de México (Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí) es la región que observa un patrón endémico más acentuado, después del mayor número de casos para 1980. El control de dengue en Nuevo León, se hace básicamente con el combate; personal técnico aplica el larvicida, principalmente cuando se registran brotes de la enfermedad aún cuando estas herramientas son caras y laboriosas (Rodríguez Tovar, 2000)

1.2- Antecedentes

Aunque los análisis del mar se iniciaron a comienzos del siglo XIX, fue hasta 1873-1876 cuando la Química Marina se colocó sobre una base científica y el estudio de los productos naturales ha empezado a ser apreciado como una de las principales fuentes de la Química Orgánica.

El uso de los productos marinos, hablando particularmente de las algas marinas se ha ido extendiendo hacia la industria moderna (Biología Marina, 1962 y 1966). Un gran número de productos cuya base son las algas marinas se ha introducido en el mercado mundial. En la medicina se ha usado por siglos como auxiliares en las ciencias farmacéuticas (Hope, 1979) y recientemente como constituyentes de medicamentos así como en Fitoterapia, Farmacología y áreas relacionadas con los vegetales. Existen más de 30,000 especies y se clasifican en: Chlorophytas (algas verdes), Rodophytas (algas rojas), Phaeophytas (algas cafés) y Cianophytas (algas verde-azul) son plantas bastante antiguas, se han encontrado fósiles del período precámbrico (1 a 3 millones de años)

El uso de las algas se ha incrementado en estos últimos años pues se han ampliado sus áreas de acción. Productos como el agar y el carragenano de las algas rojas y como el ácido alginico y alginatos de las algas cafés son constituyentes que atraen la atención científica.

Constantine en 1977, escribe sobre los aspectos farmacéuticos de los productos algales, los efectos medicinales indirectos y en la nutrición del hombre, ya que se debe considerar que el 60% al 70% de las sustancias que las forman son proteínas y esto es de enorme importancia para la industria de la nutrición.

En estudios realizados por Lewin en 1974 se sugiere que los carotenoides de los cloroplastos tienden a ser una característica filogenética conservativa de las algas y Djarlan y Aguilar en 1976 encontraron que los carotenoides más obtenidos fueron los alfa, beta carotenos, luteína y zeaxantina. Además contienen lípidos (Boyd, 1981) y esteroides tales como Chondriolsterol. Ergosterol, colesterol, encontrados en Clorophyta y Rhodophyta y fucosterol en Phaeophyta (Scheuer, 1979).

Los constituyentes de las algas marinas incluyen: ácidos, alcaloides, aminas, sustancias con actividad: antibacteriana, antibiótica, antifungales y antivirales, celulosa, enzimas, glicósidos, lípidos, esteroides, esteroides, compuestos fenólicos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, alcoholes, péptidos, minerales y sustancias tóxicas (Scheuer, 1979).

Los productos algales son de gran interés en las investigaciones científicas y se han encontrado usos realmente importantes como el agar usado como laxante, en la producción de supositorios, emulsiones, sustrato para cultivos en bacteriología y la agarosa se usa en la electroforesis, filtración en gel y en inmunología para separar sustancias de gran peso molecular. El carragenano es una mezcla de polisacáridos usado como anticoagulante y agente antitrombótico usado en la terapia de úlceras (Hope, 1979) y es un potente inflamatorio in vivo (Abraham et al 1985; Selin y Orzarzahal, 1988) se probó en intestino de animales y provocó efectos inflamatorios y produjo efectos en Sistema Inmune (Thomson, 1981).

El primer reporte acerca de las propiedades antibióticas de las algas marinas fue hecho por Shirahama en 1942 (citado por Pratt et al 1951) que aisló una sustancia de *Cystophyllum hakodantese* que tenía efectos sobre *Lactobacillus bulgaricus* y *L. helveticus*.

Burkholder y colaboradores en 1969 estudiaron algunas especies algales de Puerto Rico y encontraron que más de 150 especies presentaban actividad antibiótica. Otros trabajos más recientes en este campo son los de Naqui en 1980, Campos-Takaki en 1988 y Oranday en 1998.

Con respecto a las Phaeophytas, Levring en 1979 reportó un excelente potencial marino de las especies de algas europeas y Martínez, L.S.J. en 1974 determinó componentes químicos tales como los ficocoloides, β -carotenos y vitamina B-12 de algunas algas de la Península de Yucatán y en Baja California en la República Mexicana e identificó carotenos y determinó que *Turbinaria turbinaria*, presentaba alto contenido de β -caroteno.

En 1973 Abdel y colaboradores obtuvieron de las algas del género *Sargassum*, ácido glucorónico y reportaron la presencia de manosa, galactosa y xilosa. Tiempo después Domínguez en 1979, menciona que las algas de este mismo género son fuente de esteroides y metilesteroides. Del alga café *Dictyota dichotoma* colectada en Okinawa se aislaron 4 lactonas que son tóxicas para las células de melanoma β -16 (Ishitsuka et al, 1988).

Recientemente se aislaron algunos compuestos químicos del alga café *Turbinaria conoides* tales como un fucosterol y un ácido carboxílico con actividad citotóxica y algunos esteroides presentan citotoxicidad sobre leucemia linfocítica en ratón y en carcinoma nasofaríngeo humano (Hornig Sheu, 1988).

Craigie y Mac Lachlan (1964) encontraron en Phaeophyta *Fucus vesiculosus* que libera una sustancia amarilla en el medio y sugirieron que debían ser flavonoides los que presentaban actividad inhibitoria en el crecimiento de otras algas. Conover y Sieburth (1964) observaron que *Sargassum natans* y *S. fluitans* inhiben el desarrollo de parásitos y de especies de vibrio (Rice, 1984).

Rao y Shelat (1979) estudiaron 27 especies de algas entre ellas *Sargassum tenerrimum* y *S. cinctum* y probaron extractos crudos en varias especies de hongos entre los que se encontraba *Candida albicans* y *C. Tropicalis* y encontraron que inhibían sus crecimientos. Scheuer en 1980 menciona que la especie *Sargassum* contiene compuestos azufrados con importancia bactericida sobre todo contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Hope,1982) y *Sargassum natans* presenta actividad antibacterial y antifúngica (García,1995), también se ha demostrado que en cuanto a la actividad inhibitoria el ácido lineico y linolénico inhiben el crecimiento de las algas del género *Chlorella* (Noguchi et al 1978).

Se ha estudiado el desarrollo, crecimiento y reproducción de las algas rojas y su relación con la producción de células específicas y carbohidratos antivirales (Fetter y Neushul, 1988). Con el descubrimiento del primer antiviral y su uso clínico en 1962, se dejó claro que podían utilizarse y aún más se podían obtener (Bauer1985). Se ha descubierto que el agar obtenido de las algas rojas es usado como antiviral (Gonzalez et al, 1987) ya que este inhibe la infección celular y protege a los embriones de pollo del virus B de la influenza (Hope,1982). En trabajos recientes con extractos acuosos de carragenanos y polisacáridos sulfatados realizados por Baba et al 1988; Mitsuya et al y Kuno en 1987, sugieren que estas moléculas pueden inhibir las infecciones virales y que operan dentro y fuera de las células infectadas.

En Uruguay han aislado una amida del alga roja *Chondria atropurpurea* cuya actividad es antihelmíntica y se ha encontrado que esta especie es una fuente rica en terpenoides, ácidos y polisulfidos cíclicos (Davyt,1988).

En la búsqueda de agentes antimicrobianos, los constituyentes lipídicos de algunas algas rojas como las del género *Ceramium* juegan un papel importante.

Se ha patentado el uso de estas algas usando extractos acuosos de *Neodulsea americana* y *N. Integra* (Calvin y Ellis,1979). También se ha patentado el extracto de *Cryptosiphoria wodii* (Nonomu,1985) y el uso de carragenanos y polisacáridos sulfatados para tratamiento de enfermedades incluyendo AIDS causados por retrovirus (Neushul,1988).

Scheuer en 1980 menciona que la especie *Ulva fasciola* contiene compuestos azufrados con importancia bactericida. Este género ha demostrado evidencia de actividad inhibitoria al igual que *Enteromorpha prolifera* , frente a algas planctónicas y otras pudiendo influir en su crecimiento y aún en el de su misma especie. Sin embargo también presenta inhibidores que otras algas no presentan Pratt, 1944, nombró a esta sustancia Chlorelin, determinó sus propiedades y estudió los factores que afectan su producción y acumulación.

Una de las algas que presenta actividad antiinflamatoria es el alga verde *Enteromorpha prolifera* que contiene feofitina A que provoca efectos supresores en una bacteria y suprime la producción de superóxido en macrófagos de ratón e induce la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares humanos (Okai.1997) y en especies encontradas en la India presenta actividad diurética (Naqui,1981).

También se han aislado sesquiterpenos halogenados que causan inactividad celular, este es el caso de *Neomeris annulata* que es un alga verde (Barnehow et al, 1989).

Munro et al (1987) revisó gran cantidad de componentes aislados de fuentes marinas que poseen gran citotoxicidad. Antitumorales marinos estudiados por el mismo Munro incluyen un gran número de diterpenos lineales caracterizados por 1-4 diacetoxibutadieno, que es común en algas verdes (Faulkner,1991) y Fenical y Paul (1984) lo asocian con una gran actividad

biológica. Tres de estos diterpenos inhiben la división celular de los huevos de erizo de mar fertilizados, la fuente de estos compuestos son las Chlorophytas: *Udotea argentea*, *Tidemanía expeditio* y *Chlorodesmis fastigiata* (Paul y Fenical, 1985).

También presentan actividad insecticida y antimalarial, tal es el caso de *Laurencia papillosa* de la que fueron aislados dos compuestos aromáticos (Wright, 1966). Cuando los extractos de las algas *Myrophyllum* y *Potamogeton* se probaron contra larvas de *Aedes occidentalis* y *Culex pipiens*, este último mostró gran resistencia para los dos tipos de extractos (Graham y Schooley, 1984). También fueron probadas toxinas de las algas *Rhizoctonium heiroglyphicum* y *Chlorella ellipsoidea* contra *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Culceta incidens*, las más susceptibles fueron *C. indinans* y *C. quinquefasciatus* y los extractos de *Chlorella* son los más tóxicos (Dhillon, 1982).

En el caso particular de *Chlorella ellipsoidea*, presenta actividad insecticida contra larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* y además muestra actividad inhibitoria en otras especies algales.

Con respecto a la especie *Enteromorpha prolifera* en estudio presenta acción frente a algas planctónicas ya que influye en su crecimiento, a este efecto Rice (1984) lo llama alelopatía quien lo define como un efecto dañino, directo o indirecto por una planta (incluyendo microorganismos) sobre todo a través de la producción de compuestos que son liberados al medio por lo que puede pensarse que esta especie contiene compuestos tóxicos con acción sobre larvas de mosquito, la actividad que nos interesa es contra insectos vectores de enfermedades y existen antecedentes que nos guían a la realización de esta investigación.

En México los estudios en este campo son muy escasos, ya que la

investigación ficológica se ha enfocado principalmente a estudios taxonómicos, ecológicos y de distribución; los pocos reportes que se tienen acerca de la actividad biológica de las algas colectadas en las costas mexicanas han sido realizados generalmente por investigadores extranjeros.

Con este trabajo se pretende impulsar la investigación en este campo y contribuir al conocimiento de la actividad biológica de las algas marinas de nuestro hermoso país e incrementar las fuentes de obtención de insecticidas naturales.

Hipótesis

Los extractos de diferente polaridad de algas marinas muestran actividad biológica sobre larvas del mosquito *Aedes aegypti*.

Objetivo General

Caracterización de metabolitos secundarios de algas marinas con actividad biológica sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Objetivos Particulares

1. Obtención de extractos con solventes de polaridad creciente.
2. Ensayos de actividad biológica de los extractos en larvas de *Aedes aegypti*, en condiciones de laboratorio.
3. Caracterización de metabolitos secundarios de las algas marinas: *Sargassum fluitans* y *Enteromorpha prolifera* var *flexuosa*.

2. Material y Métodos

2.1- Material Biológico

2.1.1 Material Vegetal

2.1.2 Clasificación y descripción botánica de *Enteromorpha prolifera*

REINO: Protista

DIVISIÓN: Chlorophyta

CLASE: Ulvophyceae

ORDEN: Ulvales

FAMILIA: Ulvaceae

GÉNERO: *Enteromorpha*

ESPECIE: *prolifera*

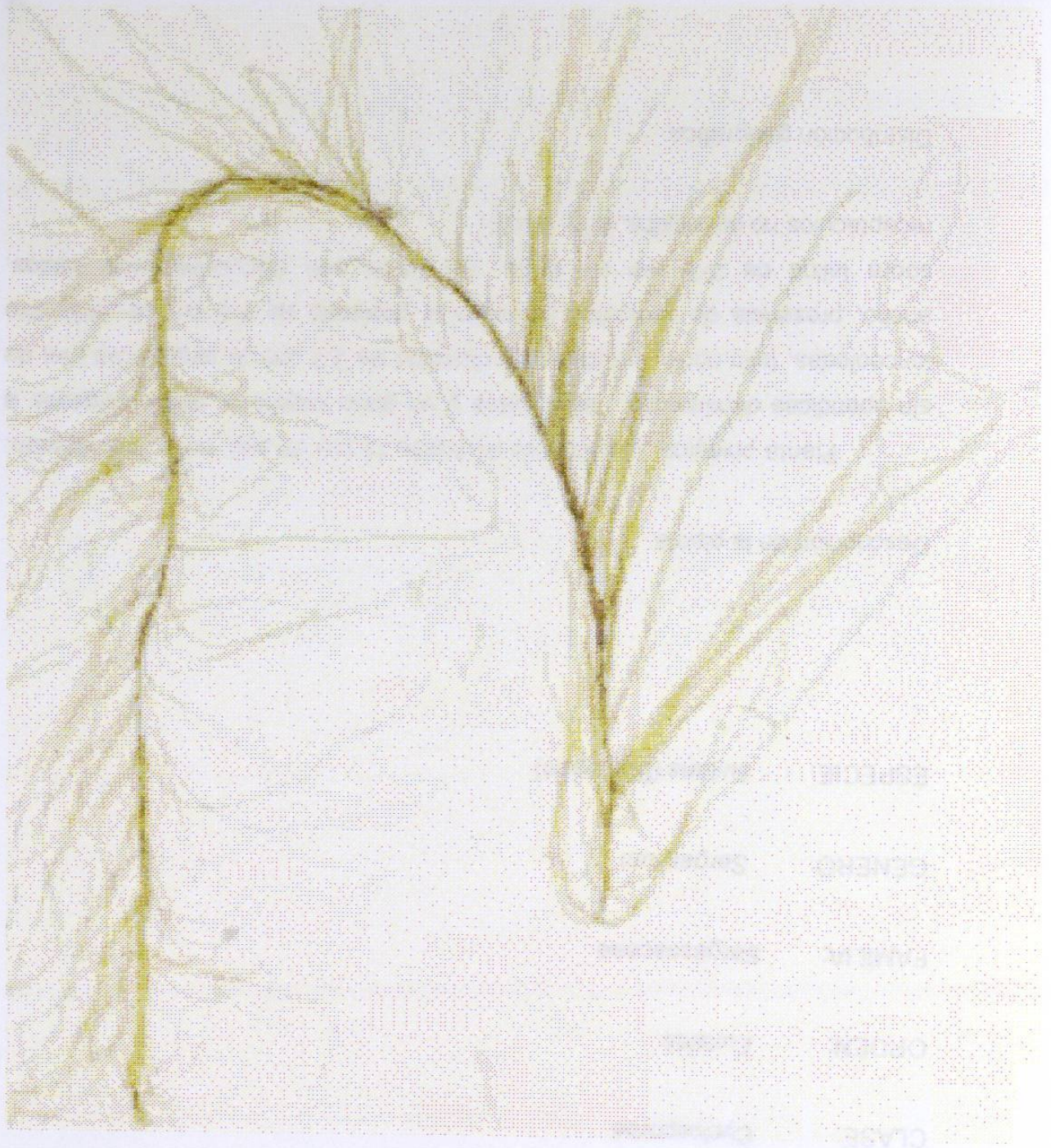
VARIEDAD: *flexuosa* (Wulfer)

Descripción de la planta:

La morfología de *Enteromorpha prolifera* var. *flexuosa* (Fig.No.1) es única, su cuerpo es hueco y su tallo puede ser largo de varios centímetros hasta 2 metros, es tubular y gradualmente dilatado a la base y muy ramificado. Su color es desde el verde oscuro hasta el luminoso debido a los pigmentos fotosintéticos celulares.

Esta alga no siempre ha tenido este nombre. En 1778, O.F. Muller lo clasificó como *Ulva prolifera*, y en 1797, Roth nombró a este mismo organismo como *Conferva clathrata* después en 1811 un ficólogo importante Carl Agardh decide aclarar esta confusión y lo renombra como *Ulva clathrata* aunque después fue su propio hijo quien la reclasificó como *Enteromorpha prolifera*.

Su distribución es comúnmente en las orillas, escolleras y costas. Crece sobre las conchas, rocas y objetos sólidos donde el nivel es bajo y pueden flotar libres. En Marzo y Junio es estéril es decir no es su época de reproducción y presenta 2 generaciones : gametofita y esporofita.



Enteromorpha prolifera

Fig. No 1

2.1.3 Clasificación y descripción botánica de: *Sargassum fluitans*.

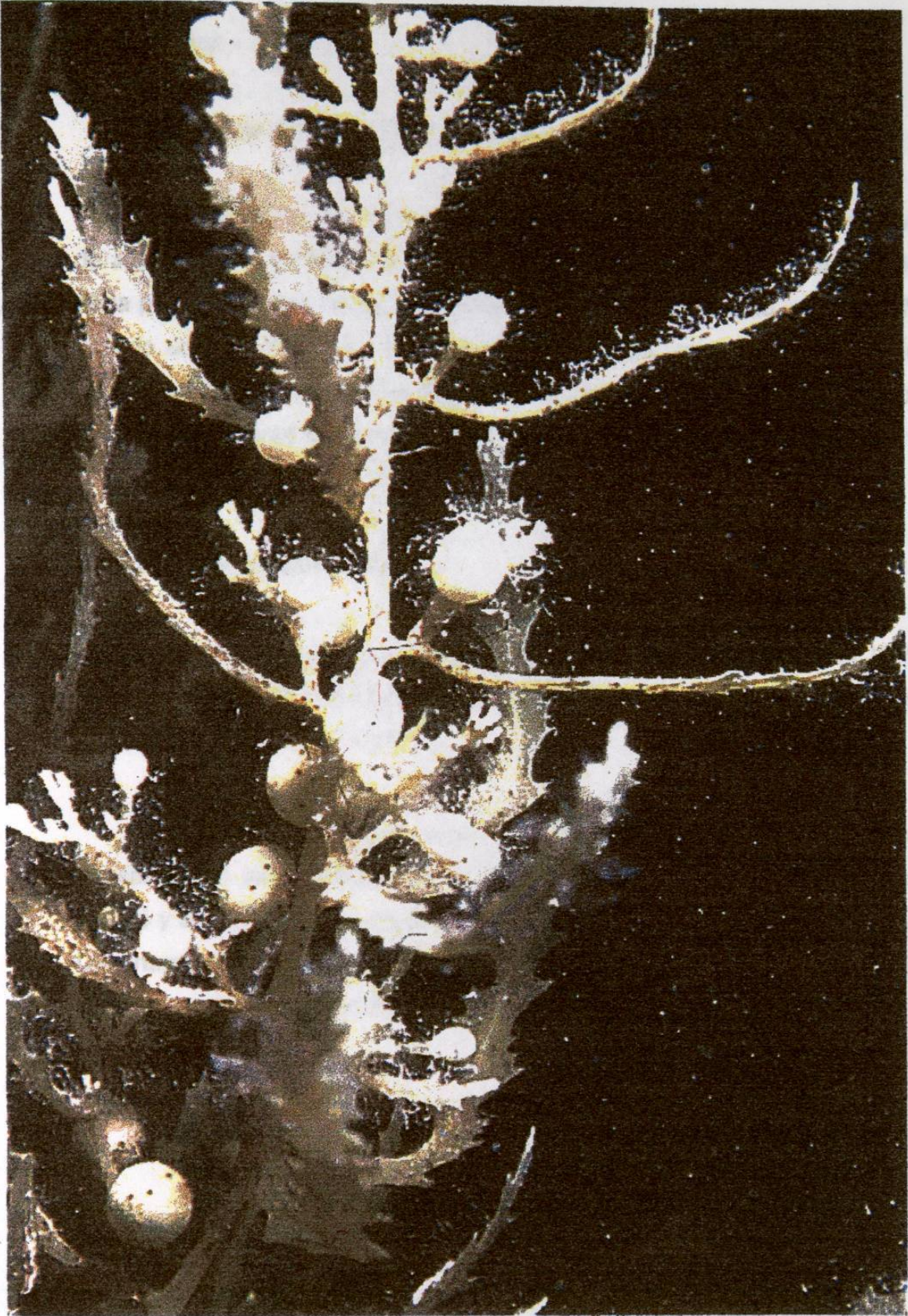
REINO:	Protista
DIVISIÓN:	Phaeophyta
CLASE:	Cyclospora
ORDEN:	Fucales
FAMILIA:	Sargassaceae
GÉNERO:	<i>Sargassum</i>
ESPECIE:	<i>fluitans</i> (Börjesen)

Descripción de la planta:

Planta pelágica, usualmente de hasta 15 cm de alto, color café dorado, 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, (Fig. No.2).

Distribución geográfica:

Asociados con *Sargassum natans*, es común en las aguas de la costa del Atlántico Noerte-Oriente y el Golfo de México.



Sargassum fluitans

Fig. No.2

2.1.4 Colecta

Colecta de Enteromorpha prolifera

La recolección se llevó a cabo en Puerto Vallarta, Jalisco en los meses de Julio de 1997 y 1998, en este lugar *Enteromorpha* crece en las escolleras de la playa sobre las rocas que ahí se encuentran, se colectó por la mañana usando una espátula para separarlas de las rocas, es importante mencionar que únicamente crece ella en ese lugar lo que puede significar que inhibe el crecimiento de otras especies, después se guardaron en bolsas de plástico y se pusieron en hielo para su transportación.

Colecta de Sargassum fluitans:

La recolección se llevó a cabo en Julio de 1994 y en Agosto de 1996 en la Laguna Madre de San Fernando Tamaulipas, esta colecta fue realizada por la Dra. Azucena Oranday Cárdenas.

Una vez colectadas las algas marinas fueron puestas en hielo para su transportación para después ser lavadas y puestas a secar, una muestra se separó y se llevó para su clasificación botánica al Laboratorio de Ficología, del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L la que fue realizada por el Dr. Salomón Martínez Lozano.

2.2 Extracción del material vegetal

Las algas fueron procesadas por separado utilizando la misma metodología y después de lavar y secar al sol, las muestras de algas se procesaron en un molino tipo Wiley y el material seco y molido se dividió en dos partes; una de ellas la extracción se hizo por agitación en frío y la otra por maceración con disolventes de polaridad creciente (Domínguez,1988).

2.2.1 Maceración

En esta técnica el material seco y molido se introdujo en un recipiente con aproximadamente 1 Litro de solvente con 250 gr de planta seca, los solventes usados fueron; eter de petróleo y metanol. El recipiente se dejó a temperatura ambiente(30-35 °C) por un período de 7 días, se drenó el solvente y se añadió más solvente repitiendo la misma operación 2 veces más para cada uno de los mismos.

2.3. Separación

2.3.1 Preparación de placas

Las placas cromatográficas utilizadas en la presente investigación fueron preparadas en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la División de Estudios de Postgrado. Sobre placas de vidrio de 10 x 5 cm con 1 mm de grosor para cromatografía en placa fina de E. Merck A. G. Para elaborar las placas se suspendió sílica-gel 60 g en agua en una proporción de 1 a 3, se aplicó sobre el vidrio con grosor variable, se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y se activaron en una estufa a 100 °C por una hora.

Para el cálculo de Rf (relación de frente) 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.

2.3.1.2 Agentes Cromogénicos.

Las manchas separadas en las placas se detectaron usando una variedad de agentes cromogénicos.

UV (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: Se colocó en un vaso de precipitado conteniendo cristales de yodo y tapado con un vidrio de reloj, después de 20 minutos se observaron las manchas que aparecieron.

Reactivo de Dragendorff : Para esta prueba se corrió una cromatografía en capa delgada y se roció el cromatograma con el reactivo, se considera positivo si persiste por 24 horas las manchas rojas o naranjas.

2.3.2 Cromatografía en columna

2.3.2.1 Cromatografía en columna seca invertida.

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 el 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 que fue disuelta en solventes volátiles en un mortero mezclándola con la sílica en una proporción de 2:1 respectivamente y al evaporarse el solvente se colocó el otro disco de papel filtro y se llenó hasta el extremo con sílica, se cubrió con papel filtro y se le hicieron orificios con un alfiler, 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, teniendo cuidado de fraccionar según los colores desarrollados o los R.f obtenidos en CCF hechas previamente.

2.4 Caracterización de metabolitos secundarios.

2.4.1 Pruebas para grupos funcionales y metabolitos secundarios

2.4.1.1 Prueba de la Flama.

Se utiliza para diferenciar un compuesto orgánico de uno inorgánico. Se coloca una pequeña muestra en una asa de platino y se lleva a la flama, si quedan cenizas se concluye que el compuesto es inorgánico.

2.4.2 Prueba de Insaturaciones.

2.4.2.1 Prueba de Permanganato de potasio: Se disolvió una pequeña parte de la muestra en agua, acetona o metanol y se agrega KMnO_4 al 2% en agua, la prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café.

2.4.2.2 Prueba del Bromo: Se disuelve 1-2mg. de la muestra en 1 ml. de CCl_4 y se agrega gota a gota una solución al 2% de Bromo en CCl_4 . La prueba es positiva si el bromo se decolora.

2.4.3 Prueba para fenoles.

2.4.3.1 Prueba del Cloruro Férrico: Se hace disolviendo 1-2 mg. de la muestra en 1 ml.de agua o etanol y después se le añaden unas gotas de cloruro férrico. La aparición de un precipitado rojo, azul violeta ó verde se considera positiva.

2.4.4 Prueba para Esteroles.

2.4.4.1 Prueba de Lieberman Burchard: Se disuelve una pequeña cantidad de muestra en Cloroformo para luego añadir el reactivo que se prepara agregando

una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1 ml. de cloroformo, la aparición de una coloración (desde azul hasta morado) en el lapso de 1 hora determina que la prueba es positiva.

2.4.4.2 Prueba de Salkowski: Similar a la anterior, la muestra en 1 ml. de cloroformo se pone en contacto con 1 ml.de ácido sulfúrico, desarrollando colores amarillo ó rojo, para esteroides y metilesteroides.

2.4.5 Prueba para grupo Furano.

2.4.5.1 Prueba de Ehrlich: La muestra se disuelve en etanol y se agrega una solución al 5% de p-dimetilaminobenzaldehído en etanol y se coloca en una cámara conteniendo vapores de ácido clorhídrico, es positiva al aparecer coloración naranja.

2.4.6 Prueba para Carbohidratos.

2.4.6.1 Prueba de Molish: En un tubo de ensayo se coloca 1 mg. de la muestra y se añade el reactivo de Molish, el cuál se prepara añadiendo 1 g. de alfa naftol en 100 ml. de alcohol etílico, se inclina el tubo y se agrega 1 ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes. La prueba es positiva al formarse un anillo coloreado en la interfase.

2.4.7 Prueba para Cumarinas.

Se disuelve 1-2 mg. de la muestra en solución de hidróxido de sodio al 10%, si aparece color amarillo que desaparece al acidular la prueba es positiva.

2.4.8 Prueba para Sesquiterpenlactonas.

2.4.8.1 Prueba de Baljet: Se utilizan 2 soluciones que se mezclarán en iguales volúmenes antes de usarse; Solución A: 1 g. de ácido pícrico en 100 ml. de etanol y Solución B: 10 g. de hidróxido de sodio en 100 ml. de agua. Para esta prueba se ponen 2-3 mg. de la muestra y de 3 a 4 gotas del reactivo. Es positiva si se forma una coloración naranja ó roja oscura.

2.4.9 Prueba para Quinonas.

2.4.9.1 Prueba de Borntrager: Se hierve por 10 minutos un poco de material con hidróxido de potasio al 2-5%, se enfría la solución y se acidula, extrayéndose posteriormente con benceno. La capa de benceno se separa y se agrega solución de hidróxido de potasio Si la fase de benceno se decolora y la alcalina se torna roja, la prueba es positiva.

2.4.10 Prueba para Flavonoides.

2.4.10.1 Prueba de Shinoda: La muestra se disuelve en etanol y se trata con limaduras de magnesio, se aplica calor (60°C) y después unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, la prueba se considerará positiva si se presenta color naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

2.4.11 Prueba para Alcaloides.

2.4.11.1 Prueba de Dragendorff: Consta de 2 soluciones; Solución A: se preparará disolviendo 0.85g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 ml. de ácido acético glacial y 40 ml. de agua, y la Solución B: se disuelven 8 g. de

Yoduro de potasio en 20 ml. de agua. Para el reactivo se mezclarán 5 ml. de solución A y 4 ml. de solución B y 100 ml. de agua. Se corre una cromatografía en capa delgada para esta prueba y se rocía el cromatograma con el reactivo, será positiva si persisten por 24 horas, manchas rojas ó naranjas.

2.5.1 Métodos espectroscópicos

Los espectros de Resonancia Magnético Nuclear fueron determinados en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L por la Dra. Noemí Waksman.

Espectroscopía infrarroja: Los espectros se determinaron en un espectrómetro Perkin Elmer, Paragon 2,000 FTIR.

Espectroscopía de resonancia magnético nuclear: Fueron realizados en un espectrómetro Bruker DPX 400 del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de U.A.N.L.

Espectroscopía de RMN doble dimensión: Espectrómetro Bruker DPX 400, del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de U.A.N.L.

2.6 MATERIAL ENTOMOLOGICO

2.6.1 Establecimiento de colonias de mosquitos *Aedes aegypti* para los bioensayos.

Clasificación sistemática del mosquito *Aedes aegypti*

ORDEN: Díptera

SUBORDEN: Nematocera

FAMILIA: Culicidae

SUBFAMILIA: Culicinae

TRIBU: Culicini

GÉNERO: *Aedes*

ESPECIE: *aegypti* (Linnaeus)

En América el único vector del dengue comprobado es *A. aegypti*, aún cuando recientemente se ha introducido *Aedes albopictus*, el cuál puede transmitir el virus (Vector topics, 1980).

Aedes aegypti (Fig. No. 3) está distribuido en regiones tropical y subtropical del mundo (Carpenter y Le Casse, 1971), aunque su origen es incierto es considerado endémico del Africa y se estableció en América al introducirse en los viajes de Cortés. Es un mosquito cosmopolita y las hembras se alimentan de sangre preferentemente humana.

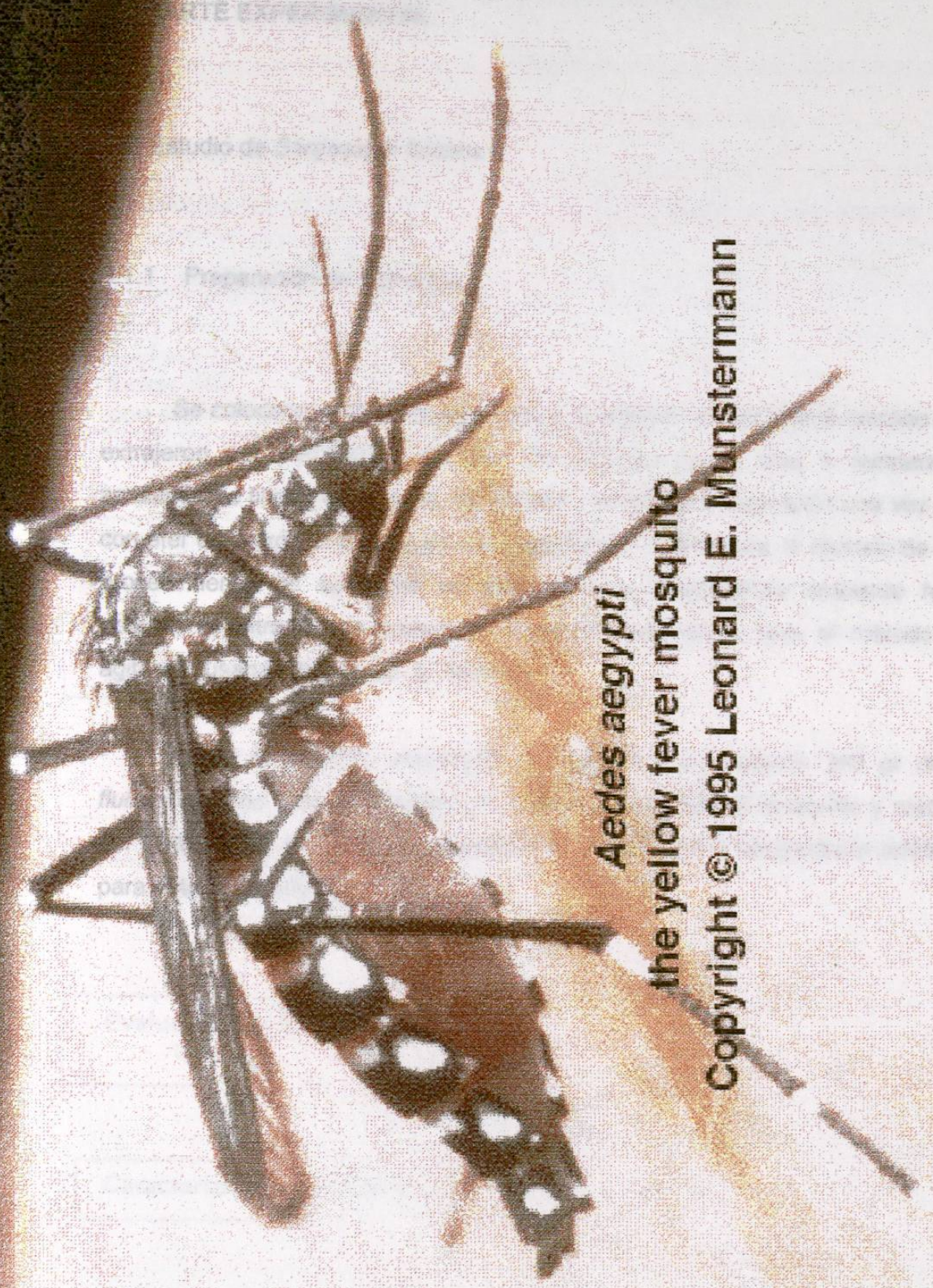
Establecimiento de Colonia

Para el inicio de la colonia se llevaron a cabo colectas de larvas y pupas en casas habitación ubicadas en Escobedo, N.L. en el mes de mayo de 1997. El material fue trasladado al Laboratorio de Entomología y Artrópodos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L y las larvas ya identificadas fueron colocadas en charolas de plástico dentro de una jaula preparada para la obtención de adultos y se alimentaron diariamente con un pulverizado a base de croquetas de perro previamente molidas. Una vez obtenidos los adultos, los machos y hembras se alimentaron con miel diluída en agua (10%) aplicada en torundas de algodón y la alimenración de las hembras fue complementada con sangre cada tercer día, es importante mencionar que aún cuando se ha demostrado que *A. aegypti* se alimenta en un porcentaje variable de hospederos diferentes al hombre se trató de alimentarlas usando un conejo y después un pollo pero no resultó la toma de sangre, así que la única dieta que aceptaron fue sangre humana, También fue importante la hora de alimentación y la temperatura ya que en días fríos (debajo de los 20 °C) no se acercaban y la hora adecuada para alimentarlas fue por las mañanas.

En las charolas de plástico se colocaron tirillas de terciopelo rojo como

sustrato de oviposición y eran retiradas después de 3 días y se secaban para su uso posterior.

Cuando fue requerido el material biológico (larvas del tercer y cuarto estadio) las bandas de huevecillos almacenadas fueron puestas a eclosionar en agua reposada, y las larvas alimentadas con la dieta ya descrita ; las larvas de los estadios requeridas para los bioensayos eran separadas y el resto fueron mantenidas para continuar la colonia.



Aedes aegypti
the yellow fever mosquito
Copyright © 1995 Leonard E. Munstermann

Aedes aegypti

3. PARTE EXPERIMENTAL

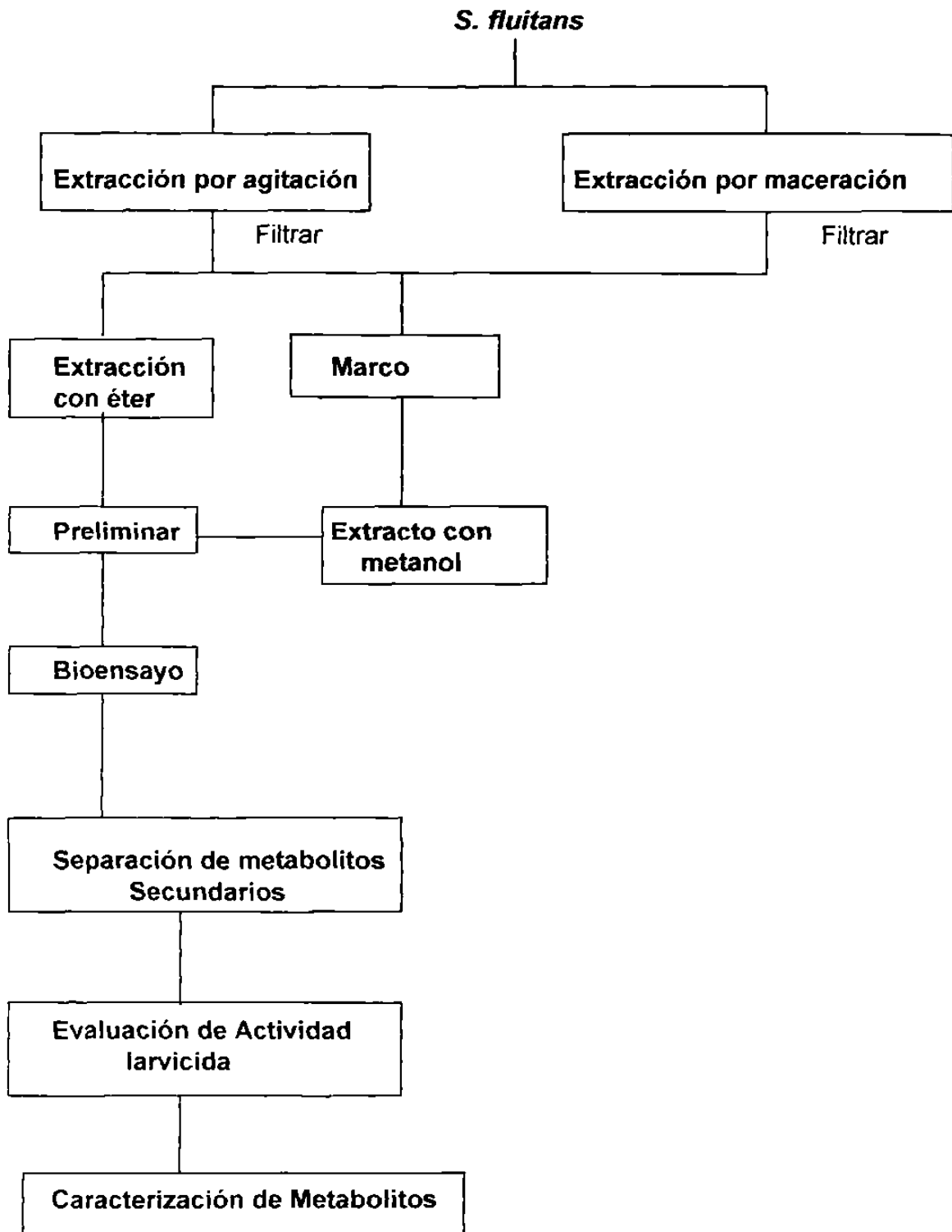
3.1 Estudio de *Sargassum fluitans*

3.1.1 Preparación de Extractos

Se colocaron 130 gr de alga seca y molida en un recipiente cerrado y se extrajeron por maceración en éter de petróleo por 7 días a temperatura ambiente, se filtró y en la parte no soluble se repitió la operación una vez más con éter de petróleo y después con metanol por 7 días más, al término de este procedimiento los solventes se evaporaron a temperatura ambiente hasta obtener el extracto, se realizó el mismo procedimiento para el método por agitación usando 280 gr de *S. fluitans*.

Para el extracto preparado por agitación se pesaron 280 gr de *S. fluitans* usando éter de petróleo por 7 días a temperatura ambiente y metanol por 7 días más, después los solventes se evaporaron a temperatura ambiente para obtener el extracto.

3.1.2 DIAGRAMA DE FLUJO



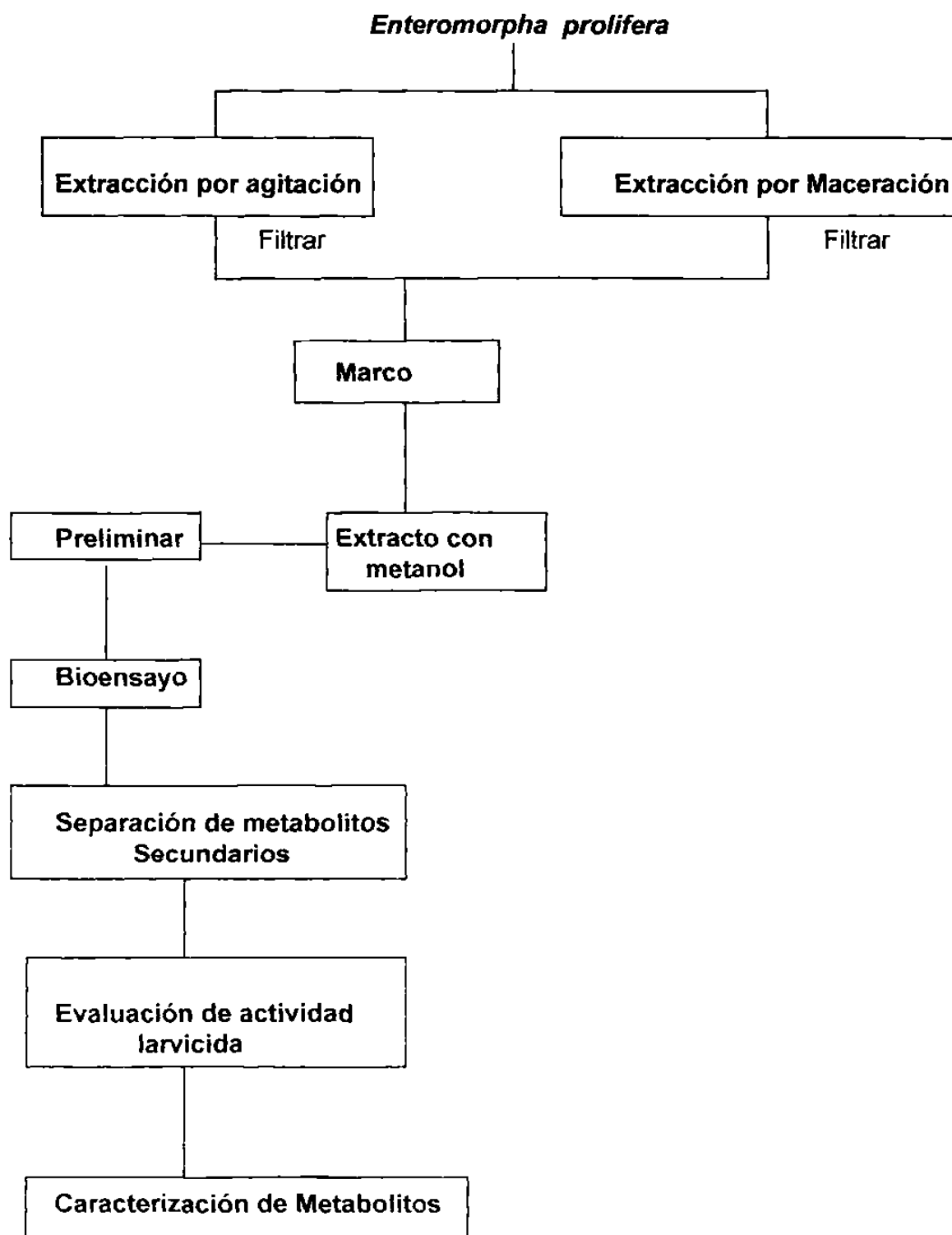
3.2 Estudio de *Enteromorpha prolifera*

3.2.1 Preparación de extractos

Se usaron 290 gr de *E. prolifera* en un recipiente cerrado para la extracción por maceración a temperatura ambiente con éter de petróleo por 7 días y después de filtrar se repitió la operación con metanol, al término de los cuáles los solventes se evaporaron para la obtención del extracto.

En la extracción por agitación se utilizaron 375 gr de la muestra seca y molida usando éter de petróleo por 7 días y después metanol por 7 días más, después los solventes se evaporaron a temperatura ambiente para obtener el extracto.

3.2.2 DIAGRAMA DE FLUJO



3.3 Ensayo de Actividad

Se prepararon 5 dosis de cada extracto de las algas *Sargassum fluitans* y *Enteromorpha prolifera* que fueron establecidas en un rango de respuesta (Mortalidad) en los preliminares de 10-90% como mínima y máxima respectivamente, se usaron 20 larvas de *Aedes aegypti* del tercer y cuarto estadio fueron colocadas en vasos desechables transparentes conteniendo 100 ml de agua y la dosis respectiva.

Cada dosis se hizo con 4 réplicas y un testigo por dosis. La mortalidad fué registrada a las 24 horas de exposición y los datos obtenidos son analizados por el método Probit (Finney,1971) para obtener la concentración letal 50 y 90%, y el análisis de varianza con un diseño completamente al azar para la comparación de diferentes extractos (Zar,1974).

4 RESULTADOS

4.1 METODOS DE EXTRACCIÓN

Se realizaron los dos métodos de agitación y de maceración para ambas especies, en el caso de *Sargassum* se obtuvo una cantidad de 1.83 gr procesados de 280 gr por el método de agitación y con respecto al método de maceración se obtuvieron 0.7 gr procesados de 130 gr la muestra.

Para *Enteromorpha* se utilizaron 290 gr para el método de maceración de los cuales se obtuvieron 1.10 gr de la muestra y por el método de agitación se procesaron 375 gr y se obtuvieron 2.98 gr de la muestra.

Se observó en los resultados que el extracto obtenido por el método de agitación, resultó con mayor actividad en ambas especies y particularmente en el caso de *Sargassum* con esa cantidad obtenida solo se efectuaron los Bioensayos preliminares y finales.

4.2 BIOENSAYOS PRELIMINARES

Se analizaron extractos metanólicos de una rodophyta, tres pheophytas y una chlorophyta para probar su actividad biológica con la metodología descrita en el punto 3.3 y se encontró que solo 2 de ellos: la chlorophyta *Enteromorpha prolifera* y la phaeophyta *Sargassum fluitans* presentaron actividad sobre las larvas del mosquito *Aedes aegypti*. El extracto de *Sargassum fluitans* presentó actividad en la concentración de 100 ppm en la que se observó el 100 % de mortalidad y en la dosis de 50 ppm fue el 30%.

El segundo extracto fue de una Chlorophyta o alga verde cuyo género es *Enteromorpha prolifera* cuya dosis de 100 ppm presentó un 100% de mortalidad y aún en la de 50 ppm la mortalidad que se presentó fue del 70%.

4.3 BIOENSAYO FINAL

Los bioensayos finales se efectuaron con 5 dosis (punto 3.3) , tomando como referencia los bioensayos preliminares, las dosis seleccionadas para *S. fluitans* que fueron en el rango de 12.5 ppm y de 90.0 ppm como mínima y máxima respectivamente. La mortalidad de las larvas se observó a las 24 horas post tratamiento y fue registrado el 30 % de mortalidad en la dosis de 50 ppm y del 80 % en la dosis de 80 ppm respectivamente.

DOSIS	MORTALIDAD
12.5 ppm	0 %
25.0 ppm	0%
50.0 ppm	30%
70.0 ppm	60%
90.0 ppm	80%
Testigo	0%

Tabla No. 1 Resultados del bioensayo de *S. fluitans* en el extracto metanólico Después de 24 horas de exposición.

4.3.1 ANALISIS PROBIT DE *Sargassum fluitans*

DOSIS	No. De Insectos	Concentración (ppm)	Mortalidad Bruta	Mortalidad corregida	Probits Calculada
1	80	50	30	30	5.48
2	80	70	60	60	5.25
3	80	90	80	80	5.84

Tabla No. 2. Bioensayo de *S. fluitans*

De acuerdo a los resultados de la tabla anterior se obtuvieron los siguientes datos procesados por análisis Probit obteniendo:

$LC_{50} = 62.158$ ppm ; I.C. = 67.725 ppm (Superior) y 57.049 ppm (Inferior)

$LC_{90} = 115.998$ ppm ; I.C. = 140.667 ppm (Superior) y 95.325 ppm (Inferior)

Ecuación de regresión = $Y = -13.26 + 4.81x$

X^2 Calculada = 2.75

X^2 (5%) = 3.841

Testigo = 0 muertos

Los resultados indican que la población es homogénea pues la X^2 calculada es menor que la $X^2 \alpha$ (5%).

En los bioensayos preliminares, las dosis seleccionadas para *E. prolifera* que fueron en el rango de 5.0 ppm y de 50.0 ppm como mínima y máxima respectivamente. La mortalidad de las larvas se observó a las 24 horas post tratamiento y fue registrado el 10 % de mortalidad en la dosis de 5 ppm y del 100 % en la dosis de 35.5 ppm y de 50 ppm .

DOSIS	MORTALIDAD
5.0 ppm	10%
12.5 ppm	30%
25.0 ppm	50%
35.5 ppm	100%
50.0 ppm	100%
Testigo	0%

Tabla No. 3 Resultados del bioensayo de *E. prolifera* en el extracto metanólico después de 24 horas de exposición.

En estos resultados se observó la elevada mortalidad causada desde la concentración de 5 ppm con un 10% hasta la de 50 ppm con un 100% por tal motivo se realizó otro bioensayo en los que se prepararon concentraciones desde 3 ppm hasta 35 ppm, los resultados aparecen en la tabla No. 4.

Las dosis seleccionadas para *E. prolifera* fueron en el rango de 5.0 ppm y de 50.0 ppm como se mostró en la tabla No. 3 y la mortalidad de las larvas se observó a las 24 horas post tratamiento y fue registrado el 10 % de mortalidad en la dosis de 5 ppm y del 100 % en la dosis de 35.5 ppm y de 50 ppm debido a esa elevada mortalidad se realizó un último bioensayo cuyos resultados se presentan en la tabla No.4

DOSIS	MORTALIDAD
3.0 ppm	Todas vivas
11.5 ppm	Todas vivas
18.0 ppm	Todas vivas
27.5 ppm	32 Muertas
35.0 ppm	48 Muertas
Testigo	Todas vivas

Tabla No.4 Bioensayo de *E. prolifera* en el extracto metanólico despues de 24 horas de exposición.

Los resultados obtenidos en la tabla anterior mostraron que en las dosis de 27.5 ppm y de 35 ppm presentaron actividad larvicida no así en las dosis de 3 ppm, 11.5 ppm y 18 ppm cuyos resultados mostraron que en dosis pequeñas las larvas de *A. aegypti* permanecieron vivas al igual que el testigo.

Los análisis de Probit para estos datos no pudieron efectuarse porque solo se obtuvieron 2 datos de mortalidad.

4.3.2 ANALISIS PROBIT DE *Enteromorpha prolifera*

DOSIS	No. de Insectos	Concentración (ppm)	Mortalidad Bruta	Mortalidad corregida	Probits Calculada
1	80	5	10	10	3.72
2	80	12.5	30	30	4.48
3	80	25	50	50	5.00
4	80	50	100	100	6.42

Tabla No. 5 Bioensayo de *Enteromorpha prolifera*

De acuerdo a los datos establecidos en esta tabla se obtuvieron los siguientes resultados:

$LC_{50} = 18.732 \text{ ppm}$; I.C. = 21.375 ppm (Superior) y 16.381 ppm (Inferior)

$LC_{90} = 57.97 \text{ ppm}$; I.C. = 75.542 ppm (Superior) y 47.428 ppm (Inferior)

Ecuación de regresión: $Y = -3.67 + 2.65 x$

X^2 Calculada = 10.771

X^2 (5%) = 5.991

Testigo = 0 muertos

La heterogeneidad de la población es relativamente alta ya que el resultado de la X^2 calculada superó a la $X^2 \alpha(5\%)$.

ANALISIS DE COMPARACIÓN

Desde el punto de vista de comparación de ambas especies de acuerdo a los valores de las LC_{50} que para *S. fluitans* fue de 62.158 ppm y para *E. prolifera* de 18.732 ppm se observó que no hubo mucha diferencia en la sensibilidad de la población, lo que indica que ambas especies tienen funciones muy idénticas para el control del mosquito.

En el caso de las LC_{90} que para que para *S. fluitans* fue de 115.998 ppm y para *E. prolifera* de 57.97 ppm se observó una diferencia marcada para ambas especies resultando más efectiva la dosis de LC_{90} para la *E. prolifera* puesto que requiere menor dosis para matar a la población.

4.4 Pruebas químicas del extracto metanólico de *Enteromorpha prolipera*

Los resultados de las pruebas químicas realizadas se resumen en la tabla No. 5; resultando positivas las efectuadas para insaturaciones, oxhidrilos fenólicos, y las pruebas que establecen la presencia de metabolitos secundarios fueron positivas para: cumarinas, sesquiterpenlactonas y de alcaloides.

PRUEBAS		RESULTADO
Prueba de KMnO_4	Insaturaciones	Positiva
Prueba de FeCl_3	Oxidrilos Fenólicos	Positiva
Prueba de Salkowski	Esteroides	Negativa
Prueba de NaOH	Cumarinas	Positiva
Prueba de Baljet	Sesquiterpen- lactonas	Positiva
Prueba de H_2SO_4	Flavonoides	Negativa
Prueba de Dragendorff	Alcaloides	Positiva

Tabla No. 6 . Pruebas químicas para la identificación de los grupos funcionales del extracto metanólico.

4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.5.1 Separación de fracciones por cromatografía preparativa del extracto metanólico de *E. prolifera*.

Se prepararon placas cromatográficas como se explicó en el punto No.2.3.1.1, una pequeña cantidad del extracto metanólico se depositó en la placa usando un capilar ó micropipeta y se colocó en una en una cámara de vidrio conteniendo un eluente determinado según la polaridad requerida(de acuerdo a la naturaleza de los componentes del extracto).

En la CCD se utilizó el eluente CHCl_3 -Metanol en una proporción de 7:3 y los agentes cromogénicos utilizados fueron: LUV, Vapores de Iodo y reactivos específicos como Dragendorff.

Los resultados de la separación cromatográfica del extracto metanólico se presentan en la tabla No. 6

MANCHA	VISIBLE	UV	RF
1	VERDE	ROJA	0.8
2	AMARILLA	AMARILLA	0.58
3	CAFE	CELESTE	0.3

Tabla No. 7. Rf y coloración de las diferentes fracciones obtenidas

Se realizó la evaluación de la actividad larvícida en las tres fracciones dando mejores resultados la mancha roja con un R_f de 0.8 a la que se le realizaron pruebas químicas y espectroscópicas dando positivo para alcaloides con el reactivo de Dragendorff, lo cuál fue comprobado con el espectro IR de la figura No. 4

4.6 ESPECTROS

Espectro IR en cm^{-1} : Fig. No.4

3000 – 3600 (F)

1640 (F)

1400 (D)

1000 (M)

500 – 690 (F)

Espectro RMN ^1H en ppm : Fig. No.5

0.80 (d) 3 ^1H

1.18 (s) 4 ^1H

1.44 (s) 3 ^1H

2.95 (s)

3.03 (s)

3.14 (s)

3.66 (m)

Espectro RMN ^{13}C en ppm: Fig. No.6

Este espectro presentó las siguientes señales a:

1 - 14.11

1 - 22.97

1 - 25.15

1 - 24.56

3 - 28.59, 28.82, 29.15

1 - 31.41

1 - 33.50

1 - 61.00

1 - 51.00

10 - Entre 70 y 80

1 - 81.00

1 - 92.96

2 - 102 y 107

Espectro DEPT en ppm: Fig. No.7

1 metilo - 14.11
1 metileno - 22.97
1 metilo - 25.15
1 metileno - 24.56
3 metileno - 28.59, 28.82, 29.15
1 metileno - 31.41
1 metileno - 33.50
1 metileno - 61.00
1 metino - 51.00
10 metino - Entre 70 y 80
1 metino - 81.00
1 metino - 92.96
2 carbonos cuaternarios - 102 y 107

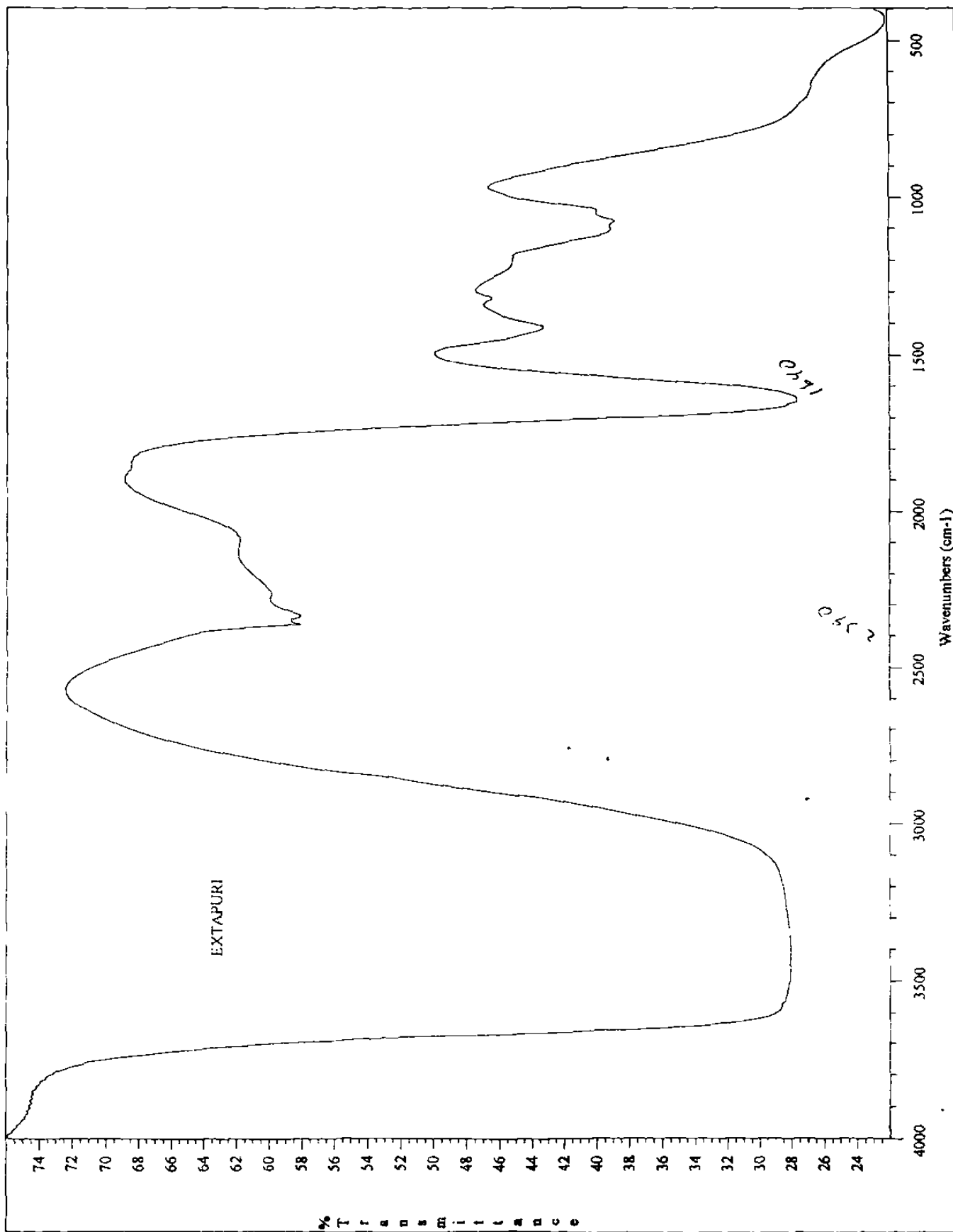


Fig. No 4 Espectro IR

ExtractoA. DMSO-d6

Current Data Parameters
 Name ExtractoA
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 990426
 Time 16.05
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm MjJlmu
 PULPROG zg
 TD 13548
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 2
 SWH 6775.068 Hz
 FIDRES 0.500079 Hz
 AQ 0.9998924 sec
 RG 28.5
 DM 73.800 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.5000000 sec
 P1 12.50 usec
 DE 8.00 usec
 SFO1 400.1333999 MHz
 NUC1 1H
 PL1 -3.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 8192
 SF 400.1300012 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 5.855 ppm
 F1 2342.80 Hz
 F2P 0.475 ppm
 F2 190.09 Hz
 PPMCM 0.26900 ppm/cm
 HZCM 107.63592 Hz/cm

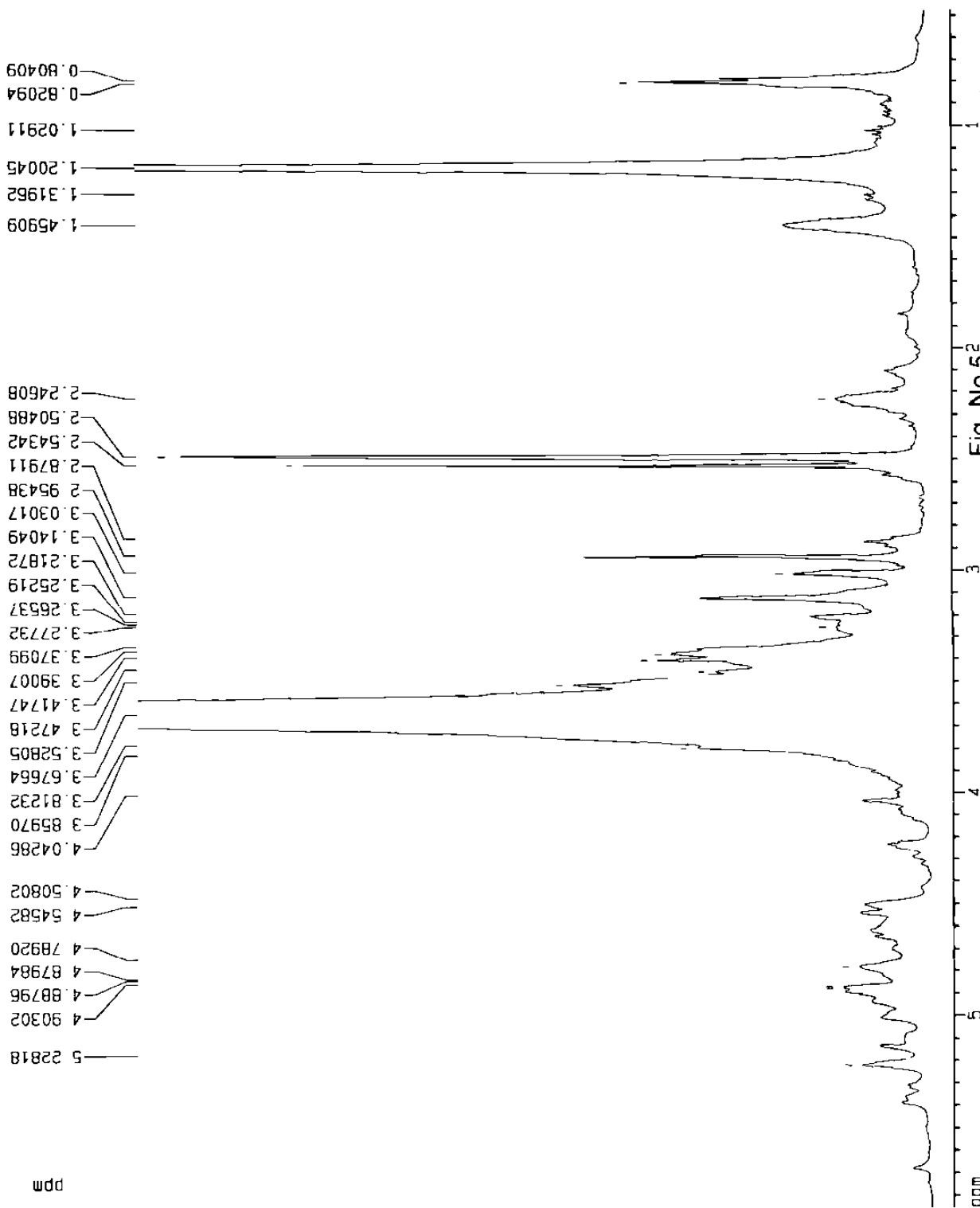


Fig. No 52 Espectro RMN 1H

ExtractoA, DMSO-d6

Current Data Parameters
 NAME ExtractoA
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

Date_ 990426
 Time 19 47
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg
 TO 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 4880
 DS 4
 SMH 21551.725 Hz
 FIDRES 0.657706 Hz
 AQ 0.7602676 sec
 RG 4096
 DN 23.200 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.0 K
 d11 0.0300000 sec
 d12 0.0000200 sec
 PL13 15.00 dB
 D1 2.00000000 sec
 CRPPRG2 waltz16
 PCPD2 105.00 usec
 SF02 400.1316005 MHz
 NUC2 1H
 PL2 -3.00 dB
 PL12 16.00 dB
 P1 10.25 usec
 DE 8.00 usec
 SF01 100.6231338 MHz
 NUC1 13C
 PL1 -1.00 dB

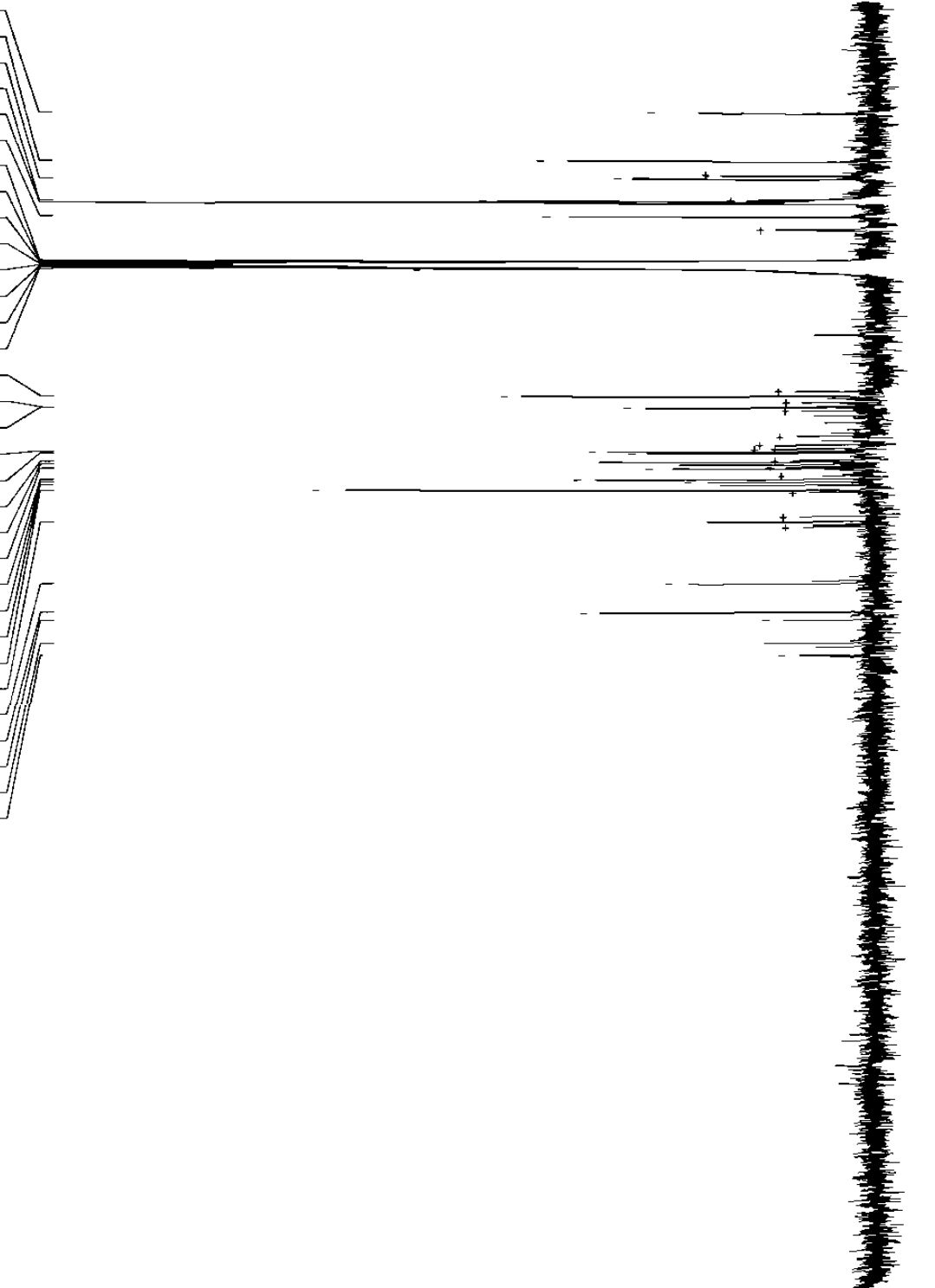
F2 - Processing parameters

SF 32768
 SF 100.6127993 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

10 NMR plot parameters

CX 20.00 cm
 F1P 210.000 ppm
 F1 21128.89 Hz
 F2P -5.000 ppm
 F2 -503.06 Hz
 PPMCM 10.75000 ppm/cm
 HZCM 1081.58765 Hz/cm

104.078
 102.115
 98.267
 96.976
 92.274
 81.938
 76.808
 75.847
 75.369
 74.942
 73.113
 72.462
 72.017
 70.594
 70.319
 63.122
 63.087
 61.201
 40.339
 40.053
 39.844
 39.635
 39.426
 39.217
 39.008
 38.799
 31.414
 29.152
 28.822
 25.155
 22.230
 14.114



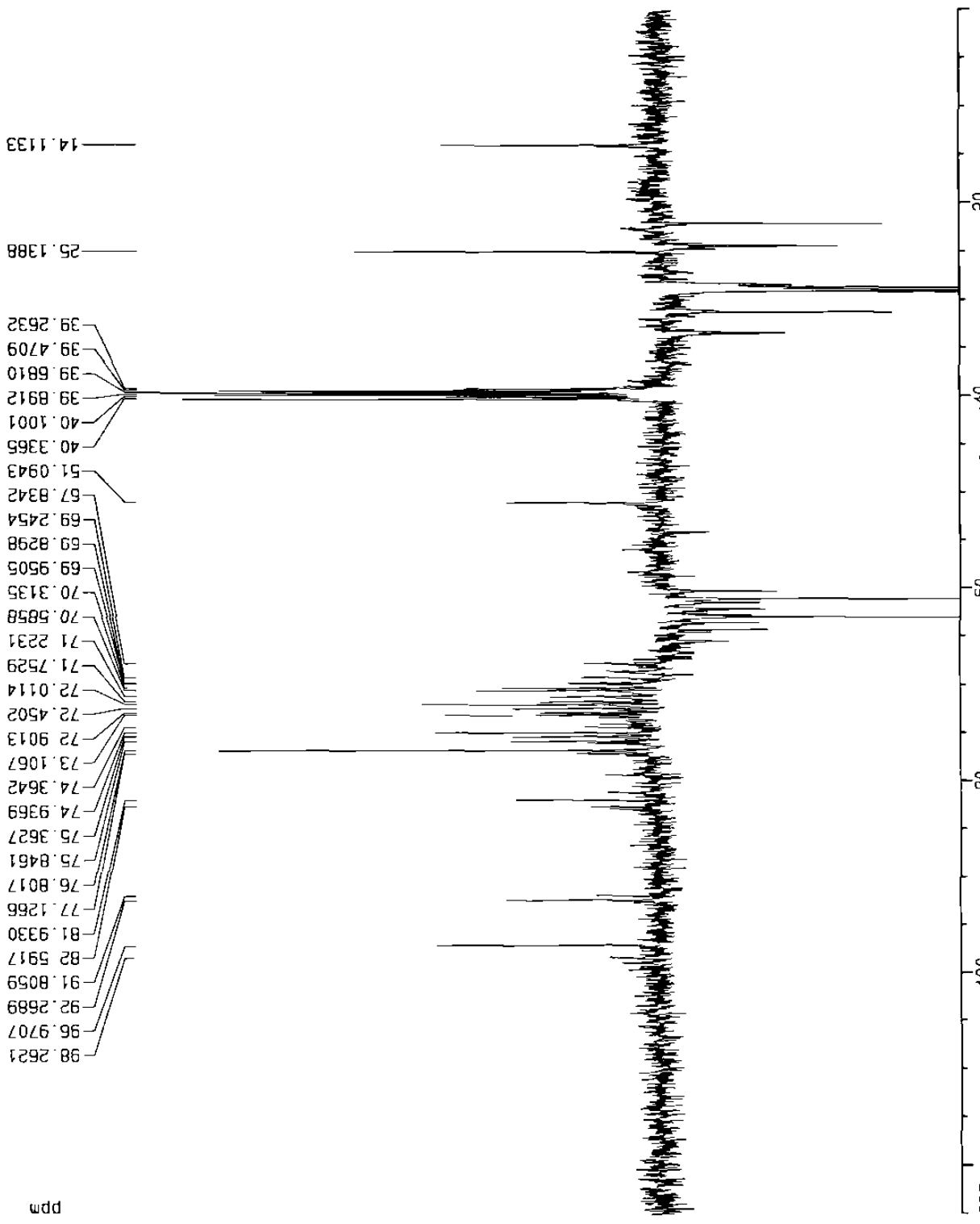
ppm
 Espectro RMN ¹³C
 Fig. No 6

Extracto A

Current Data Parameters
 NAME Extracto-A
 -XPRNO 4
 -PROCNO 1

2 - Acquisition Parameters
 Date_ 990709
 Time 13.31
 INSTRUM spect
 PROCNO 5 mm Multinu
 PULPROG dept135
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 12288
 DS 6
 SMH 16025.641 Hz
 FIDRES 0.463064 Hz
 AQ 1.0224116 sec
 RG 8192
 CW 31.200 usec
 JC 8.00 usec
 TE 300.0 K
 P1 10.25 usec
 P2 20.5 usec
 P3 13.00 usec
 P4 26.0 usec
 CNST2 145.000000
 D2 0.0034483 sec
 d12 0.000200 sec
 DELTA 0.000131 sec
 J1 2.00000000 sec
 FL2 -3.00 dB
 SF02 400.1315005 MHz
 NUC2 1H
 SF01 100.620780 MHz
 NUC1 13C
 PL1 -1.00 dB
 PL2 16.00 dB
 JC 8.00 usec
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 105.00 usec

2 Processing parameters
 SI 16384
 SF 100.6127984 MHz
 NDM EM
 SSB 0
 LB 2.00 Hz
 GB 0
 GC 1.40
 1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 125.000 ppm
 F2 12576.60 Hz
 ZP 0.000 ppm
 Z 0.00 Hz
 -PRCM 6.25000 ppm/cm
 -ZCN 626.63002 Hz/cm



98.2621
 96.9707
 92.2689
 91.8059
 82.5917
 81.9330
 77.1266
 76.8017
 75.8461
 75.3627
 74.9369
 74.3642
 73.1067
 72.9013
 72.4502
 72.0114
 71.7529
 71.2231
 70.5858
 70.3135
 69.9505
 69.8298
 69.2454
 67.8342
 51.0943
 40.3365
 40.1001
 39.8912
 39.6810
 39.4709
 39.2632
 25.1388
 14.1133

Fig. No 7

ppm

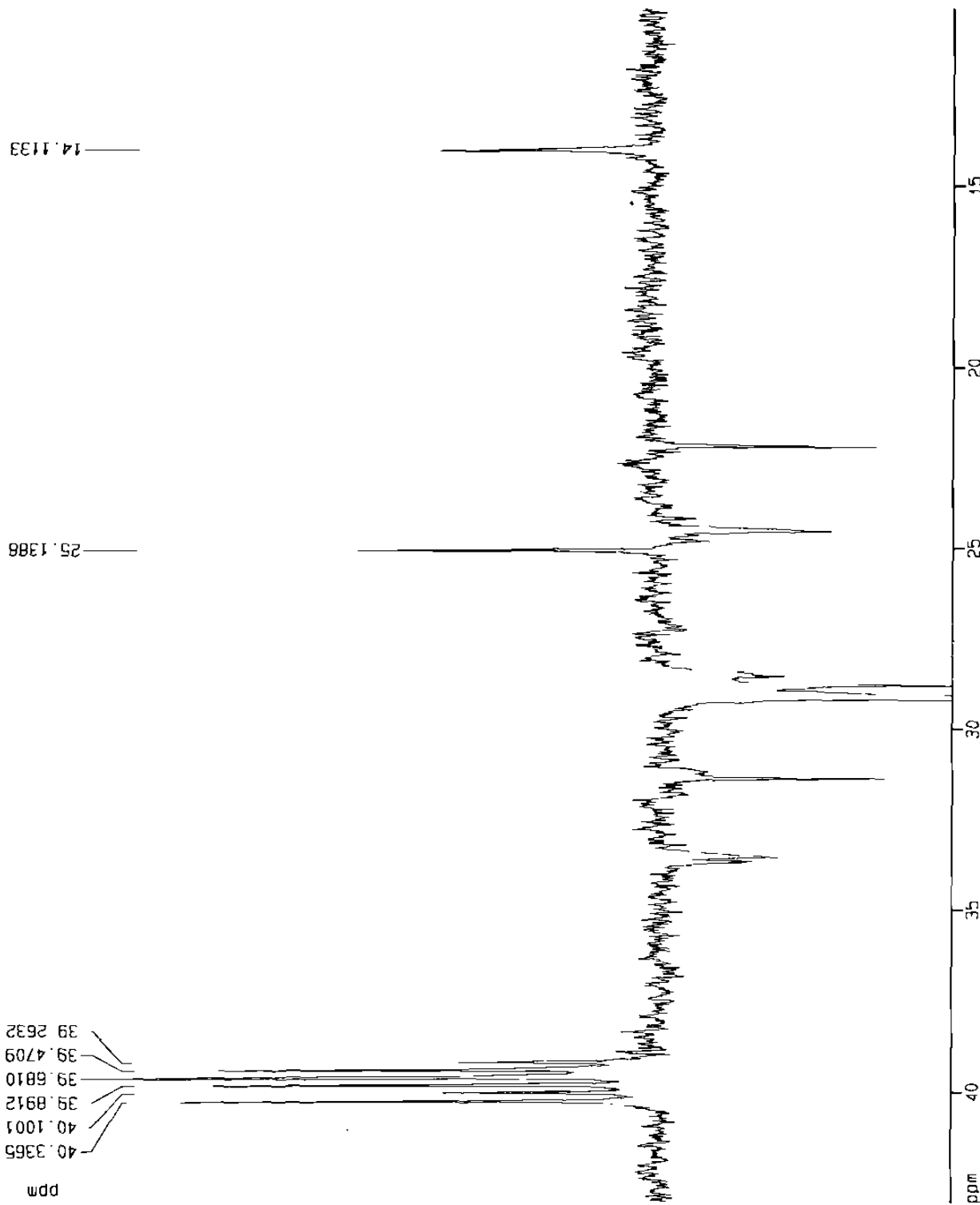
Extracto A

Current Data Parameters
 VNAME Extracto-A
 EXPNO 4
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 990709
 Time 13 31
 INSTRUM spect
 PROBH0 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg30
 TD 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 12288
 DS 8
 SWH 16025.641 Hz
 FIDRES 0.489064 Hz
 AQ 1.0824116 sec
 RG 8192
 CW 31.200 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.0 K
 P1 10.25 usec
 P2 20.5 usec
 P3 13.00 usec
 P4 26.0 usec
 CNST2 145.000000
 G2 0.0034483 sec
 d12 0.000200 sec
 DELTA 0.000131 sec
 J1 2.0000000 sec
 PL2 -3.00 dB
 SFO2 400.1316005 MHz
 NUC2 1H
 SFO1 100.6207780 MHz
 NUC1 13C
 PL1 -1.00 dB
 PL2 15.00 dB
 DE 8.00 usec
 CPDPRG2 waltz16
 PCPD2 105.00 usec

F2 Processing parameters
 SI 16384
 SF 100.6127994 MHz
 MDW EM
 SSB 0
 B 2.00 Hz
 GB 0
 GC 1.40

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 43.052 ppm
 F1 4331.61 Hz
 F2P 10.095 ppm
 F2 1015.69 Hz
 F3CNM 1.64786 ppm/cm
 F4CNM 1.65780 ppm/cm



5. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos, los extractos metanólicos de *Sargassum fluitans* y de *Enteromorpha prolifera* presentan actividad biológica sobre larvas 3º y 4º estadio del mosquito *Aedes aegypti*. El método de extracción por agitación da mejores resultados que la simple maceración en cuanto a la evaluación de la actividad larvicida pues proporciona mayor cantidad de extracto esto concuerda con los reportes sobre estudios de productos marinos y su actividad biológica como los realizados por Rao en 1979 en los cuales los extractos acuosos de *Sargassum* presentaban poca actividad debido a que tales extractos se obtuvieron por el método de maceración. Se han realizado un gran número de investigaciones utilizando extractos acuosos con actividad tal es el caso de las diatomeas (Gnassia-Barelli 1979) cuyo extracto acuoso presentaba actividad antibiótica, antifúngica e inhibitoria. En el caso de *E. prolifera* no se encontró ningún reporte de extracción por lo que no se tienen antecedentes sobre la actividad de tales extractos.

Las pruebas químicas y la cromatografía en capa fina revelada con el reactivo de Dragendorff realizadas en la fracción activa dieron positivas para: alcaloides cuyos antecedentes demuestran ser larvicidas y reguladores de crecimiento y actividad quimioesterilante en mosquitos, además muestran reducción en la fecundación y fertilidad en las hembras de *Anopheles stephensi* en ese trabajo Saxena (1993) utilizó concentraciones de 50 a 200 ppm observando el 58 % de mortalidad larval en la dosis de 50 ppm y el 74 % de mortalidad en la dosis de 200 ppm, también existen reportes de aislamientos de alcaloides de los extractos metanólicos de organismos marinos (Prinsep, 1991) que presentaban actividad antimicrobiana y antifungal.

La fracción más activa con Rf 0.8 dio una coloración perdurable naranja marrón con el reactivo de Dragendorff lo que nos hizo suponer la presencia de

un alcaloide por lo que se realizó una cromatografía preparativa en placa y la mancha con el citado Rf fue raspada y purificada para su estudio espectroscópico, lo cuál nos confirmó la presencia de alcaloides ya que en el IR (Fig. No.4) aparece una banda a 1400 cm^{-1} de estiramiento C-N y un pico ancho característico de flexión de enlace N-H entre $700\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, como lo indica Silverstein (1990).

En el RMN ^1H (Fig. No. 5) encontramos los desplazamientos químicos a 5.22 ppm que corresponden a un enlace protón -nitrógeno y el de los metilos a 0.80 y 1.02 ppm

En el espectro ^{13}C (Fig. No. 6), el pico a 51.00 ppm característico de C-N, este pico aparece en el DEPT (Fig. No.7) como un metino por lo que se llegó a la conclusión que el nitrógeno está unido a un carbono secundario, en este mismo espectro se encontraron picos a 14.11 ppm y a 25.13 ppm correspondientes a 2 metilos, 23 metilenos en un rango entre 22.97 y 98.26 ppm. Los picos de 102 y 104 ppm no aparecen ya que pertenecen a carbonos cuaternarios.

Estos resultados nos hicieron suponer y concluir que la fracción activa RF 0.8 es un alcaloide con el nitrógeno unido a un carbono secundario con 27 carbonos.

Los resultados del bioensayo realizado para *E. prolifera* indican que la heterogeneidad de la población fue relativamente alta y en el de *S. fluitans* la población es homogénea y haciendo una comparación de ambas especies de acuerdo a la LC_{50} no existe mucha diferencia lo que indica que ambas especies tienen funciones muy idénticas para el control del mosquito mas sin embargo *E. prolifera* requiere menos dosis y presenta mayor mortalidad que la de *S. fluitans*.

Los extractos de plantas se han utilizado para evitar el establecimiento y desarrollo de plagas que limitan la producción de los cultivos, como práctica para reducir el daño de sus parásitos ó para aumento de la resistencia a enfermedades de plantas; ante la problemática ambiental actual y con la finalidad de encontrar alternativas de solución, las algas pueden utilizarse como un medio de control idóneo en diversas áreas que presentan complicaciones en el equilibrio ecológico.

6. CONCLUSIONES

- ❖ Los extractos metanólicos obtenidos por el método de agitación fueron los responsables de la actividad efectiva sobre las larvas de *Aedes aegypti*.
- ❖ En las dosis LC 90-50 de *Enteromorpha prolifera* resultaron ser más efectivas que las dosis de *S. fluitans* ya que se requiere menor cantidad de extracto para matar a la población.
- ❖ El extracto metanólico de *E. prolifera* dió positivo para las pruebas de cumarinas, sesquiterpenlactonas y de alcaloides cuyos antecedentes demuestran que son los responsables de la actividad larvicida.
- ❖ La fracción activa separada por cromatografía dio positiva para alcaloides lo que se confirmó con los espectros de IR y RMN

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abdel- Monem, M.M. , Ohnok. 1975. Separation of the Dns derivatives Polyamines and related compound by thin lasyer and high pressure liquid chromatography, J. Chromat. Pp.337-340.
2. Abraham, R.K.F. 1985. Chrosubchronic effects of various forms of carragenan in rats. Ecot Envir. Saf. 10: pp. 173-183
3. Agrios, George N. 1991. Fitopatología. Limusa, México.pp. 35-86
4. Aldana,L., A.M.Menchaca, M.E. Valdés. 1993. Evaluación de plantas como fuente de principios activos sobre larvas del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Entomología, Cholula,Puebla.México. pp. 201.
5. Attaway, D.H. and O. Zaborosky.1993 Marine Biotechnology. Vol.I. N.Y. pp.5-24
6. Baba, M.R. ,Pauwels, J.Balzarini, J.Arnut. 1988. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin replication of human inmunodeficiency virus in vitro. Pro Natl Sci. USA. 85: 6132-6136
7. Bauer, D.H. 1985. A history of discovery and clinical aplications antiviral drougs. Br Med. Bull. 41. pp. 309-314
8. Bentley, Michael D.1995. An insect antifeedant Limonoid from *Turraea nilotica*. Journal of Natural Products. Vol. 58. No. 5, pp.748-750.

9. Calvin, N.I., & R.J. Ellis. 1979. Water soluble extract of red algae and precesses for the thereof. U.S. Patents 4, 162, 308, 309.
10. Carpenter, S.J. and W.J. La Casse . 1974. Mosquitoes of North America (North of México). University of California Press , Berkeley. pp. 360.
11. Clements, A.N. 1992. The biology of mosquitoes. Vol. I. Development, Nutrition and Reproduction. Chapman & Hall, London. pp. 308.
12. Davyt. Danilo. 1988. A new indole derivative from the red alga *Chondria atropurpurea*. Isolation, structure determination and Anthelmintic activity. J.Nat Prod. 61. U.S.A. pp. 1560-1563
13. Dhillon, M.S. and M.S. Mulla. 1982. Biological Activity of the green algae *Chlorella ellipsoidea* in mature stage of mosquitoes. Mosq. News.14, pp.368-372.
14. Domínguez, Xorge.1978. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. p.273.
15. Durst, T.1997. Antimalarial Activity of Tropical Meliaceae Extracts and gedunin Derivatives. Journal of Natural Products. Vol. 60. pp. 336-341
16. Faulkner. D.J. 1991. Marine natural products. Journal Natural Products Reports Vol. 57 No.4: 1131-1137.
17. Fouler. 1982. Marine Algae carbohidrates. Journal Natural Products Reports. Vol. 48 No. 3: 995-998.
18. García de Martínez, N. 1995. Antibiotic, antifungal and antifouling substances obtained by solvent extraction of *Sargassum natans*. American

Chemical Society. E.U. pp. 334-337

19. Gnassia- Barelli, P.1979. Antifungal properties of some marine planktonic algae in: *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter. Vol.2,pp. 461-471.
20. González , M. E. , B. Alarcón y L. Carrasco. 1987. Polysaccharides agents: antiviral activity of carragenan. *Antimicrobial agents*. 31:1388-1393.
21. Graham, M.A. and J.Schodey.1984. Toxicity of *Myriophyllum* and *Potamogeton* to mosquito larvae. *Proc. pap.Calif. Mosq. Vector Control Assoc.*53. pp.113-116
22. Hasegowa, S.1995. *Foods Phytochemicals of Cancer Prevention*. Y. Fruits and Vegetables. ACS.Symposium Series 546. American Chemical Society. Washington, D.C. pp. 198.
23. Hope, H.A. 1979. *Marine Algae and their Products and Constituents in Pharmacy*. Walter de Gruyter. N.Y pp 1-120
24. Hope,H.A. 1982*Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Vol.I,II. N.Y. pp.139-321.
25. Homg Sheu, Jyh. 1999. New Cytotoxic Oxigenated Fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. *J.Nat. Prod.* 62. 1999. A. Ch. S. U.S.A. pp. 224-227
26. Jayaprakasa, G.K. 1997. Limonoides from *Citricus reticulata* and their moult inhibiting activity in mosquito *Culex quinquefasciatus* larvae *Phytochemistry*. Vol.44. No.5.,pp. 843-846.

27. MacKinnon, S. 1996. Antimalarial Activity of Tropical *Meliaceae* Extracts and Gedunin Derivatives. *Journal of Natural Products*. Vol. 60.,pp. 336-341.
28. Marcard, M., C.P.W.Zebitz and H. Schumultterer. 1986.The effect of crude methanolic extract of *Ajuga spp.* on post embryonic development off different mosquit species. *J.Appl. Entomol.* 101,pp. 146-154.
29. Minijas, J.N. and R.K. Sarda.1986 Laboratory observations on the toxicity of *Swartzia madagascariensis* (Leguminosae) extract to mosquit larvae. *Trass.S.Soc.Trop.Med.* H.80,pp. 460-461.
30. Montesano Castellanos, R., Ruiz Matus . 1995. Vigilancia epidemiológica del Dengue en México. *Salud Pública. México.*37 Supl: 67-76
31. Munro et al. 1978. Marine natural products. Academic Pres Inc. pp.679
32. Naquí, S.W.A. et al. 1981. Sreening of some marine plants from the Indian Coast for Biological Activity. *Botanica Marina.* XXII. pp.51-55
33. Nehusul, M. 1988. Methods for the tratment of AIDS virus and other retrovirus. U.S.Patent 4:783,446.
34. Nonomura, A.L. 1985. Composition of matter from *Cryptosiphonia wodii* usefual for the treatment of *Herpes simples* virus. United patemt 4. 522,814.
35. Okai, Y. 1997. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin A derived from edible green alga *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori). *International Journal of Inmunopharmacology*, v. 19. n. 6.pp. 355-358.
36. Oranday Cárdenas, A. 2000. Componentes químicos de algas marinas del Estado de Tamaulipas y su aplicación Farmacológica. F.C.B. de la

- U.A.N.L., México. p.123.
37. Osmani, Z. and S. Sighamony. 1980 Effects of certain essential oils on mortality and metamorphosis of *Aedes aegypti*. *Pesticides*. 14, pp. 15-16.
 38. Perrucci, Stefania. 1995. Structure/Activity relationship of some Natural Monoterpenes as Acaricides against *Psoroptes cuniculli*. *Journal of Natural Product*. Vol. 58. No.8, pp. 1261-1264.
 39. Prinsep, M. 1991. New cytotoxic B-carboline alkaloids from the marine bryozoan, *Cribrillecina cribraria*. *Journal of Natural Products*. Vol.54, No. 4. pp. 1068-1076.
 40. Rao, S. and Y.A. Shelat. 1979. Antifungal Activity of different fractions of extracts from Indian Sweeds in : *Marine Algae Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter. Vol. 2, pp. 461-471.
 41. Rice, L.E. 1984. *Allelopathy*. Academic Press. N.Y. PP. 189-205.
 42. Riley, J.P. y R. Chester. 1989. *Introducción a la Química Marina*. AGT. Editor, S.A. pp. 22-44.
 43. Rodríguez Tovar, M.L. 2000. Demografía de la Metapoblación y estructura horizontal de *A. Aegypti* (L) en el área metropolitana de Monterrey. F.C.B. de la U.A.N.L. México. p.126
 44. Runeckless, V.C. 1975. *Recent advances in Phytochemistry*. Vol. 9. N.Y. pp. 127-205
 45. Saxena, B.P. y K. Tikku. 1990. Impact of Natural Products of the Physiology of Phytophagous insects *proc. Indian Acad. sci.* 99. pp. 185-198.

46. Saxena, R.C., V. Harshan, A. Saxena. 1993. Larvicidal and chemoesterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. Journal of the American mosquito Control Association. India. Vol.9 No. 1,pp.84-86.
47. Scheuer, Paul J. 1978. Marine Natural Products Chemical and Biological Perspectives I, II, III. Academic Press Inc. N.Y. pp.91, 218, 270.
48. Scheuer, Paul J. 1995. Marine Natural Products research: A look into the div Bag. Journal of Natural Products. Vol.58. No.3,pp. 335-343.
49. Stenhaus, E. A.1970. Insect Pathology. Academic Press Inc. Vol.I. N.Y. pp.96-123.
50. Schmitz et al. 1978. Antitumoral and citotoxic compounds marine natural products. Academic Press Inc. pp. 220-289.
51. Thomson, A.W. & E. Flower. 1981. Carrageenan: a review of its effects on the immune system; Agents actions 11. U.S.A. pp. 265-273.
52. Wright, Anthony D. 1996. Antimalarial Activity: The Search of Marine-Derived Natural Products with Selective Antimalarial Activity. Journal of Natural Products. Vol.59,pp. 710-716.
53. Zar, J.H. 1979. Biostatistical and Analysis. Prentice Hall.pp.720.



DONATIVO

