



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**TERPENOS AISLADOS DE MACROALGAS
CON ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA**
Aedes aegypti

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS**

PRESENTA

ANA LAURA GONZÁLEZ CASTRO

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DEL 2020



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de **La Paz, B.C.S.,** siendo las **12:00** horas del día **05** del mes de **Junio** del **2020** se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS** para examinar la tesis titulada:

“Terpenos aislados de macroalgas con actividad insecticida contra *Aedes aegypti* del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	GONZÁLEZ	Apellido Materno:	CASTRO	Nombre (s):	ANA LAURA
-------------------	----------	-------------------	--------	-------------	-----------

Número de registro: **B 1 6 0 9 9 7**

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene _____ % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** ☐ **NO** ☒ **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*
EL INFORME DEL SOFTWARE (ANTI-PLAGIO) TURNITIN ARROJO UN UNA SIMILITUD DE 9% Y EN SU MAYORIA LA COMPARATIVA DE SIMILITUD CON FRASES U ORACONES EN EL TEXTO ES MENOR O IGUAL AL 1%.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** ☒ **SUSPENDER** ☐ **NO APROBAR** ☐ la tesis por **UNANIMIDAD** ☒ o **MAYORÍA** ☐ en virtud de los motivos siguientes:

“SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES”

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

Director de Tesis
Nombre completo y firma

DR. JOSÉ LUIS TORRES ESTRADA

Nombre completo y firma

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

Nombre completo y firma

DR. JUAN MANUEL LÓPEZ VIVAS

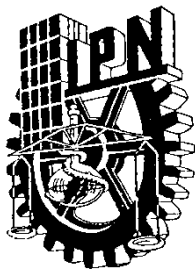
Nombre completo y firma

**DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND
SCHMIDT**

Nombre completo y firma

**DR. SERGIO HERNÁNDEZ
TRUJILLO**

Nombre completo y firma
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **La Paz, B.C.S.**, el día **10** del mes de **Junio** del año **2020**, el (la) que suscribe **ANA LAURA GONZÁLEZ CASTRO** alumno del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS** con número de registro **B160997**, adscrito al **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de: **DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA** y cede los derechos del trabajo titulado **“TERPENOS AISLADOS DE MACROALGAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA AEDES AEGYPTI”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: **bmgonzalezcastro@gmail.com – mmunozo@ipn.mx**

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ana Laura Gonzalez C.

ANA LAURA GONZALEZ CASTRO

nombre y firma

“...And there will be the most beautiful silence never heard
Born out of that.
The sun still hidden there
Awaiting the next chapter”

C. Bukowski

Dosis sola facit venenum

Teofrasto

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento de los proyectos: SIP 20170728, 20195600, a su programa de becas BEIFI, y a la beca 380732/300046 otorgada por el Conacyt.

Quiero agradecer a mi director, el Dr. Mauricio Muñoz por su colaboración y la libertad creativa durante el desarrollo del proyecto de investigación. Al Dr. Gustavo Hernández Carmona por sus preguntas y sugerencias en el manuscrito. A la Dra. Christine Band por su participación, constancia y observaciones durante las revisiones semestrales. Al Dr. Juan Manuel López Vivas por la recolecta e identificación de las macroalgas y su coordinación en todas las ponencias realizadas en la UABCS. Al Dr. José Luis Torres Estrada por su colaboración activa en el proyecto, por facilitarme todo el material necesario durante la estancia de investigación y ayudarme en la evaluación de los extractos.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Ecología Química de Insectos Vectores del CRISP, Tapachula; Ale, Keila, Sandra, Chencho, Isaac y Julio. Al laboratorio de Química de algas del CICIMAR-IPN, a Liz y Dora por la paciencia y buena disposición. A Araceli por su ayuda en las pruebas enzimáticas. A mis amigos y compañeros de laboratorio; Esmeralda, Dania, Miguel, Gaby y Pepe por las comidas y artículos compartidos.

Agradezco infinitamente a mis padres, por su apoyo (directo e indirecto) en todos los aspectos de mi vida. A mi hermana, Ramiro y Gema por su temple y perseverancia. A mis amigos Ilse y Tai por crear nuevos recuerdos. A Xóchitl por su energía en días soleados y apoyo sin condiciones.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
GLOSARIO.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	8
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	25
6. MATERIAL Y METODOS	
6.1 Recolección del material algal.....	26
6.2 Extracción de la fracción terpénica a partir del material algal.....	28
6.3 Aislamiento y purificación de mediante fraccionamientos cromatográficos	
6.3.1 Aislamiento de terpenos de <i>Sargassum horridum</i>	30
6.3.2 Aislamiento de terpenos de <i>Acanthophora spicifera</i>	31
6.3.3 Aislamiento de terpenos de <i>Laurencia johnstonii</i>	33
6.4 Evaluación de la actividad insecticida contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	36
6.5 Evaluación del mecanismo de acción: Inhibición de enzimas objetivo	
6.5.1 Protocolo de inhibición de la acetilcolinesterasa.....	37
6.5.2 Protocolo de inhibición de la tirosinasa.....	39
6.5.3 Protocolo de inhibición de la convertidora de angiotensina...	40
6.6 Identificación de la estructura química de los terpenos activos..	41
6.7 Análisis estadísticos.....	42
7 RESULTADOS	
7.1 Extracción de la fracción terpénica de macroalgas.....	43
7.2 Aislamiento y purificación de terpenos.....	43
7.3 Evaluación del mecanismo de acción por inhibición enzimática actividad insecticida: Susceptibilidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	44
7.4 Evaluación del mecanismo de acción por inhibición enzimática	
7.4.1 Inhibición enzimática: Acetilcolinesterasa	46
7.4.2 Inhibición enzimática: Tirosinasa.....	48
7.4.3 Inhibición enzimática: Angiotensina.....	50
7.5 Identificación de la estructura química de los terpenos aislados de <i>Laurencia johnstonii</i>	
7.5.1 Cromatografía de gases acoplado a masas.....	51
7.5.2 Identificación del laurinterol y su actividad biológica.....	55
8. DISCUSIÓN	57
9. CONCLUSIONES	64
10. RECOMENDACIONES	65
11. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Principales enfermedades transmitidas por artrópodos (ND, no determinado, WHO, 1998). Datos para la región de las Américas (m = millones), *PLISA, 2019).	1
Tabla II.	Trabajos recientes de actividad insecticida con extractos crudos de algas marinas (DL ₅₀ , dosis letal al 50% calculada a las 24 horas de exposición. ND, no determinado. Modificado de Yu <i>et al.</i> , 2014).	8
Tabla III.	Compuestos de algas marinas con actividad insecticida. ND, no determinado. DL ₅₀ , dosis letal al 50% calculada a las 24 horas de exposición.	13
Tabla IV.	Clasificación de los mecanismos de acción de insecticidas establecidos por comité de acción de resistencia a insecticidas.	16
Tabla V.	Clasificación de IRAC de plaguicidas con mecanismo inhibitorio de enzimas.	19
Tabla VI.	Compuestos de algas marinas con actividad inhibitoria de enzimas. CI ₅₀ , Concentración inhibitoria media (AChE: Acetilcolinesterasa, Tyr: Tirosinasa, ECA: Enzima convertidora de angiotensina).	23
Tabla VII	Fracciones terpénicas obtenidas a partir de extractos orgánicos de las macroalgas <i>Sargassum horridum</i> , <i>Acanthophora spicifera</i> y <i>Laurencia johnstonii</i>	43
Tabla VIII.	Fracciones obtenidas de las macroalgas <i>Sargassum horridum</i> , <i>Acanthophora spicifera</i> y <i>Laurencia johnstonii</i> mediante técnicas de aislamiento cromatográfico.	44
Tabla IX.	Mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> con fracciones de las macroalgas <i>Sargassum horridum</i> , <i>Acanthophora spicifera</i> y <i>Laurencia johnstonii</i>	45
Tabla X.	Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa con fracciones de extractos de las macroalgas <i>Sargassum horridum</i> , <i>Acanthophora spicifera</i> y <i>Laurencia johnstonii</i>	47
Tabla XI.	Inhibición de la enzima tirosinasa con fracciones de extractos de las macroalgas <i>Sargassum horridum</i> , <i>Acanthophora spicifera</i> y <i>Laurencia johnstonii</i>	49
Tabla XII.	Inhibición de la enzima angiotensina con la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de <i>Laurencia johnstonii</i> . Porcentaje de inhibición calculado con stock de 2 mg mL ⁻¹	50
Tabla XIII.	Análisis de GC/MS de fracciones cromatográficas de <i>Laurencia johnstonii</i> . ND; no determinado. (RT, tiempo de retención, MM, masa molecular, - compuesto no identificado.	53
Tabla XIV.	Actividad biológica del laurinterol aislado de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de la macroalga <i>L. johnstonii</i>	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Nereistoxina y derivados con actividad insecticida de origen marino.....	3
Figura 2. Línea del tiempo para el desarrollo de farmacéuticos y agroquímicos (Modificado de McChesney, 2000).....	5
Figura 3. Compuestos con actividad insecticida del género <i>Laurencia</i>	11
Figura 4. Monoterpenos con actividad insecticida del género <i>Plocamium</i>	12
Figura 5. Proceso de inhibición de la acetilcolinesterasa causada por insecticidas (carbamatos y organofosforados). Modificado de Vargas-Bernal, et al., 2012.....	18
Figura 6. Sesquiterpenos con actividad larvica aislados de <i>Laurencia dendroidea</i> (Salvador-Neto et al., 2016).....	21
Figura 7. Área de recolecta de las especies de macroalgas.....	27
Figura 8. Esquema de fraccionamiento en columna cromatográfica del extracto hexánico de <i>Sargassum horridum</i>	30
Figura 9. Esquema de fraccionamiento en columna cromatográfica del extracto hexánico de <i>Acanthophora spicifera</i>	31
Figura 10. Esquema de extracción sólido-líquido del extracto etanólico de <i>Acanthophora spicifera</i>	32
Figura 11. Esquema de extracción del extracto hexánico de <i>Laurencia johnstonii</i>	33
Figura 12. Esquema de extracción del extracto etanólico de <i>Laurencia johnstonii</i>	35
Figura 13. Cromatograma de gases de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de <i>Laurencia johnstonii</i>	52
Figura 14. Sesquiterpeno laurinterol aislado de <i>Laurencia johnstonii</i>	55

GLOSARIO

Agroquímico	Compuesto químico con aplicación en la agricultura. Incluye: Insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, fertilizantes y bioestimulantes.
Biorracional	Sustancia o producto de origen natural que posee baja o nula toxicidad, mecanismo de acción único y alta selectividad.
Deterrente	Disuasión de la alimentación.
Helicasa	Enzima que utiliza la energía de la hidrólisis de un nucleósido trifosfato para romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las hebras del ADN de doble cadena, proporcionando DNAsc como molde para las polimerasas, siendo así esenciales para el progreso de la horquilla de replicación.
Insecticida	Agente de origen químico o biológico que ayuda a controlar o erradicar insectos.
Larvicida	Insecticida con actividad sobre larvas de insectos. Detiene el desarrollo y evita la muda a fase de pupa.
Metabolito	Compuestos orgánicos esenciales que participan en reacciones químicas a nivel celular.
Metabolito secundario	Compuestos derivados de metabolitos primarios no esenciales en el desarrollo, que otorgan ventajas adaptativas.
Plaguicida	Sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar una plaga. Incluyen vectores de enfermedades, especies de plantas y animales no deseadas que causan daño en la producción, elaboración, almacenamiento y comercialización de alimentos, productos agrícolas y maderables.
Producto natural	Compuesto químico producido por un organismo vivo.
Terpeno	Compuestos aromáticos derivados del isopreno.

ABREVIATURAS

AchE	acetilcolinesterasa
CH ₂ -Cl ₂	diclorometano o cloruro de metileno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL ₅₀	dosis letal media
ECA	enzima convertidora de angiotensina
ESL	extracción sólido líquido
EtOH	etanol
GC/MS	cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas
Hex	hexano
HHL	Hipuril-L-Histidil-L-Leucina
IC ₅₀	concentración inhibitoria media
MeOH	metanol
RMN	Resonancia magnética nuclear
Try	tirosinasa

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus del dengue, chikungunya y Zika. Actualmente, no existen vacunas disponibles o tratamientos para estas enfermedades, por lo cual se buscan alternativas para controlar al vector mediante el desarrollo de nuevos insecticidas. Los terpenos son un grupo de compuestos orgánicos sintetizados por plantas y algas marinas, que son empleados para el control de plagas debido a su actividad insecticida; actúan como repelentes. Por lo tanto, el objetivo del trabajo fue aislar e identificar terpenos de macroalgas activos contra *Aedes aegypti*. Adicionalmente, se consideró el mecanismo de acción enzimático como una herramienta de bioprospección para identificar compuestos insecticidas. Para ello, se obtuvieron extractos hexánicos y etanólicos de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* y *Laurencia johnstonii*, los cuales fueron fraccionados y evaluados en bioensayos de actividad insecticida con larvas del III estadio de *Ae. aegypti* cepa Nueva Orleans. Las fracciones de *L. lajolla* presentaron mayor actividad insecticida, donde la mayor correspondió a la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 ($DL_{50}=240\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). En *A. spicifera*, se identificó mayor actividad en la fracción 16-02-10 CC1 F3 ($DL_{50}=770\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) y en *S. horridum* solo se identificó actividad en la fracción 16-01-40 CC1 F5 ($DL_{50}=1360\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Respecto a los ensayos *in vitro* de inhibición enzimática, la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *L. lajolla* presentó la mayor actividad inhibitoria contra la acetilcolinesterasa ($IC_{50}=201.7\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), tirosinasa ($IC_{50}=960.9\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) y angiotensina ($IC_{50}=890.8\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Posteriormente, se aislaron los compuestos activos de la fracción en columna cromatográfica y mediante un análisis de GC/MS se identificó la presencia de tres sesquiterpenos halogenados; laurinterol (86.3%), debromolaurinterol (9.0%) e isolaurinterol (4.7%). Se purificó el laurinterol y se confirmó su estructura química mediante análisis de RMN. Asimismo, se identificó la presencia de otros sesquiterpenos característicos del género *Laurencia*. Finalmente, se realizó una ficha de actividad biológica del laurinterol y se consideró su posible efecto multi-inhibitorio de enzimas como mecanismo de acción insecticida. Se realizó una base de datos de todas las fracciones evaluadas, y se concluyó que dada la diversidad química y actividad biológica identificada en esta especie, *Laurencia johnstonii* representa una fuente de compuestos con actividad insecticida.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* is the main vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. Currently, there are no vaccines available or treatments for these diseases, so alternatives are being sought to control the vector through the development of new insecticides. Terpenes are a group of organic compounds synthesized by plants and marine algae, they are used for pest control due to their insecticidal activity; they act as repellents. Therefore, the objective of the work was to isolate and identify terpenes from macroalgae active against *Aedes aegypti*. Additionally, the enzymatic mechanism of action was considered as a bioprospecting tool to identify insecticidal compounds. Hence, hexane and ethanolic extracts of the seaweeds *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* and *Laurencia johnstonii* were obtained, fractionated, and evaluated on insecticidal activity assays with larvae of the III stage of *A. aegypti* strain New Orleans. The *L. lajolla* fractions showed higher insecticidal activity, where the highest corresponded to the 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 (LD_{50} = 240 μ g/mL-1) fraction. In *A. spicifera*, higher activity was identified on fraction 16-02-10 CC1 F3 (LD_{50} = 770 μ g/mL-1), and in *S. horridum* activity was only identified on fraction 16-01-40 CC1 F5 (LD_{50} = 1360 μ g/mL-1). Regarding *in vitro* enzymatic inhibition assays, *L. lajolla* fraction 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 showed greater inhibitory activity against acetylcholinesterase (IC_{50} = 201.7 μ g/mL-1), tyrosinase (IC_{50} = 960.9 μ g/mL-1), and angiotensin (IC_{50} =890.8 μ g/mL-1). Subsequently, the active compounds of the fraction were isolated on a chromatographic column and the presence of three halogenated sesquiterpenes was identified by GC/MS analysis; laurinterol (86.3%), debromolaurinterol (9%) and isolaurinterol (4.7%). Laurinterol was purified and its chemical structure was confirmed by NMR analysis. Likewise, the presence of other sesquiterpenes characteristic of the genus *Laurencia* was identified. Finally, a biological activity sheet of laurinterol was described and its possible multi-inhibitory effect of enzymes as a mechanism of insecticidal action was considered. A database of all the evaluated fractions was made, and it was concluded that due chemical diversity and biological activity identified on this specie, *Laurencia johnstonii* represent a source of compounds with insecticidal activity.

1. INTRODUCCIÓN

Los problemas de gran impacto en la humanidad implican la producción de alimentos y el control de enfermedades, los cuales están asociados con el aumento de la población humana y el control de plagas de artrópodos. Particularmente, estos últimos son los responsables de pérdidas del 20 al 50% de la producción agrícola y son los principales organismos vectores que transmiten enfermedades al humano (Tabla I) (Thacker, 2002).

Tabla I. Principales enfermedades transmitidas por artrópodos (WHO, 1998). Datos para la región de las Américas (m = millones), *PLISA, 2019). Modificado de Thacker (2002). ND, no determinado.

Enfermedad	Vector	Agente	Casos	Muertes
Malaria	Mosquito	Protozoa (<i>Plasmodium</i>)	300-500 m	1.5 - 2.7 m
Filariasis	Mosquito	Nematodos "filarias"	120 m	ND
Dengue	Mosquito	Virus	50 m	0.5 m
Oncocercosis	Mosca negra	Nematodos "filarias"	18 m	ND
Chagas	Chinche	Protozoa (<i>Trypanosoma</i>)	16-18 m	20 000 - 50 000
Leishmaniasis	Mosca de la arena	Protozoa (<i>Trypanosoma</i>)	12 m	ND
Tripanosomiasis africana	Mosca tsetsé	Protozoa (<i>Trypanosoma</i>)	300 000 – 500 000	ND
Fiebre amarilla	Mosquito	Virus	200 000	30 000
Chikungunya	Mosquito	Virus	169 757*	87*
Zika	Mosquito	Virus	31 921*	4*

Por lo cual, existe un esfuerzo por parte de diversas instituciones del sector salud y agrícola dirigido a su control y erradicación. En las últimas décadas, se ha identificado un aumento indiscriminado en el uso de plaguicidas y más allá de resolver y evitar afectaciones, se han generado problemas globales que incluyen contaminación en el ambiente, acumulación de residuos tóxicos en alimentos, efectos nocivos en insectos benéficos, en la salud humana, organismos no objetivo y la aparición de plagas secundarias (Silva *et al.*, 2002; Devine *et al.*, 2008; Montesino-Valdés *et al.*, 2009; Benítez-Leite, 2012). Respecto a las plagas

secundarias, estas ocurren al utilizar plaguicidas de amplio espectro que también dañan a los depredadores naturales y desencadena brotes posteriores de otras especies de plagas. Tal es el caso del cultivo de algodón, donde la principal plaga son las chinches del género *Lygus*; como medida de control se utilizan insecticidas de amplio espectro, lo que ha provocado brotes secundarios de gusanos del género *Spodoptera*, larvas de lepidópteros e inclusive ácaros del género *Tetranychus* (Gross & Rosenheim, 2011).

Adicionalmente, se ha identificado un incremento significativo de la resistencia a insecticidas. De 1984 a 1990 se registró un aumento del 13% del número de casos documentados (504) de resistencia por especies de insectos y ácaros. Debido a estos problemas asociados, se ha identificado una mayor presión social y legislativa para reemplazar o reducir el uso de plaguicidas sintéticos en el control de plagas (El Sayed *et al.*, 2000).

Por ello, existe una búsqueda constante de compuestos selectivos, con efecto dirigido a los organismos objetivo. Algunos plaguicidas de uso convencional han sido sustituidos por plaguicidas biorracionales que representan un menor riesgo al tener baja toxicidad en organismos no objetivo (humanos y animales) y en el ambiente (Hara, 2000). La gran mayoría de los insecticidas convencionales funcionan a nivel sistema nervioso, enfocándose en un número bastante limitado de sitios blanco (Georghiou, 1983), por lo cual es necesario encontrar insecticidas novedosos con mecanismos de acción que no presenten resistencia cruzada con los insecticidas ya existentes (Horowitz & Ishaaya, 2004).

Agroquímicos de compuestos marinos: insecticidas

En los océanos se encuentra gran diversidad de plantas y animales. La defensa química de estos organismos marinos representa una fuente de quimiotipos que ayudan al descubrimiento de compuestos líder con aplicaciones farmacéuticas y

agroquímicas (El Sayed *et al.*, 2000) (Figura 1). Sin embargo, en comparación con las investigaciones realizadas en el área farmacéutica, se ha dedicado un menor esfuerzo en la exploración de nuevas fuentes de compuestos agroquímicos (Fenical, 1997) y consecuentemente, la búsqueda de productos naturales marinos enfocada al desarrollo de agroquímicos se encuentra rezagada (Crombie, 1990). Posiblemente, la nereistoxina aislada del anélido marino (*Lumbriconereis heteropoda*) y sus análogos bensultap, cartap y thiocyclam (Figura 1) sean los únicos agentes agroquímicos marinos que se usan como insecticidas en algunas partes del mundo (Llewellyn & Burnell, 2000).

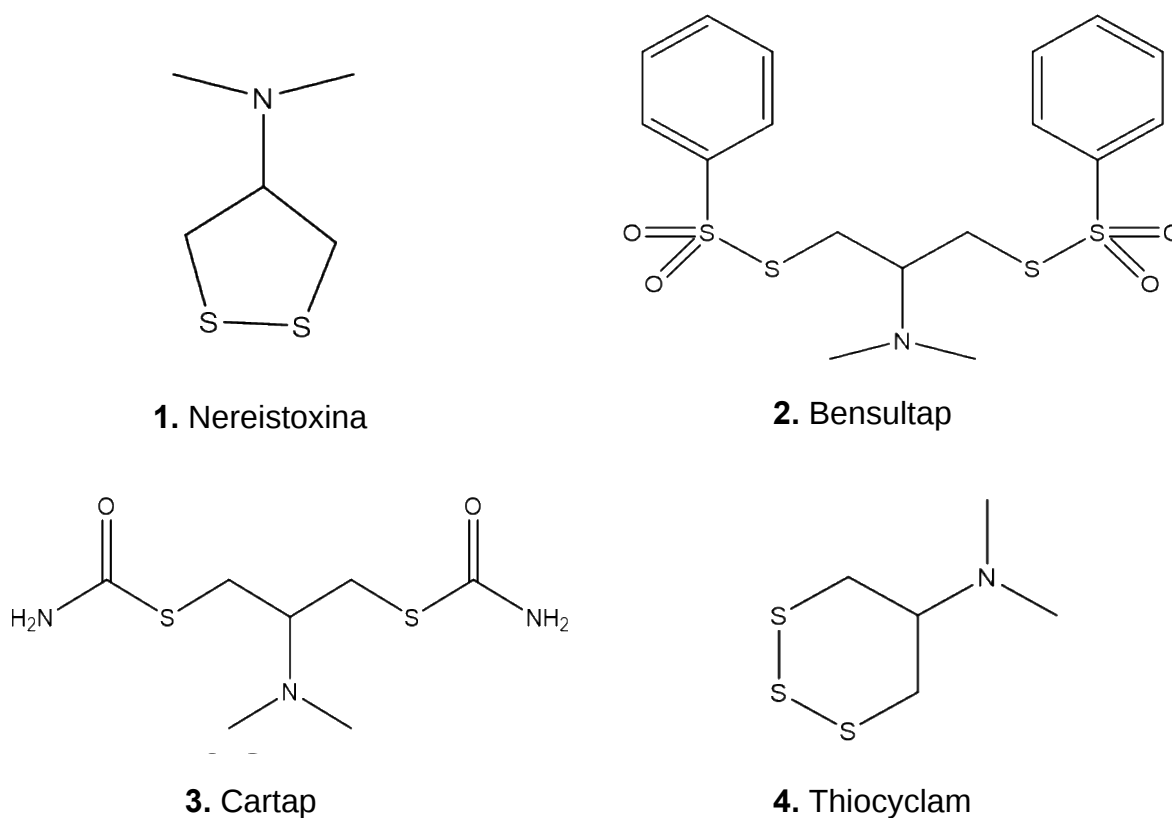


Figura 1. Nereistoxina y derivados con actividad insecticida de origen marino. (Realizado con ChemDraw, 2019).

Las investigaciones realizadas para el aislamiento de insecticidas prototipo de origen marino han obtenido alrededor de 40 compuestos activos correspondientes a diversas clases de estructuras químicas: monoterpenos polihalogenados, metabolitos C15 polihalogenados, diterpenos, péptidos y aminoácidos, ésteres fosfóricos, derivados de compuestos azufrados y macrólidos (El Sayed *et al.*, 2000).

En la literatura de productos naturales marinos existen varios ejemplos acerca de la defensa química contra la herbívora y depredación. Asimismo, se han identificado patrones similares en las relaciones planta-insecto. Entonces, ¿Un compuesto con actividad inhibitoria o anti-alimentaria contra invertebrados marinos podría tener el mismo efecto (o similar) en invertebrados terrestres?, para responder a este cuestionamiento se han realizado diversas investigaciones con extractos de algas marinas con la finalidad de evaluar su efecto en bioensayos con insectos (Cardellina, 1986). El objetivo principal de estos trabajos fue identificar nuevas fuentes de compuestos bioactivos, lo cual se logra a partir de un proceso extenuante de extracción, aislamiento, purificación, pruebas de actividad biológica, identificación química, desarrollo y comercialización (Figura 2). Estos procesos requieren de varios años/décadas para su ejecución y una inversión de cientos de millones de dólares para nuevos farmacéuticos y decenas de millones de dólares para agroquímicos (Petroski & Stanley, 2009; McChesney, 2000). Sin embargo, aún falta mucha información respecto a la identificación y elucidación estructural de los compuestos marinos con actividad insecticida.

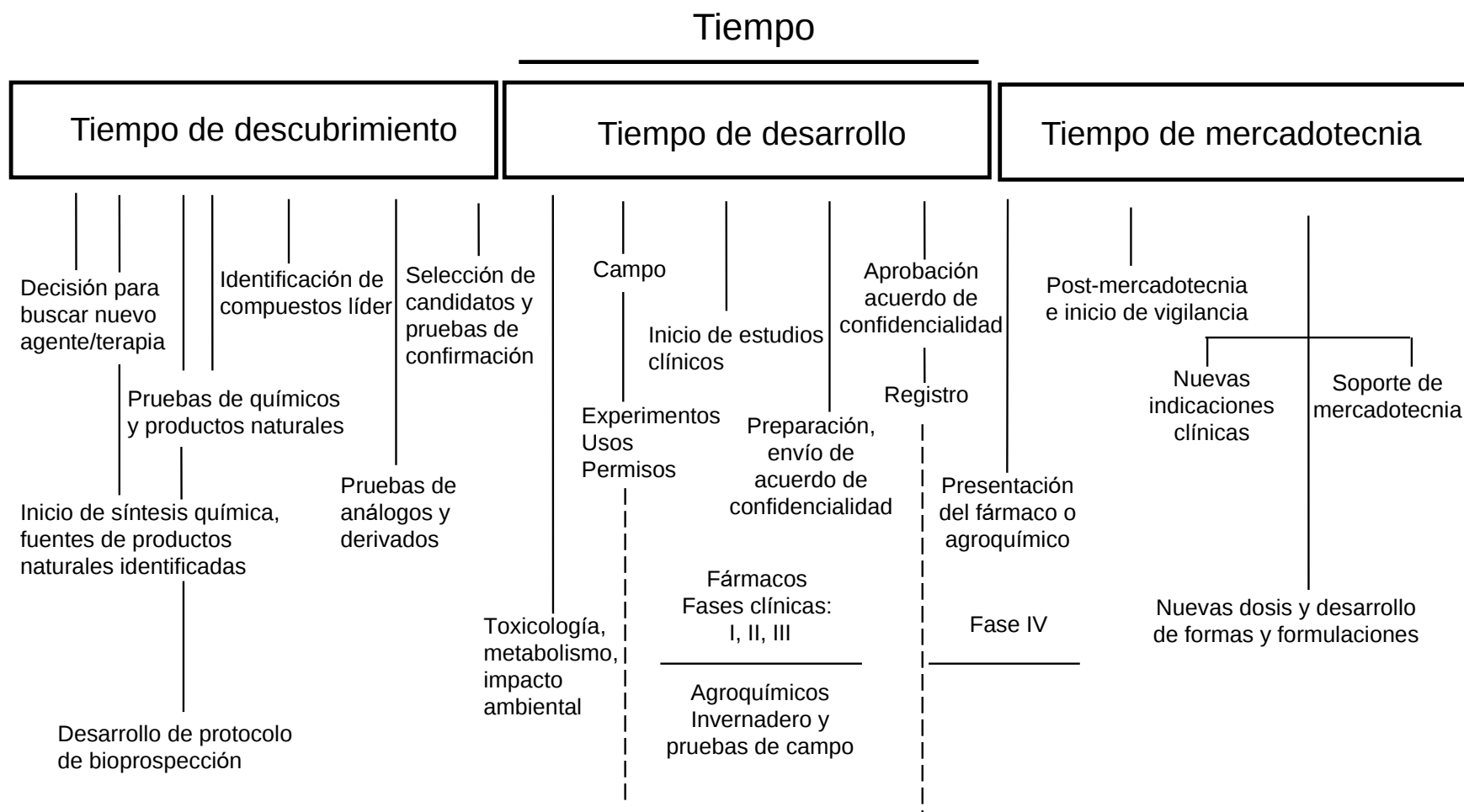


Figura 2. Línea del tiempo para el desarrollo de farmacéuticos y agroquímicos (Modificado de McChesney, 2000).

En diversos estudios con algas marinas, se ha identificado el potencial insecticida contra diversas plagas de insectos, específicamente, mosquitos vectores de enfermedades humanas (Yu *et al.*, 2014), donde la especie *Aedes aegypti* ha sido el principal objetivo, *Ae. aegypti* es considerado un vector biológico de gran importancia médica, debido a su capacidad de transmitir distintos arbovirus que afectan al humano como; dengue, chikungunya, zika, fiebre amarilla, Nilo Occidental y mayaro (Gómez-García, 2018). Por ello, las investigaciones se han centrado en controlar el vector y evitar la transmisión de las enfermedades. Actualmente, existen distintos enfoques, donde el uso de productos naturales de algas marinas representa una alternativa poco explorada en México.

1. ANTECEDENTES

Diversos extractos de algas marinas han sido evaluados en ensayos con larvas de mosquitos; se han establecido porcentajes de mortalidad y dosis letales (DL₅₀) de cada extracto orgánico (Yu *et al.*, 2014). En estos trabajos se han obtenido resultados prometedores con algunas especies de macroalgas (Tabla II), por ello se enfatiza en la necesidad de continuar con el aislamiento, purificación y evaluación de los compuestos activos.

Esta actividad insecticida ha sido relacionada con la presencia de metabolitos secundarios específicos; alcaloides, saponinas, esteroides y terpenos (Yu *et al.*, 2015), sin embargo, aún falta mucha información respecto a la identificación y elucidación estructural los compuestos responsables.

Tabla II. Trabajos recientes de actividad insecticida con extractos crudos de algas marinas (DL₅₀, dosis letal al 50% calculada a las 24 horas de exposición. ND, no determinado. Modificado de Yu *et al.*, 2014).

Macroalga	Extractos	Insecto objetivo	DL ₅₀ (µg·mL ⁻¹) por estadio larval	Referencias
<i>Acrosiphonia orientalis</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 86.13 Estadio III: 125.43	Manilal <i>et al.</i> , 2011a
	Metanol	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio II: 94.42 Estadio III: 131.82	
<i>Caulerpa racemosa</i>	3:1 Etanol-agua	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 0.055	Ali <i>et al.</i> , 2013
		<i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles stephensi</i>	Estadio IV: 0.056 Estadio IV: 0.066	
<i>Caulerpa scalpelliformis</i>	Acetona	<i>Culex pipiens</i>	Estadio II: 338.91	Cetin <i>et al.</i> , 2010
	3:1 Etanol-agua	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 0.070	Ali <i>et al.</i> , 2013
		<i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles stephensi</i>	Estadio IV: 0.067 Estadio IV: 0.066	
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	3:1 Etanol-agua	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 0.0744	Beula <i>et al.</i> , 2011
<i>Prasiola crispa</i>	Metanol	<i>Drosophila melanogaster</i>	ND	Posser <i>et al.</i> , 2014

<i>Ulva lactuca</i>	3:1 Etanol-agua	<i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles stephensi</i>	Estadio IV: 0.082 Estadio IV: 0.082 Estadio IV: 0.091	Ali <i>et al.</i> , 2013
	Metanol	<i>Dysdercus cingulatus</i>	Estadio III: 399.27 (96 hrs)	
<i>Ulva fasciata</i>	Metanol	<i>Culex quinquefasciatus</i>	515.88	Poonguzhali & Nisha, 2012
	Acetona		504.47	
	Etanol		478.66	
	Metanol	<i>Dysdercus cingulatus</i>	Estadio III: 313.59 (96 hrs)	Asha <i>et al.</i> , 2012
<i>Dictyota dichotoma</i>	3:1 Etanol-agua	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 0.083	Beula <i>et al.</i> , 2011
<i>Dictyota linearis</i>	Etanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 60,000	Bantoto & Dy, 2013
<i>Padina minor</i>	Etanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 5,.800	Bantoto & Dy, 2013
<i>Padina tetrastrumatica</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 97.41	Manilal <i>et al.</i> , 2011a
		<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio III: 199.34	
			Estadio II: 97.94	
			Estadio III: 226.31	
<i>Padina pavonica</i>	Cloroformo Benceno	<i>Dysdercus cingulatus</i>	Estadio III: 1,387 Estadio III: 330	Sahayaraj & Kalidas, 2011
<i>Sargassum myriocystum</i>	3:1 Etanol-agua	<i>Aedes aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio IV: 0.086 Estadio IV: 0.098	Ali <i>et al.</i> , 2013
<i>Sargassum tenerrimum</i>	Benceno Cloroformo	<i>Dysdercus cingulatus</i>	Estadio III: 574 Estadio III: 667.7	
<i>Sargassum wightii</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 84.82	Manilal <i>et al.</i> , 2011a
		<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio III: 97.28	
			Estadio II: 87.09	
			Estadio III: 107.15	
<i>Spatoglossum asperum</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 81.28	Manilal <i>et al.</i> , 2011a
	Metanol	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio III: 96.13	
			Estadio II: 83.17	
<i>Stoechospermum marginatum</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 82.95	Manilal <i>et al.</i> , 2011a
	Metanol	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio III: 97.83	
			Estadio II: 85.11	
			Estadio III: 98.59	
<i>Centroceras clavulatum</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 91.54	Manilal <i>et al.</i> , 2011a
	Metanol		Estadio III: 158.26 Estadio II: 97.72	

		<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio III: 178.76	
		<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV: 0.087	
<i>Gracilaria corticata</i>	3:1 Etanol-agua	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio IV: 0.091	Ali et al., 2013
		<i>Anopheles stephensi</i>	Estadio IV: 0.091	
<i>Grateloupia lithophila</i>	Metanol	<i>Culex quinquefasciatus</i>	431.9	Poonguzhali & Nisha, 2012
	Acetona		349.74	
	Etanol		425.45	
<i>Laurencia brandenii</i>	Metanol	<i>Sitophilus oryzae</i>	3.7 mg cm ²	
	Metanol	<i>Sarcophaga</i> sp	Estadio II: 43,000	Manilal et al., 2011b
	Metanol	<i>Microtermetes obesi</i>	2,600	
<i>Laurencia dendroidea</i>	2:1 Diclorometano-metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio IV, CL ₁₀₀ =100	Bianco et al., 2013
<i>Laurencia papillosa</i>	Apolar	<i>Culex pipiens</i>	Estadio II: 57.6 Estadio III: 64.5 Estadio IV: 70.1	Albou-Elnaga et al., 2011
<i>Lobophora variegata</i>	Metanol	<i>Aedes aegypti</i>	Estadio II: 70.38 Estadio III: 95.52	Manilal et al., 2011a
	Metanol	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Estadio II: 79.43 Estadio III: 96.52	

Particularmente, las algas rojas del género *Laurencia* son aceptadas por la mayoría, como una de las fuentes más abundantes de nuevos metabolitos secundarios. La plasticidad morfoanatómica de las especies han contribuido a constantes revisiones taxonómicas del género y actualmente, se incluyen en el llamado “complejo *Laurencia*”, junto a los géneros *Chondrophyucus*, *Osmundea*, *Palisada*, *Yuzurua* y *Laurenciella*. La distribución cosmopolita y la variación química determinada por factores ambientales y genéticos, da como resultado una gran variedad de metabolitos únicos con múltiples sitios de halogenación (Harizani et al., 2016).

El proceso de halogenación consiste en la integración de elementos como el Bromo (Br), Cloro (Cl), Iodo (I) y Flúor (F) disponibles del medio marino en la biosíntesis de compuestos orgánicos. La gran mayoría de los metabolitos secundarios de *Laurencia* contienen uno o más átomos de Br, dos átomos de Br y Cl, e inclusive I. A pesar de que el medio marino contiene una mayor concentración de iones de Cl (559 mM) que iones de Br (0.86 mM), son más abundantes los compuestos bromados y como resultado existe una gran variedad de metabolitos secundarios únicos y específicos con diversas actividades biológicas (insecticida, antifúngica, anti-epífita, anti-alimentaria) (Cabrita *et al.*, 2010; Harizani *et al.*, 2016).

Compuestos con actividad insecticida aislados de macroalgas

La actividad insecticida en macroalgas del género *Laurencia* ha sido identificada en compuestos orgánicos (Figura 3). Inclusive, algunos compuestos aislados, han sido evaluados en bioensayos con larvas de mosquitos; laurepinnacin, isolaurepinnacin (acetogeninas C₁₅; Fukuzawa & Masamune, 1981), Z-laureatin, Z-isolaureatin (acetogeninas C₁₅; Watanabe *et al.*, 1989), desoxiprepacifenol (sesquiterpeno, Watanabe *et al.*, 1990), elatol (sesquiterpeno, Bianco *et al.*, 2013), obtusol (sesquiterpeno, Salvador-Neto *et al.*, 2016) y laurinterol (sesquiterpeno, Ishii *et al.*, 2017).

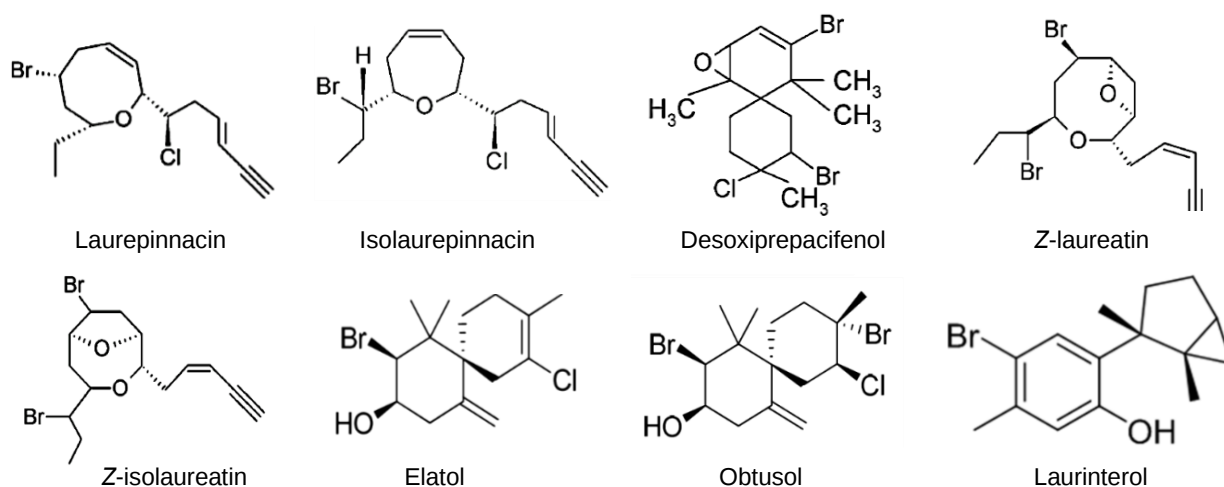


Figura 3. Compuestos con actividad insecticida de macroalgas del género *Laurencia* (Relizado con PowerPoint con imágenes obtenidas de Kim *et al.*, 2019).

Asimismo, estudios realizados con el género *Plocamium*, han identificado actividad insecticida y se han aislado monoterpenos polihalogenados activos contra plagas de insectos de interés agrícola y doméstico (Figura 4); ejemplo de esto son la telfairina y el aplisiaterpenoide A (Watanabe *et al.*, 1990) activos contra la cucaracha alemana (*Blatella germanica*) y larvas de mosquito (*Anopheles gambiae*). Otros ejemplos son el violaceno, mertenseno, dibromomertenseno y dihidromertenseno activos contra el áfido verde (*Schizaphis graminum*) que afecta cultivos de trigo y cereales, así como la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) (Argadoña *et al.*, 2000).

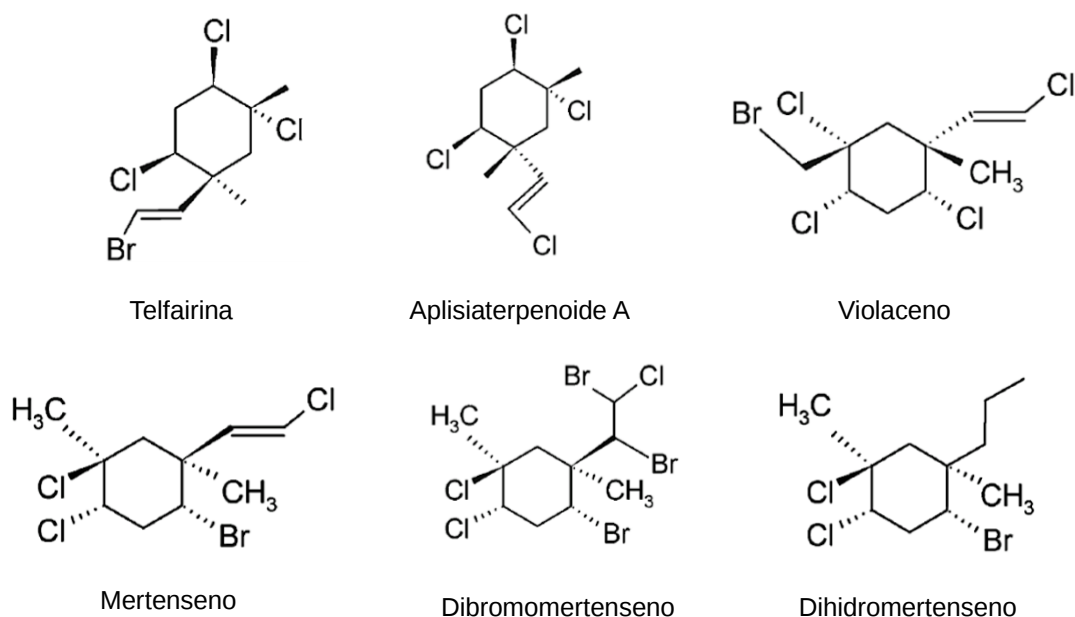


Figura 4. Monoterpenos con actividad insecticida de macroalgas del género *Plocamium*.
Relizado con PowerPoint con imágenes obtenidas de Kim *et al.*, 2019).

En algunos casos, ha sido posible determinar la dosis letal media (DL₅₀) de estos compuestos activos (Tabla III) y con ello tener evidencia específica acerca del potencial insecticida mediante comparaciones con otros compuestos y/o plaguicidas que se utilizan comúnmente.

Tabla III. Compuestos de algas marinas con actividad insecticida. ND, no determinado. DL₅₀, dosis letal al 50% calculada a las 24 horas de exposición.

Compuesto	Clasificación del compuesto	Macroalga	Insecto	Mortalidad	DL ₅₀	Referencia
Ácido caulerpinico	Alcaloide	<i>Caulerpa racemosa</i>	<i>Culex pipiens</i>	ND	Estadio II: 3.04 ppm Estadio III: 3.90 ppm Estadio IV: 4.89 ppm	Alarif <i>et al.</i> , 2010
Aplisiaterpenoide A	Monoterpeno polihalogenado	<i>Plocamium telfairiae</i>	<i>Blatella germanica</i> <i>Anopheles gambiae</i>	[6 µg/insecto]= 60% ND	ND 0.1 ppm	Watanabe <i>et al.</i> , 1990
Caulerpin	Alcaloide	<i>Caulerpa racemosa</i>	<i>Culex pipiens</i>	ND	Estadio II: 1.42 ppm Estadio III: 1.81 ppm Estadio IV: 1.99 ppm	Alarif <i>et al.</i> , 2010
Desoxiprepacifenol	Sesquiterpeno halogenado	<i>Laurencia nipponica</i>	<i>Culex pipiens</i>	ND	6.83 ppm	Watanabe <i>et al.</i> , 1989
Elatol	Sesquiterpeno halogenado	<i>Laurencia dendroidea</i>	<i>Aedes aegypti</i>	[20 ppm]= 97%	10.70 ppm	Bianco <i>et al.</i> , 2013
Isolaurepinnacin Laurepinnacin	Sesquiterpeno halogenado Sesquiterpeno halogenado	<i>Laurencia pinnata</i>	ND	ND	ND	Fukuzawa & Masamune, 1981
Laurinterol	Sesquiterpeno halogenado	<i>Laurencia nidifica</i>	<i>Reticulitermes speratus</i>	ND	2.20 µg/insecto	Ishii <i>et al.</i> , 2017
Mertenseno	Monoterpeno halogenado	<i>Plocamium cartilagineum</i>	<i>Tuta absoluta</i> <i>Schizaphis graminum</i>	[250 ppm]= 100% [100 ppm]= 22%	ND ND	Argandoña <i>et al.</i> , 2000
Obtusol	Sesquiterpeno halogenado	<i>Laurencia dendroidea</i>	<i>Aedes aegypti</i>	[5 ppm]= 60%	Estadio II: 3.50 ppm	Salvador-Neto <i>et al.</i> , 2016

Telfairina	Monoterpeno polihalogenado	<i>Plocamium telfairiae</i>	<i>Culex pipiens</i>	[10 ppm]= 100%	ND	Watanabe <i>et al.</i> , 1989
			<i>Blatella germanica</i>	[8 µg/insecto]= 80%	ND	Watanabe <i>et al.</i> , 1990
			<i>Anopheles gambiae</i>	ND	1.10 ppm	
Violaceno	Monoterpeno polihalogenado	<i>Plocamium telfairiae</i>	<i>Tuta absoluta</i>	[250 ppm]= 30%	ND	Argandoña <i>et al.</i> , 2000
			<i>Schizaphis graminum</i>	[100 ppm]= 70%	ND	
Z-laureatin	Acetogenina halogenada	<i>Laurencia nipponica</i>	<i>Culex pipiens</i>	ND	2.86 ppm	Watanabe <i>et al.</i> , 1989
Z-isolaureatin	Acetogenina halogenada				6.14 ppm	Watanabe <i>et al.</i> , 1989

A pesar del potencial insecticida de los productos naturales de macroalgas, aún falta información respecto a sus mecanismos y modos de acción. El mecanismo de acción hace referencia a las interacciones bioquímicas específicas que interfieren en un proceso biológico vital del insecto objetivo, usualmente, el mecanismo actúa sobre una proteína (enzimas, receptores, canales iónicos, proteínas estructurales), ácidos nucleicos o biomembranas de carácter específico que logran interferir en diversos procesos biológicos (El-Wakeil, 2013).

Insecticidas y mecanismos de acción

Un insecticida es un agente químico o biológico que ayuda a controlar o erradicar plagas de insectos que interfieren en el crecimiento y desarrollo de cultivos de interés y/o valor comercial (plantas, árboles, arbustos, madera) y el control de poblaciones de insectos vectores de enfermedades que afectan al humano. Los insecticidas actúan sobre una plaga objetivo, sin embargo, la mayoría son considerados de amplio espectro y tienen efecto sobre diversas formas de vida inofensivas o benéficas (El-Wakeil, 2013; Ghosal, 2018).

Los insecticidas, son considerados una herramienta importante útil para asegurar el control de insectos a largo plazo (Ghosal, 2018). Existen diferentes mecanismos de acción por los cuales funcionan, al respecto, el comité de acción de resistencia a insecticidas (IRAC) establece una clasificación basada en la alteración de funciones fisiológicas (Tabla IV); a la fecha se han registrado 30 mecanismos de acción diferentes y cinco grupos adicionales que incluyen compuestos de origen natural, esencias, bacterias y hongos con mecanismos desconocidos y/o multiana.

Tabla IV. Clasificación de los mecanismos de acción de insecticidas establecidos por el Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC, 2020).

Mecanismo de acción del insecticida	Descripción
Nervioso y muscular	Insecticidas que actúan de manera rápida sobre el sistema nervioso y/o muscular.
Crecimiento	Reguladores del crecimiento que actúan de manera lenta. Controlan la hormona juvenil y ecdisoma para evitar o limitar la formación/deposición de la cutícula o síntesis de lípidos.
Respiración	Interfieren en la respiración celular mediante la inhibición del transporte de electrones y/o la fosforilación oxidativa.
Intestino medio	Toxinas microbianas específicas de lepidópteros que se aplican o expresan en variedades de cultivos transgénicos.
Desconocido o no específico	Insecticidas que afectan sitios o funciones no definidas o no actúan de manera específica y tienen múltiples sitios de acción.

Mecanismo de acción de insecticidas: inhibición enzimática

Las enzimas son el principal blanco de muchos fármacos y plaguicidas, su efectividad influye en funciones biológicas importantes y esenciales en los organismos. Las enzimas son moléculas de origen proteico que catalizan reacciones químicas, su velocidad de reacción es elevada (aumento de velocidad de 10^6 veces o superior) y son altamente específicas (McKee & McKee, 2003). Están involucradas en todos los procesos bioquímicos de los organismos; degradación de nutrientes, transformación de energía química y formación de macromoléculas biológicas (Nelson & Cox, 2009).

Las enzimas pueden ser inhibidas mediante la unión de pequeñas moléculas orgánicas específicas y por iones (Berg *et al.*, 2002), lo que evita la utilización del sustrato y la formación del producto, esto se refleja en la disminución de su actividad (Stenersen, 2004), esta inhibición reduce o elimina la actividad enzimática. Existen dos tipos de inhibición: reversible o irreversible, donde el inhibidor irreversible se une de forma estrecha mediante enlaces covalentes a los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima, con lo que se inactiva de modo permanente, contrario

al inhibidor reversible, el cual puede disociarse de la enzima debido a que se une mediante enlaces no covalentes (Hames & Hooper, 2014).

Considerando el papel crucial de las enzimas en casi todos los procesos bioquímicos, se ha implementado la búsqueda de inhibidores enzimáticos que alteren la actividad catalítica y con ello regular o eliminar rutas metabólicas específicas (Cromartie, 1986; Guerrero & Rosell, 2005) para el control de insectos.

La inhibición enzimática es un mecanismo de acción de insecticidas ampliamente utilizado para el control de insectos en la agricultura y el hogar. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) ha sido el principal blanco de muchos insecticidas (organofosforados y carbamatos) que actúan a nivel del sistema nervioso. La AChE se encarga de regular la señal sináptica en el sistema nervioso central y periférico mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en acetato y colina (Wiesner *et al.*, 2007). Por lo tanto, su inhibición genera un aumento de acetilcolina en la unión sináptica y la eventual interrupción de la transmisión normal del impulso nervioso (Figura 5) (Siegfried & Scott, 1990), lo que causa una sobreestimulación, temblores y muerte del insecto (Pang, 2006). Es la enzima más estudiada en el campo agroquímico y actualmente existen varios insecticidas en el mercado formulados con compuestos activos que disminuyen su capacidad catalítica.

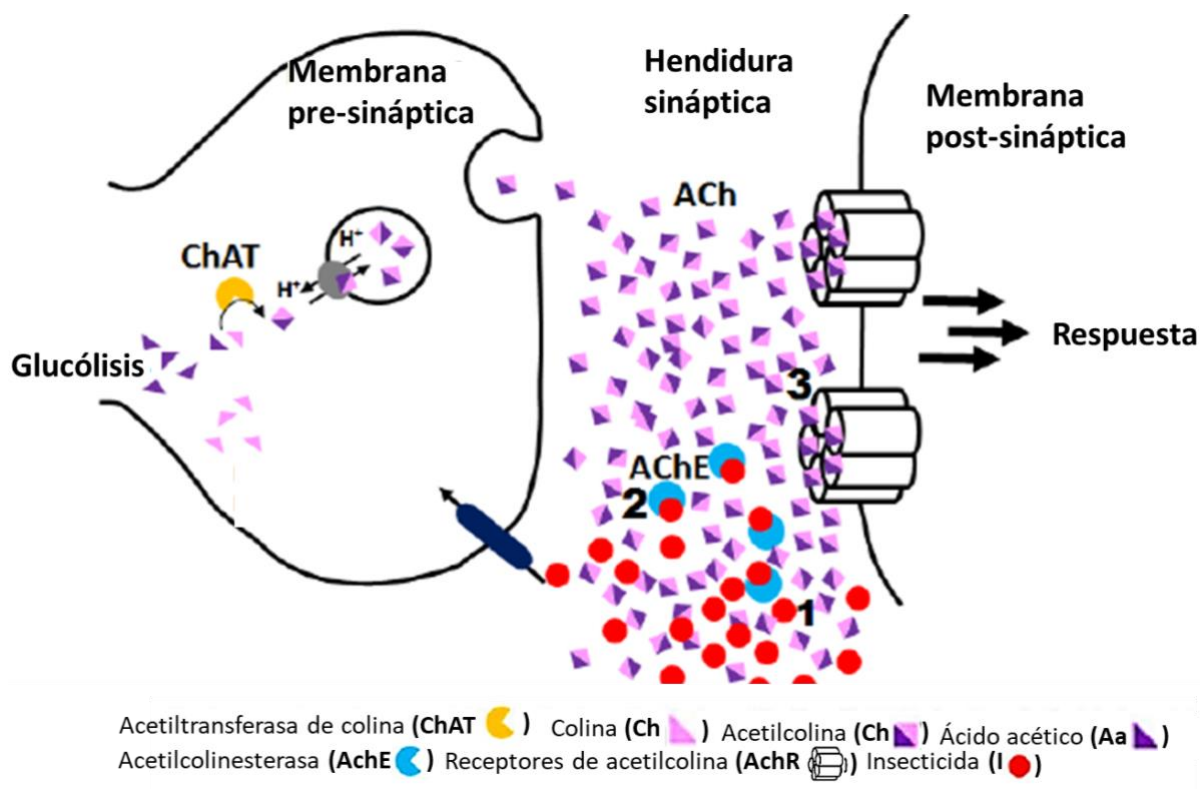


Figura 5. Proceso de inhibición de la acetilcolinesterasa causada por insecticidas (carbamatos y organofosforados). Modificado de Vargas-Bernal, *et al.*, 2012.

A pesar del extraordinario potencial, la investigación de nuevos inhibidores enzimáticos en el campo agroquímico se encuentra rezagado y su aplicación se ha limitado a la búsqueda de inhibidores de la acetilcolinesterasa, restándole atención a otras enzimas involucradas en procesos fisiológicos en insectos. Nuevos enfoques consideran la evaluación de diversas enzimas involucradas en diferentes aspectos fisiológicos, cuya inhibición podría ser clave para el manejo de plagas. Existen otras enzimas que pueden considerarse como blanco de inhibición, particularmente, aquellas involucradas en procesos específicos de los insectos (Tabla V); procesos de muda, esclerotización de la cutícula y/o alimentación, esto las convierte en objetivos de estudio interesantes e invaluable, por ende, el desarrollo de nuevos inhibidores debería enfocarse en la inhibición de la tirosinasa, dopa-descarboxilasa y proteasas, por mencionar algunas. Sin embargo, son necesarios conocimientos previos para su correcta aplicación biotecnológica.

Tabla V. Clasificación de IRAC de plaguicidas con mecanismo inhibitorio de enzimas.

	Enzima	Función en el insecto
Sistema nervioso	Acetilcolinesterasa	Regula la señal sináptica
Metabolismo	ATP sintasa	Síntesis de ATP
	Acetil CoA carboxilasa	Biosíntesis de ácidos grasos (malonil-CoA)
Desarrollo, crecimiento y protección	Tirosinasa	Esclerotización de la cutícula
	DOPA-descarboxilasa	Unión de proteínas estructurales de la cutícula
	Quitín sintasa	Síntesis de quitina
Alimentación y digestión	Proteasas	Hidrólisis de enlaces peptídicos
	α -amilasas	Hidrólisis de polisacáridos
Reproducción	Convertidora de angiotensina	Fertilidad en machos

Inhibidores enzimáticos de algas marinas con potencial insecticida

Con el objetivo de aislar compuestos insecticidas de origen marino cuyos mecanismos de acción sean similares a los insecticidas comerciales, existen nuevos enfoques dirigidos a la búsqueda de un compuesto con actividad insecticida y actividad inhibitoria de enzimas objetivo.

El sesquiterpeno elatol aislado del alga roja *Laurencia dendroidea* es un larvicida efectivo ($DL_{50} = 10.7$ ppm), causó mortalidad de todas las larvas ensayadas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller en menos de 24 horas (Bianco *et al.*, 2013), también tiene actividad antiparásita contra *Tripanozoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas y debido al daño celular observado en la microscopia electrónica, se concluyó que el posible mecanismo de acción interfería en una ruta metabólica específica en la mitocondria del parásito (Veiga-Santos *et al.*, 2010). Posteriormente, se relacionó la actividad tripanocida del elatol con una despolarización de la membrana mitocondrial seguido de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la cadena de transporte de

electrones, lo que sugiere una reducción de la actividad enzimática antioxidante del parásito (Desoti *et al.*, 2012). Paralelamente, estudios realizados con la finalidad de encontrar compuestos con actividad antitumoral, han identificado que el elatol es un inhibidor específico de la hidrólisis de ATP de la helicasa el F4A1, una enzima fundamental en el inicio del proceso de traducción de ARN mensajero a proteínas, lo que ocasiona una pérdida en la traducción de proteínas y la eventual interrupción del crecimiento y apoptosis de un amplio espectro de células tumorales (Peters *et al.*, 2018).

Otro sesquiterpeno de reciente interés es el laurinterol aislado de *Laurencia nidifica*, que tiene actividad repelente contra el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* ($DL_{50}= 12.65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y actividad insecticida moderada contra la termita *Reticulitermes speratus* ($DL_{50}= 2.20 \mu\text{g}/\text{insecto}$). Además, se evaluó la inhibición de la acetilcolinesterasa como posible mecanismo de acción, donde el laurinterol tuvo un efecto inhibitorio superior ($DL_{50}= 46.85 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a los insecticidas control; rotenona, fenitrotion y piretrinas. Los autores enfatizan la necesidad de evaluar la relación estructura-actividad del laurinterol con la finalidad de modificar la molécula y aumentar su actividad insecticida (Ishii *et al.*, 2017).

Respecto a la relación estructura-actividad, se ha evaluado el efecto insecticida de dos sesquiterpenos con estructura similar: elatol y obtusol (Figura 6), la única diferencia entre ambas moléculas es un bromo adicional en el obtusol, lo que le confiere una mayor actividad larvica. En los ensayos realizados con larvas de *Ae. aegypti* se identificó mayor porcentaje de mortalidad a las 24 horas de exposición; obtusol 10 ppm=90% y elatol 10 ppm=30% (Salvador-Neto *et al.*, 2016).

Posteriormente, se evaluaron los efectos fisiológicos y citotóxicos del obtusol mediante análisis histológicos del intestino medio de las larvas, donde se observó un cambio en la forma de las células; las células del tratamiento control mantuvieron una forma rectangular, contrario a la forma ovoide con una barrera menos organizada de las células expuestas al obtusol (Salvador-Neto *et al.*, 2016).

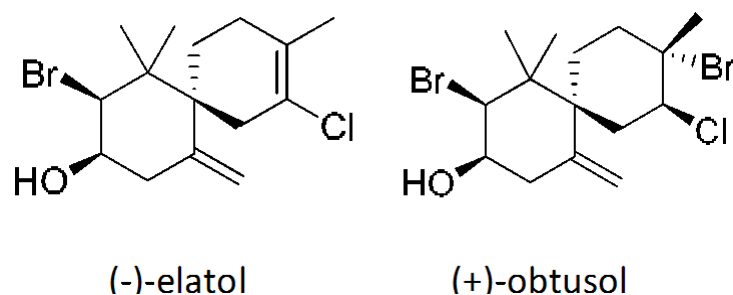


Figura 6. Sesquiterpenos con actividad larvicida aislados de *Laurencia dendroidea* (Salvador-Neto *et al.*, 2016).

Además, debido a la similitud estructural de ambos sesquiterpenos, los autores realizaron un análisis comparativo de los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) e identificaron un aumento en relación con el control (Salvador-Neto *et al.*, 2016). Estos resultados coinciden con el efecto del elatol identificado en *Tripanozoma cruzi*, lo que indicaría un daño a nivel mitocondrial, posiblemente a nivel enzimático.

Asimismo, existen líneas de trabajo enfocadas en la búsqueda de compuestos de algas marinas con actividad inhibitoria de enzimas asociadas a enfermedades y afectaciones del humano: Alzheimer, Parkinson (inhibidores de la acetilcolinesterasa; Hutchinson & Fazzini, 1996, McGleenon *et al.*, 1999), anticancerígenos (inhibidores de la ATP sintasa; Huang *et al.*, 2008) síndrome metabólico (inhibidores de la acetil CoA carboxilasa; Harwood Jr, 2004), hiperpigmentación de la piel (inhibidores de la tirosinasa; Chang, 2009), diabetes (inhibidores de la α -amilasa; Tundis *et al.*, 2010) e hipertensión arterial (inhibidores de la angiotensina; Ondetti *et al.*, 1977).

Diversos extractos de algas marinas tienen actividad inhibitoria contra algunas enzimas objetivo de insectos: la acetilcolinesterasa (Ghannadi *et al.*, 2013), la tirosinasa (Cha *et al.*, 2011) y convertidora de angiotensina (Jung *et al.*, 2006). Esta actividad se ha asociado con compuestos específicos y en algunas investigaciones se ha establecido su concentración inhibitoria media (CI₅₀) en ensayos *in vitro* (Tabla VI).

Se han identificado 86 inhibidores enzimáticos de algas marinas con actividad farmacológica. Inclusive, algunos de los compuestos han demostrado tener mayor efectividad en comparación con fármacos comerciales (Rengasamy *et al.*, 2014). Estos inhibidores enzimáticos, también podrían tener efecto sobre las enzimas objetivo de los insectos y de ser posible utilizarse para el control de plagas.

Por lo tanto, la búsqueda de compuestos con actividad insecticida con mecanismo inhibitorio de enzimas es una alternativa importante para el control de insectos (Miyazawa & Tamura, 2007). Dada la diversidad química identificada en el medio marino y los resultados prometedores obtenidos en los bioensayos de actividad insecticida, las algas marinas representan un recurso con gran potencial insecticida. Aunado a los constantes cambios legislativos que buscan fomentar el desarrollo de insecticidas de menor impacto, más seguros y efectivos, los productos naturales de algas marinas tendrán un papel fundamental en el control de plagas.

Tabla VI. Compuestos de algas marinas con actividad inhibitoria de enzimas. CI₅₀, Concentración inhibitoria media (AchE: Acetilcolinesterasa, Tyr: Tirosinasa, ECA: Enzima convertidora de angiotensina).

Compuesto	Macroalga	Enzima objetivo	CI ₅₀	Referencias
2-phloroeckol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	AchE	38.13	Yoon <i>et al.</i> , 2008
24-hydroperoxy 24-vinylcholesterol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	AchE	389.10	Yoon <i>et al.</i> , 2008
7-phloroeckol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Ache	21.11	Yoon <i>et al.</i> , 2008
Dieckol	<i>Ecklonia cava</i>	ECA	1091.50	Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011
		AchE	17.11	Yoon <i>et al.</i> , 2008
		ECA	25.43	Jung <i>et al.</i> , 2006
		Tyr	2.16	Kang <i>et al.</i> , 2004
Eckol	<i>Ecklonia cava</i>	ECA	845.08	Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011
		AchE	20.56	Yoon <i>et al.</i> , 2008
		ECA	26.37	Jung <i>et al.</i> , 2006
		Tyr	33.20	Kang <i>et al.</i> , 2004
	<i>Ecklonia stolonifera</i>	ECA	1092.20	Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011
		AchE	42.66	Yoon <i>et al.</i> , 2008
		ECA	151.81	Jung <i>et al.</i> , 2006
		Tyr	126	Kang <i>et al.</i> , 2004
Fucoidan	<i>Sargassum wightii</i>	α -amilasa	103.83	Lakshmanasenthil <i>et al.</i> , 2015
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	α -glucosidasa	13	Kim <i>et al.</i> , 2014
	<i>Fucus vesiculosus</i>	α -glucosidasa	49	Kim <i>et al.</i> , 2014
Fucosterol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	AchE	>500	Yoon <i>et al.</i> , 2008
Laurinterol	<i>Laurencia nidifica</i>	AchE	46.85	Ishii <i>et al.</i> , 2017
Phlorofucofuroeckol-A	<i>Ecklonia stolonifera</i>	AchE	4.89	Yoon <i>et al.</i> , 2008
		ECA	7.68	Jung <i>et al.</i> , 2006
		Tyr	177	Kang <i>et al.</i> , 2004
	<i>Ecklonia cava</i>	ECA	324.10	Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011
		AchE	>500	Yoon <i>et al.</i> , 2008
		ECA	51.71	Jung <i>et al.</i> , 2006
		Tyr	92.80	Kang <i>et al.</i> , 2004
		ECA	749.73	Wijesinghe <i>et al.</i> , 2011
Triphlorethol-A	<i>Ecklonia stolonifera</i>	AchE	>500	Yoon <i>et al.</i> , 2008
		ECA	261.44	Jung <i>et al.</i> , 2006

2. JUSTIFICACIÓN

Durante las últimas décadas se ha incrementado el uso de plaguicidas químicos de origen sintético para el control de plagas. Sin embargo, su uso desmedido ha generado consecuencias significativas en el ambiente, en los alimentos de consumo humano y en la salud. Además, derivado de su aplicación constante y sin medidas de control se ha identificado un incremento en los casos de resistencia en insectos, lo que agudiza el problema.

Actualmente, se han duplicado los esfuerzos enfocados en la búsqueda de nuevos plaguicidas biorracionales; de menor impacto y baja toxicidad a organismos no objetivo, cuyos tiempos de degradación sean menores. Diversas fuentes naturales de compuestos insecticidas han sido exploradas, donde se destaca la diversidad de los organismos marinos. A pesar de que existen trabajos donde se evidencia el potencial insecticida y larvicida de extractos de macroalgas, aún no se ha establecido el aislamiento e identificación de los compuestos responsables de la actividad y en algunos casos se desconocen sus mecanismos de acción.

El mecanismo de inhibición enzimática puede ser un método dirigido a investigaciones de bioprospección, donde se logre una identificación de compuestos inhibidores de enzimas objetivo, las cuales estén involucradas en procesos catalíticos específicos en los insectos. Bajo este enfoque enzimático, los compuestos de algas marinas tendrán un papel prometedor en el desarrollo de alternativas viables, seguras y efectivas para el control de plagas.

3. HIPÓTESIS

Las macroalgas sintetizan compuestos terpenoides con actividad insecticida que inhiben enzimas objetivo involucradas en procesos fisiológicos vitales para los mosquitos. Dada la diversidad de terpenoides identificada en macroalgas, se espera obtener compuestos con actividad insecticida con mecanismo de inhibición enzimático contra una y/o múltiples enzimas objetivo.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Aislar e identificar terpenos activos de extractos de macroalgas contra el mosquito *Aedes aegypti*.

Objetivos particulares:

- Extraer la fracción terpénica de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Laurencia johnstonii* y *Acanthophora spicifera*.
- Aislar y purificar terpenos mediante fraccionamientos cromatográficos.
- Evaluar la actividad insecticida de extractos crudos y/o fracciones de macroalgas contra larvas de *Aedes aegypti*.
- Evaluar la inhibición enzimática de tres enzimas objetivo: acetilcolinesterasa, tirosinasa y enzima convertidora de angiotensina.
- Identificar la estructura química de los terpenos activos mediante técnicas espectroscópicas.
- Determinar la concentración letal de los terpenos aislados contra larvas de *Aedes aegypti*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Recolecta del material algal

En este estudio se trabajó con tres especies de macroalgas: *Sargassum horridum*, *Laurencia johnstonii* y *Acanthophora spicifera*. Se recolectó material en fresco (aproximadamente, 10 kg peso húmedo) de cada especie. *Sargassum horridum* se recolectó en la playa El Sauzoso, San Juan de la Costa, B.C.S. (24° 18' 52.9" N 110° 38' 26.0" W), *Acanthophora spicifera* se recolectó en la playa de Marina Costa Baja (24°12'55.6" N 110°18'08.1" W) y *Laurencia johnstonii* recolectada en playa El Coyote, B.C.S. (24° 21' 09.2" N–110° 16' 23.5" W) (Figura 7).

La identificación taxonómica se realizó en el laboratorio de Botánica Marina de la UABCS a cargo del Dr. Juan Manuel López Vivas. En el caso de los ejemplares de *Laurencia*, se utilizaron caracteres morfológicos para su identificación. Sin embargo, se almacenó material en seco para confirmar la identificación de la especie *L. johnstonii* mediante análisis moleculares.

El material algal se transportó al laboratorio de química de algas en IPN-CICIMAR, y se lavó con agua corriente para eliminar arena y epifitos asociados. Posteriormente, se secó al sol y se almacenó hasta su extracción.

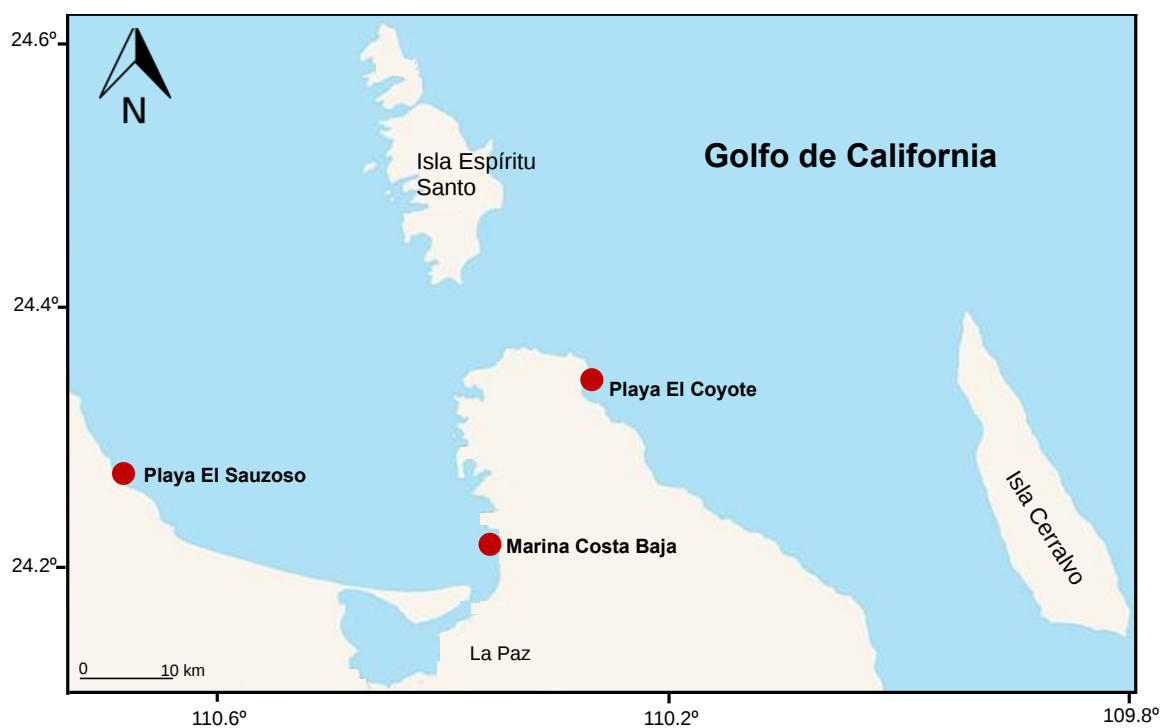


Figura 7. Área de recolecta de las especies de macroalgas en la Bahía de La Paz, B.C.S, México.

6.2 Extracción de la fracción terpénica a partir del material algal

Tres kilogramos de alga seca y molida de *Sargassum horridum* y *Acanthophora spicifera* fueron extraídos con hexano destilado (2 litros) tres veces consecutivas. Posteriormente, se realizó una segunda extracción con etanol destilado (2 litros) tres veces consecutivas. Ambos extractos fueron filtrados y concentrados en un rotavapor Yamato R500 a una temperatura de 40°C a presión reducida. Los extractos hexánicos y etanólicos fueron almacenados a 8°C hasta su análisis posterior.

En el caso de la especie *Laurencia la jolla*, se trabajó con el extracto etanólico 13-02-40. Se recuperó la fracción terpénica mediante una extracción sólido-líquido en un embudo de separación. Para ello, 115 g del extracto fueron adsorbidos en 345 g de sílica gel de fase norma, y posteriormente, se realizaron tres lavados secuenciales con cada disolvente orgánico en gradiente de polaridad: hexano, CH₂-Cl₂, etanol y H₂O. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina y se unieron según su afinidad cromatográfica. Finalmente, se obtuvieron tres fracciones: hexánica, etanólica y acuosa de *Laurencia johnstonii*.

6.3 Aislamiento y purificación de terpenos mediante fraccionamientos cromatográficos

Con la finalidad de aislar y purificar los terpenos de los extractos hexánicos y etanólicos de cada especie, se utilizaron dos técnicas cromatográficas: extracción sólido-líquido (**ESL**) y fraccionamiento en columna cromatográfica (**CC**) empacada con sílica gel fase normal. De manera independiente, cada extracto fue tratado con base a la polaridad identificada en placas de cromatografía en capa fina (Merk, sílica gel 60 F₂₅₄), rendimientos obtenidos y actividad biológica, por lo que se utilizaron distintos esquemas de separación para cada macroalga. Todas las fracciones (**F**) obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se unieron según su afinidad cromatográfica. Se utilizaron claves y números para identificar a la fracción obtenida en cada uno de los procesos de separación. Se etiquetaron según su clave de identificación; extracción sólido-líquido (**ESLn**), columna cromatográfica (**CCn**), y número de fracción obtenida (**Fn**) en cada etapa del proceso. Las fracciones fueron almacenadas a -10°C hasta su análisis posterior.

6.3.1 Aislamiento de terpenos de *Sargassum horridum*

De la muestra de *Sargassum horridum* únicamente, se fraccionó el extracto hexánico (Figura 8). Para ello, se tomaron 11.7 g de extracto previamente disuelto en etanol destilado y se adsorbieron en 35 g de sílica gel fase normal. La muestra se colocó en húmedo en una columna de vidrio empacada con 100 g de sílica gel fase normal. Se realizaron lavados secuenciales con solventes orgánicos en gradiente de polaridad: hexano (5 volúmenes), CH₂-Cl₂ (2 volúmenes), etanol (1 volumen) y metanol: H₂O 50:50 (1 volumen).

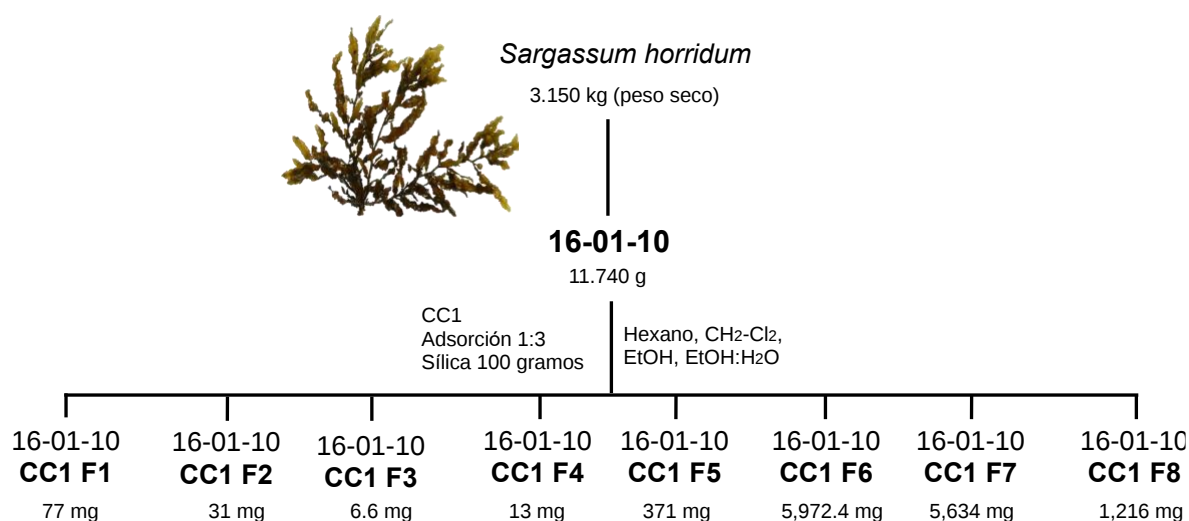


Figura 8. Esquema de fraccionamiento en columna cromatográfica del extracto hexánico de *Sargassum horridum*.

6.3.2 Aislamiento de terpenos de *Acanthophora spicifera*

Para *Acanthophora spicifera* se realizó un fraccionamiento cromatográfico con el extracto hexánico (Figura 9). Para ello, se tomaron 2.75 g de extracto previamente disuelto en hexano y se adsorbió en 8.2 g de sílica (1:3). La muestra se colocó en húmedo en una columna de vidrio empacada con 109 g de sílica (1:40). Se realizaron lavados secuenciales con: Hexano (4 volúmenes), CH₂-Cl₂ (2 volúmenes), etanol (2 volúmenes) y etanol: H₂O 50:50 (1 volumen).

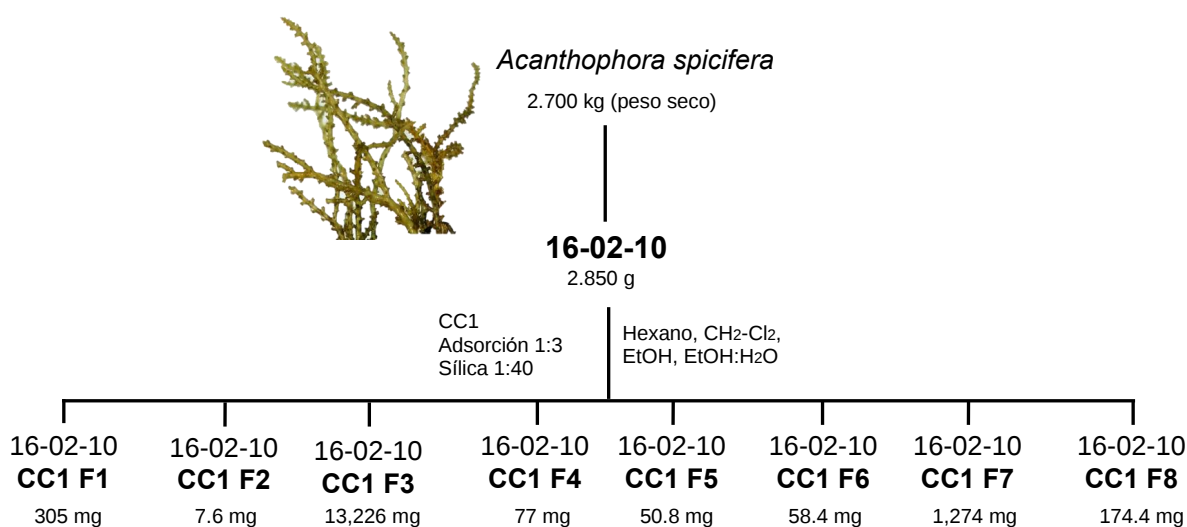


Figura 9. Esquema de fraccionamiento en columna cromatográfica del extracto hexánico de *Acanthophora spicifera*.

Con respecto al extracto etanólico, se realizó una extracción sólido-líquido a partir de 90 g de extracto, se adsorbió en sílica gel (1:3) y se realizaron lavados con solventes en gradiente de polaridad: hexano, CH₂-Cl₂ y etanol-H₂O 50:50 (Figura 10).

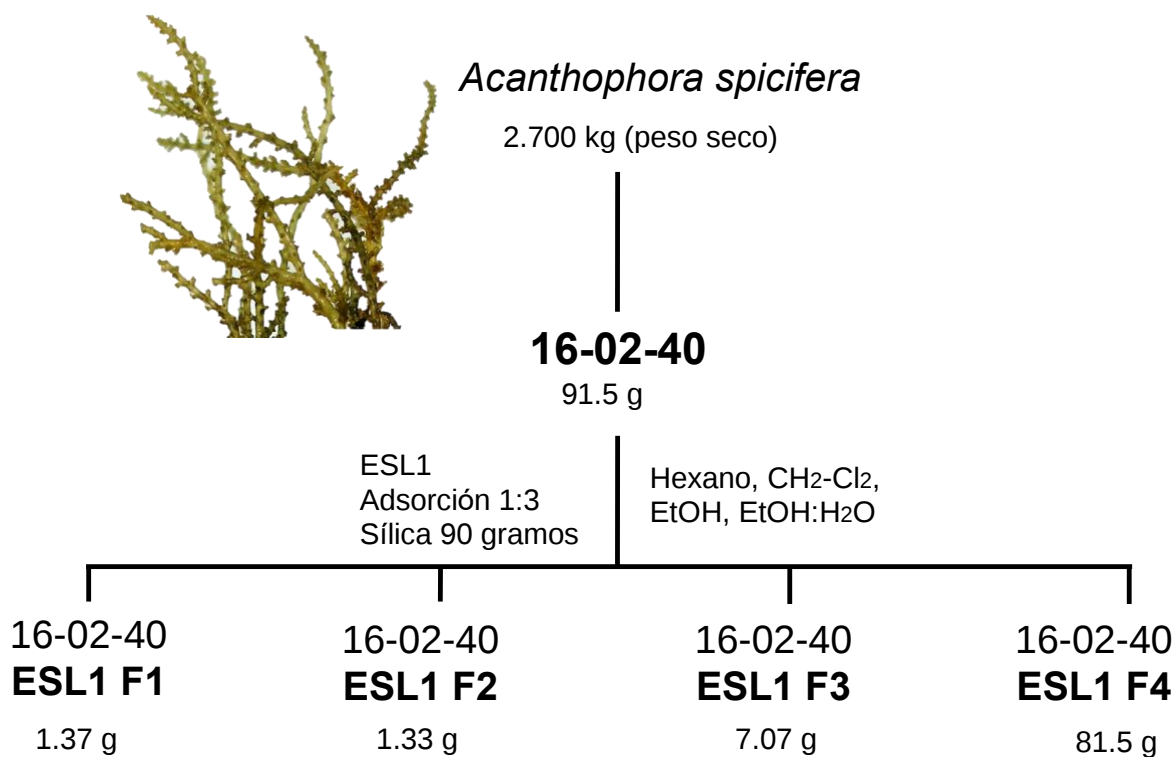


Figura 10. Esquema de extracción sólido-líquido del extracto etanólico de *Acanthophora spicifera*.

6.3.3 Aislamiento de terpenos de *Laurencia johnstonii*

Para *Laurencia johnstonii* se realizaron varias extracciones sólido-líquido de su fracción hexánica (Figura 11). Se tomaron 3 g previamente disueltos en hexano destilado y se adsorbió en 5 g de sílica gel (1:3). La muestra se colocó en seco en una columna de vidrio empacada con 120 g de sílica (1:40) y se realizó un percolado con solventes orgánicos: hexano (3 volúmenes), CH₂-Cl₂ (2 volúmenes), etanol (2 volúmenes).

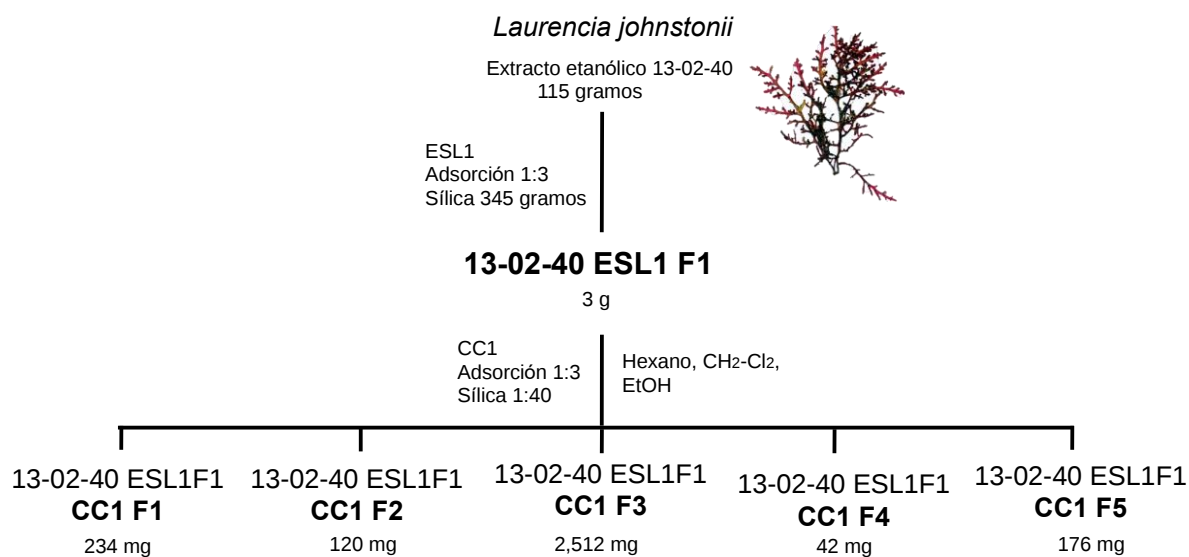


Figura 11. Esquema de extracción del extracto hexánico de *Laurencia johnstonii*.

A la fracción etanólica de *Laurencia johnstonii* se le realizó una extracción sólido-líquido. Se tomaron 50 g de extracto previamente disuelto en etanol destilado y se adsorbió en 150 g de sílica gel (1:3). La muestra se colocó en seco y se realizaron lavados con solventes en gradiente de polaridad: hexano, CH₂-Cl₂, etanol y agua. Posteriormente, se realizó un fraccionamiento en columna a partir de 3 g de extracto adsorbidos en 9 g de sílica (1:3). La muestra se colocó en húmedo con hexano a una columna de vidrio empacada con 150 gramos de sílica gel. Se realizaron lavados secuenciales en gradiente de polaridad: hexano (4 volúmenes), hexano-CH₂-Cl₂ 95:5 (3 volúmenes), hexano-CH₂-Cl₂ 90:10 (2 volúmenes), hexano-CH₂-Cl₂ 70:30 (1 volumen), CH₂-Cl₂ (1 volumen), metanol (1 volumen). Se seleccionó la fracción con mayor rendimiento y se realizó una segunda cromatografía en columna, se tomaron 550 mg y se adsorbieron en 1.65 g de sílica gel (1:3). La muestra se colocó en una columna empacada con 55 g de sílica (1:100) y se realizaron lavados en gradiente de polaridad: CH₂-Cl₂ (5 volúmenes), CH₂-Cl₂-metanol 95:5 (3 volúmenes), CH₂-Cl₂-metanol 90:10 (2 volúmenes), CH₂-Cl₂-metanol 85:15 (2 volúmenes), CH₂-Cl₂-metanol 80:20 (2 volúmenes) y metanol (1 volumen) (Figura 12).

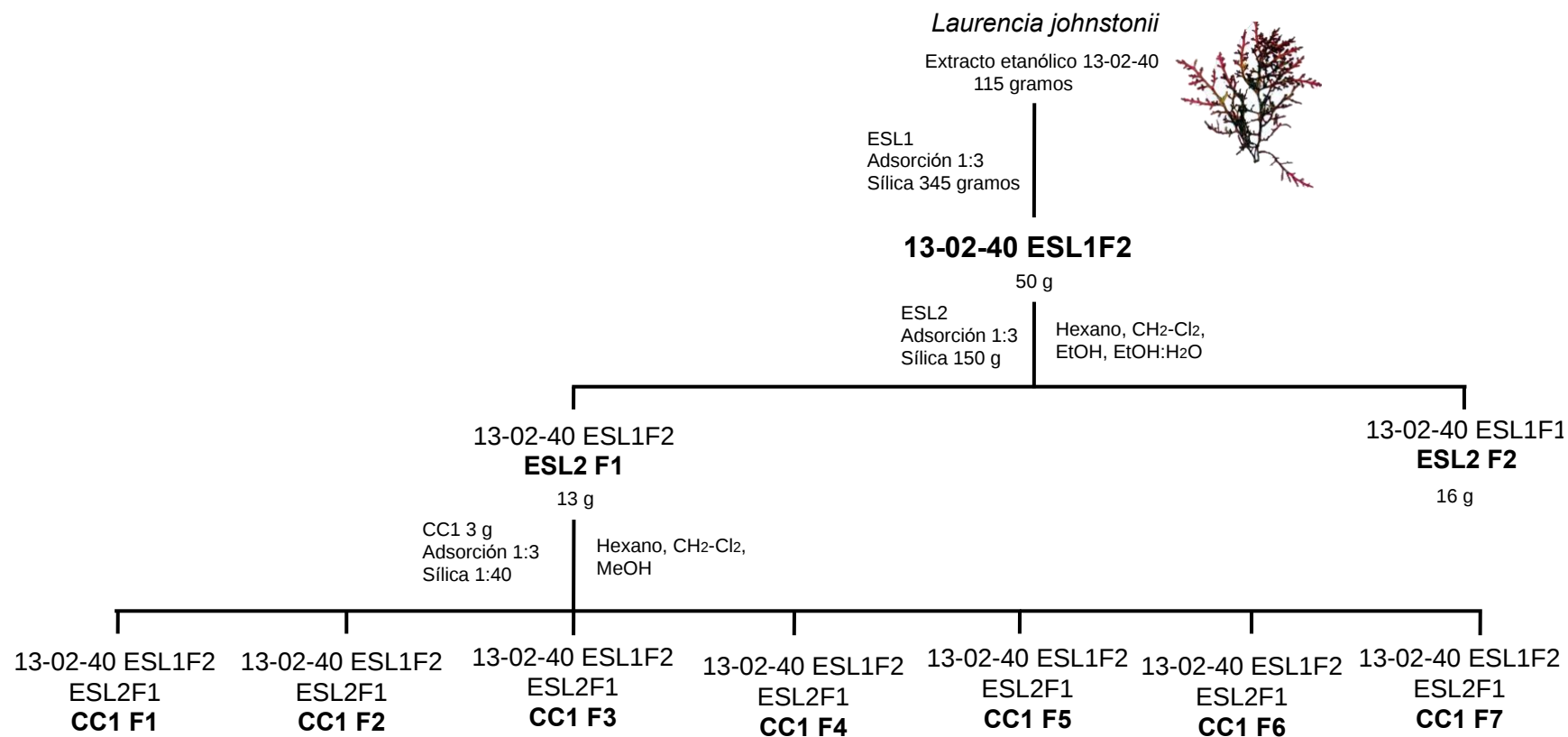


Figura 12. Esquema de extracción del extracto etanólico de *Laurencia johnstonii*.

6.4 Evaluación de la actividad insecticida contra larvas de *Aedes aegypti*

Se aplicó el protocolo de susceptibilidad a insecticidas en larvas de mosquito propuesto por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1981). Se utilizaron larvas del tercer estadio tardío-cuarto temprano de *Aedes aegypti* cepa Nueva Orleans, obtenidas del insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública en Tapachula, Chiapas en colaboración con el Dr. José Luis Torres Estrada.

Para determinar la concentración letal de las fracciones terpénicas obtenidas, se utilizó un gradiente de concentración de cada extracto y/o fracción; 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg·mL⁻¹. Se realizó un stock de cada concentración y se aplicó 1 mL a la unidad experimental. Cada unidad experimental consistió en un vaso de plástico transparente que contenía 199 mL de agua.

Para el bioensayo se realizaron cuatro réplicas, 10 larvas por unidad experimental (40) por cada concentración evaluada (200). Adicionalmente, se incluyó el control negativo (etanol) y blanco (agua). Se evaluó la mortalidad de las larvas a las 24 horas de exposición y con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión probit (Finney, 1964) para establecer la dosis letal media (DL₅₀) de las fracciones activas.

6.5 Evaluación del mecanismo de acción: Inhibición de enzimas objetivo

Se evaluaron tres mecanismos de acción de insecticidas basados en la inhibición de enzimas objetivo de insectos: acetilcolinesterasa, tirosinasa y enzima convertidora de angiotensina. Para ello, se siguieron protocolos colorimétricos establecidos para cada enzima, las evaluaciones se realizaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC y se utilizaron microplacas pozos BRANDplates®, pureGrade 96 pozos, 350 μL . Para los ensayos, se realizó un stock de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de cada muestra a evaluar y posteriormente, se realizaron diluciones a distintas concentraciones (2, 1, 0.5, 0.25 y $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Se consideraron cuatro réplicas, un blanco (buffer) y un inhibidor comercial específico para cada enzima.

Se determinó el porcentaje de inhibición de cada extracto y fracción, sin embargo, debido al poco rendimiento obtenido de algunas fracciones, no se determinó (nd) su actividad. De igual manera, se determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en las fracciones con mayor rendimiento.

6.5.1 Protocolo de Inhibición de la Acetilcolinesterasa (Rhee *et al.*, 2003).

La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se realizó mediante el protocolo de Rhee *et al.* (2003). Este método colorimétrico se basa en el protocolo de Ellman *et al.* (1961), y el principio de hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (o sustratos relacionados) por la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, esta reacción libera un grupo tiol que reacciona con el cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB; reactivo Ellman), para producir un dianión, 5-tio-2-nitrobenzoato de coloración amarilla, cuyo valor de absorbancia se encuentra entre los 405 y 420 nm, con un óptimo en 412 nm, por lo que el aumento de los valores de absorbancia son proporcionales a la actividad de la enzima (Jiménez-Díaz & Martínez-Monge, 2000; Wilson, 2001).

El ensayo de inhibición se realizó con la enzima acetilcolinesterasa de anguila eléctrica (*Electrophous electricus*, EC 3.1.1.7, Tipo V-S, Sigma-Aldrich C2888), sustrato acetilcolina yodada (Sigma-Aldrich A5751), reactivo DTNB (Sigma-Aldrich D8130) y el inhibidor Donepezilo (Sigma-Aldrich A5751 D6821) como control positivo.

Se utilizaron tres buffers: Buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8), Buffer B (BSA 0.1%) y Buffer C (Buffer A + 0.1 M NaCl + 0.02 M MgCl₂). La acetilcolinesterasa fue diluida con el buffer A para obtener un stock de 1000 U·mL⁻¹. Posteriormente, se utilizó el buffer B para realizar una segunda dilución y obtener alícuotas de 0.22 U·mL⁻¹ para el ensayo. El sustrato se diluyó con agua destilada a una concentración de 15 mM. El reactivo DTNB se preparó al momento y se utilizó el buffer C para una concentración 3 mM. El donepezilo fue diluido con DMSO a una concentración de 1 mg·mL⁻¹.

El volumen de reacción contenía: 50 µL de buffer A [50 mM Tris-HCl], 25 µL de la muestra y 25 µL de AchE [0.22 U·mL⁻¹]. Se realizó una preincubación a temperatura ambiente por 10 minutos, y se realizó una primera lectura a 405 nm. Posteriormente, se añadieron 125 µL de DTNB [3 mM] y 25 µL de sustrato [15 mM]. Se realizó una incubación a 30°C por 25 minutos y se realizó una segunda lectura a 405 nm.

El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100$$

Donde, A₀ = absorbancia del control (buffer A) y A₁=absorbancia de la muestra

6.5.2 Protocolo de Inhibición de la Tirosinasa (Momtaz *et al.*, 2008).

La tirosinasa (Tyr) también llamada polifenol oxidasa, cataliza dos reacciones consecutivas; hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y oxidación de o-difenoles a o-quinonas. Su variedad de sustratos y alta reactividad de o-quinonas determinan su actividad en diversos procesos fisiológicos, como la síntesis de melanina y la esclerotización de la cutícula en artrópodos (Ortíz-Ruíz, 2016). La primera actividad catalítica inicia con la hidrólisis del sustrato L-tirosina a L-DOPA, seguido de una segunda reacción, donde se oxida la L-DOPA para producir o-dopaquinona. Sin embargo, la o-dopaquinona no es un compuesto estable y se oxida para formar dopacroma, un cromóforo con valores de absorbancia entre 305 y 475 nm (Galindo & Bernabeu, 1984).

Por lo cual, la absorción de la dopacroma es utilizada para medir la actividad de la tirosinasa. Para ello, se puede utilizar L-tirosina o L-DOPA como sustratos y la actividad enzimática es monitoreada mediante la formación de dopacroma (Cabanés *et al.*, 1982). El ensayo de inhibición se realizó con la enzima tirosinasa de champiñón (EC 1.14.18.1, Sigma-Aldrich T3824), sustrato L-tirosina (Sigma-Aldrich T3754) y ácido kojico (Sigma-Aldrich K3125) como inhibidor positivo. El stock de cada extracto fue diluido en DMSO y posteriormente, se realizó una dilución a la concentración deseada con buffer fosfatos 50 mM (pH 6.5).

El volumen de reacción contenía: 70 µL de la muestra y 30 µL de Tyr [333 U·mL⁻¹, diluido en buffer fosfatos 50 mM]. Se realizó una preincubación a 30 °C por 5 minutos, y se realizó una primera lectura a 450 nm. Posteriormente, se añadieron 110 µL de sustrato L-tirosina [2 mM]. Se realizó una incubación a 30°C por 30 minutos y se realizó una segunda lectura a 450 nm.

El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(A-B)}{A} \right] \times 100$$

Donde, A = absorbancia del control (blanco) y B=absorbancia de la muestra

6.5.3 Protocolo de Inhibición de la convertidora de angiotensina (Jimsheena & Gowda, 2009).

La enzima convertidora de angiotensina (ACE) es una peptidil dipeptidasa que separa dos aminoácidos (His-Leu) del decapeptido Angiotensina I para formar al octapéptido Angiotensina II, el cuál es un vasoconstrictor eficiente. La ACE es una enzima clave en el sistema renina-angiotensina que ayuda a regular la presión arterial (Ahmad *et al.*, 2017).

La ACE cataliza la hidrólisis del sustrato Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL) y produce ácido hipúrico (HA) e His-Leu (HL), por lo cual, la cantidad de ácido hipúrico es directamente proporcional a la actividad de la enzima. El método colorimétrico considera la cuantificación de HA al formar un complejo con piridina y cloruro de bencensulfonilo (BSC), con una coloración amarilla con un valor de absorbancia de 410 nm (Jimsheena & Gowda, 2009).

El ensayo de inhibición se realizó con la enzima convertidora de angiotensina de pulmón de conejo (EC 3.4.15.1, Sigma-Aldrich A6778), sustrato HHL (Sigma-Aldrich H1635) y captopril (Tableta 25 mg) como inhibidor positivo. Las muestras para evaluar fueron diluidas en etanol destilado al 1%, se utilizó buffer borato de sodio pH 8.2 que contenía NaCl 0.3 M, piridina (Sigma-Aldrich 270970) y cloruro de bencensulfonilo (BSC) (Sigma-Aldrich 108138).

El volumen de reacción contenía: 125 μL de buffer borato de sodio, 10 μL de la muestra, 10 μL de la enzima ACE [$1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, diluido en buffer borato de sodio] y 50 μL de sustrato HHL [5 mM]. Se realizó una incubación a 37°C por 30 minutos y se detuvo la reacción al añadir 75 μL de HCl [1 M]. Posteriormente, se añadieron 150 μL de piridina y 75 μL de BSC. Se agitó y enfrió en un baño de hielo. Finalmente, se tomaron 200 μL de la mezcla y se transfirieron a una microplaca de 96 pozos. La cantidad de HA liberado durante la reacción se midió a los 410 nm.

El porcentaje de inhibición se calculó según la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{(Ac - As)}{Ac - Ab} \right] \times 100$$

Donde Ac= absorbancia del control (captopril), As= absorbancia de la muestra, Ab= absorbancia del blanco (buffer).

6.6 Identificación de la estructura química de los terpenos activos

Después de analizar los resultados obtenidos de los ensayos biológicos, se seleccionaron las fracciones más activas, con mayor pureza y rendimiento. Se enviaron a servicio externo para realizar un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC/MS) al laboratorio de cromatografía de Gases/Masas en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma de Morelos, a cargo de la Dra. Iris Montoya.

La identificación de los compuestos se realizó con base al patrón de fragmentación, y la masa molecular de cada pico del cromatograma. Se realizaron búsquedas en bases de datos digitales disponibles e información científica publicada.

Adicionalmente, se realizaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbón 13 (RMN+H,¹³C) mediante servicio externo por el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional. Las señales de los espectros de resonancia fueron comparadas con bases de datos e información científica específica del género de macroalga.

6.7 Análisis estadísticos

Para el análisis de la actividad insecticida, se utilizaron los datos de mortalidad de las larvas y se realizó una regresión Probit al 95% de confianza para obtener las DL_{50} para cada fracción evaluada. Se utilizó el software estadístico SPSS (IBM, 2017).

Para el análisis de la inhibición enzimática, se obtuvo la base de datos de las absorbancias en Excel y se calculó el porcentaje (%) de inhibición con su respectivo error estándar. El cálculo de la CI_{50} se realizó en el programa PRISM 8 (GraphPad, 2019).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de la fracción terpénica de macroalgas

Se realizaron las extracciones respectivas para cada extracto hexánico y etanólico de las especies de macroalgas (Tabla VII). El mayor rendimiento (22.92%) correspondió al extracto etanólico de *Sargassum horridum*, *Laurencia johnstonii* presentó rendimientos alrededor del 3% en todos sus extractos y *Acanthophora spicifera* correspondió al menor rendimiento en su extracto hexánico (0.10%).

Tabla VII. Fracciones terpénicas obtenidas a partir de extractos orgánicos de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* y *Laurencia johnstonii*.

Macroalga	Clave Extracto	Solvente	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
<i>Sargassum horridum</i>	16-01-10	Hexano	11.74	0.37
	16-01-40	Etanol	721.90	22.92
<i>Acanthophora spicifera</i>	16-02-10	Hexano	2.85	0.10
	16-02-40	Etanol	91.50	3.39
<i>Laurencia johnstonii</i>	13-02-40 ESL1 F1	Hexano	60.30	3.02
	13-02-40 ESL1 F2	Etanol	70.30	3.52
	13-02-40 ESL1 F3	Agua	65.80	3.30

7.2 Aislamiento y purificación de terpenos

Se utilizaron extracciones sólido-líquido y separaciones en cromatografía en columna para cada extracto. Las condiciones de aislamiento para cada especie dependieron de la disponibilidad de muestra, análisis en cromatografía en capa fina y resultados positivos en pruebas de actividad biológica, por tal motivo, se realizó un mayor esfuerzo de aislamiento con fracciones de *Laurencia johnstonii* donde se obtuvieron 14 fracciones de ambos extractos (Tabla VIII).

Tabla VIII. Fracciones obtenidas de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* y *Laurencia johnstonii* mediante técnicas de aislamiento cromatográfico.

Macroalga	Extracto	Extracción Sólido-líquido	Cromatografía en columna	Total de fracciones
<i>Sargassum horridum</i>	16-01-10	-	1	8
	16-01-40	-	-	0
<i>Acanthophora spicifera</i>	16-02-10	-	1	8
	16-02-40	1	-	4
<i>Laurencia johnstonii</i>	13-02-40 ESL1 F1	-	1	5
	13-02-40 ESL1 F2	1	1	9

7.3 Evaluación de la actividad insecticida: Susceptibilidad de larvas de *Aedes aegypti*

Para realizar los ensayos de actividad insecticida se utilizó un stock inicial de 2 mg·mL⁻¹ de cada fracción a evaluar. Por ello, se descartaron algunas fracciones con bajo rendimiento. En total se evaluaron 18 fracciones; 4 de *Sargassum horridum*, 7 de *Acanthophora spicifera* y 7 de *Laurencia johnstonii* (Tabla IX).

En comparación, se identificó mayor actividad larvicida en *L. johnstonii*, en la mayoría de las fracciones evaluadas [2 mg·mL⁻¹] mostraron mortalidad del 100% de las larvas después de 24 horas de exposición. Respecto a la dosis letal media (DL₅₀), se determinaron valores inferiores a los 500 µg·mL⁻¹ en las fracciones más activas. Particularmente, se identificó mayor actividad larvicida en la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 con una DL₅₀= 240 µg·mL⁻¹, esta fracción se distinguió durante los ensayos *in vitro*, ya que la mortalidad observada ocurrió en las primeras tres horas de exposición, a diferencia de otras fracciones, cuyos valores de mortalidad fueron observados durante el tiempo total del ensayo (24 horas).

Tabla IX. Mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* con fracciones de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* y *Laurencia johnstonii*. Porcentaje de mortalidad calculado con stock de 2 mg·mL⁻¹. (DL₅₀, dosis letal media (mg mL⁻¹), E.S, error estándar, - no determinado).

	Fracción	Mortalidad (%)	DL ₅₀	E.S.	Intervalo de confianza (95%)	X ₂
<i>Laurencia johnstonii</i>	13-02-40	100	0.35	0.32	0.31 - 0.39	8.11
	13-02-40 ESL1 F1	100	0.34	0.80	0.31 - 0.36	2.85
	13-02-40 ESL1 F2	100	0.50	0.54	0.36 - 0.72	156.82
	13-02-40 ESL1 F3	86.50	1.47	0.60	-	12177.19
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F3	100	0.34	0.63	0.30 - 0.39	37.32
	13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1	100	0.24	0.73	0.22 - 0.25	2.35
	13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F2	64.80	1.80	0.70	1.55 - 2.19	33.90
<i>Sargassum horridum</i>	16-01-40	2.50	-	-	-	-
	16-01-40 CC1 F5	98.80	1.36	0.43	-	10.75
	16-01-40 CC1 F6	2.40	-	-	-	15.34
	16-01-40 CC1 F7	45	2.71	0.28	2.03 - 4.29	11.21
<i>Acanthophora spicifera</i>	16-02-40	6.30	1.28	0.65	0.74 - 5.96	10.14
	16-02-10 CC1 F3	100	0.77	0.44	0.70 - 0.85	21.41
	16-02-10 CC1 F7	22	6.08	0.31	3.48 - 19.87	9.45
	16-02-40 ESL1 F1	60	1.80	0.26	1.47 - 2.38	11.82
	16-02-40 ESL1 F2	100	0.78	0.25	0.61 - 1.01	58.56
	16-02-40 ESL1 F3	0	-	-	-	-
	16-02-40 ESL1 F4	100	1.23	0.99	1.14 - 1.34	7.58

Por otra parte, tres de las siete fracciones evaluadas [2 mg·mL⁻¹] de *A. spicifera* causaron 100% de mortalidad en las larvas. Los valores de dosis letal media fueron superiores a los 700 µg·mL⁻¹, donde en la fracción 16-02-10 CC1 F3 se obtuvo la dosis más baja (DL₅₀=770 µg·mL⁻¹). Sin embargo, en la mayoría de las fracciones no se identificó actividad larvicide, inclusive la fracción 16-02-40 ESL1 F3 no mostró actividad. Finalmente, solo una de las cuatro fracciones de *S. horridum* mostró actividad larvicide con una dosis letal media de 1360 µg·mL⁻¹.

7.4 Evaluación del mecanismo de acción por inhibición enzimática

Para continuar con la evaluación de las actividades biológicas de los extractos y sus fracciones, se realizaron ensayos de inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa y tirosinasa. En ambos ensayos se consideró el rendimiento y la disponibilidad de la muestra. Por ello, se evaluaron 29 fracciones; 4 de *S. horridum*, 14 de *A. spicifera* y 11 de *L. johnstonii*. Posteriormente, se realizó una selección de las fracciones más activas contra ambas enzimas y se evaluaron en el ensayo de inhibición de la angiotensina.

7.4.1 Inhibición enzimática: Acetilcolinesterasa

De manera general, se identificó inhibición de la enzima acetilcolinesterasa con las fracciones de las tres especies de macroalgas a una concentración de $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabla X). Donde, los mayores porcentajes de inhibición correspondieron a las fracciones de *A. spicifera* ($>80\%$), seguido por las fracciones de *L. johnstonii* (70-20%). Respecto a las fracciones de *S. horridum*, se identificaron porcentajes de inhibición bajos ($<57\%$).

Sin embargo, los valores de IC_{50} , indicaron una mayor actividad de inhibición con las fracciones de *L. johnstonii*, ya que se identificaron los valores de concentración inhibitoria media inferiores a $633 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, particularmente, la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 fue la más activa con un IC_{50} de $201.7 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, seguido de las fracciones 13-02-40 ESL1 F1 CC1 F3 y 13-02-40 ESL1 F1 CC1 F4, ambas con valores inferiores a los $300 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Tabla X. Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa con fracciones de extractos de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* y *Laurencia johnstonii*. Porcentaje de inhibición calculado con stock de 2 mg·mL⁻¹. (IC₅₀, concentración inhibitoria media, E.S, error estándar, - no determinado).

	Fracción	Inhibición (%)	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	E.S.
<i>Laurencia johnstonii</i>	13-02-40	70.18	632.60	0.37
	13-02-40 ESL1 F1	72.05	482.70	0.45
	13-02-40 ESL1 F2	42.30	-	0.38
	13-02-40 ESL1 F3	33.17	-	0.37
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F1	28.21	-	0.46
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F2	27.92	-	0.37
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F3	59.80	272.20	0.51
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F4	52.51	292.50	0.41
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F5	22.07	-	0.36
	13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1	72.15	201.70	0.62
	13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F2	71.81	813.40	0.00
<i>Sargassum horridum</i>	16-01-40	42.13	1412	0.44
	16-01-40 CC1 F5	29.69	1786	0.30
	16-01-40 CC1 F6	49.76	582.30	0.52
	16-01-40 CC1 F7	57.24	857.40	0.29
<i>Acanthophora spicifera</i>	16-02-10	81.48	1412	0.93
	16-02-40	83.52	1413	0.45
	16-02-10 CC1 F1	83.02	1213	0.36
	16-02-10 CC1 F3	83.76	1223	0.32
	16-02-10 CC1 F4	86.99	706.70	0.54
	16-02-10 CC1 F5	86.52	716.60	0.99
	16-02-10 CC1 F6	85.46	907.80	0.95
	16-02-10 CC1 F7	84.43	926.80	0.44
	16-02-10 CC1 F8	82.37	1170	0.52
	16-02-40 ESL1 F1	84.25	249.10	0.23
	16-02-40 ESL1 F2	84.40	730.50	0.16
	16-02-40 ESL1 F3	83.74	922.30	0.37
	16-02-40 ESL1 F4	86.58	854.90	0.36

La fracción más activa de *A. spicifera* correspondió a la fracción derivada del extracto etanólico: 16-02-40 ESL1 F1 con una IC_{50} de $249.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El resto de las fracciones mantuvieron valores de concentración inhibitoria superiores a $700 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, inclusive, algunas fracciones tienen concentraciones inhibitorias mayores a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, lo que evidencia su baja capacidad inhibitoria. Finalmente, de las cuatro fracciones evaluadas de *S. horridum*, se identificó una mayor actividad en la fracción 16-01-40 CC1 F6 con una IC_{50} de $582.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin embargo, el resto de las fracciones mantiene valores superiores a los $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con valor de IC_{50} máximo de ($1.78 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con la fracción 16-01-40 CC1 F5.

7.4.2 Inhibición enzimática: Tirosinasa

En comparación a los resultados positivos obtenidos en la inhibición de la acetilcolinesterasa, no se identificó inhibición de la enzima tirosinasa en todas las fracciones de las macroalgas evaluadas a una concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabla XI). Por ello, no fue posible establecer los valores de IC_{50} , ya que el porcentaje de inhibición en la mayoría de las fracciones fue inferior al 30%, inclusive, cinco fracciones de *A. spicifera* no presentaron actividad inhibitoria a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Las fracciones con actividad inhibitoria correspondieron a las obtenidas a partir del extracto etanólico de *L. johnstonii*, donde se identificó un porcentaje de inhibición superior al 80% en tres fracciones, por lo cual fue posible establecer la concentración inhibitoria media para cada fracción. La fracción más activa correspondió a 13-02-40 ESL1 F1 CC1 F1 con un valor de $906 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguido de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 con un valor de IC_{50} de $961 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Finalmente, la fracción 13-02-40 ESL1 F1 presentó un valor IC_{50} de $1015 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabla XI. Inhibición de la enzima tirosinasa con fracciones de extractos de las macroalgas *Sargassum horridum*, *Acanthophora spicifera* y *Laurencia johnstonii*. Porcentaje de inhibición calculado con stock de 2 mg·mL⁻¹. (* Calculado con stock de 1 mg·mL⁻¹. IC₅₀, concentración inhibitoria media, E.S, error estándar, - no determinado, n.a, sin actividad inhibitoria).

	Fracción	Inhibición (%)	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	E.S.
<i>Laurencia johnstonii</i>	13-02-40	11.46		0.04
	13-02-40 ESL1 F1	83.37	1015	0.59
	13-02-40 ESL1 F2	34.18	-	1.59
	13-02-40 ESL1 F3	20.55	-	0.30
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F1	81.58*	906	0.40
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F2	31.19	-	0.30
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F3	21.34	-	0.34
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F4	6.69	-	0.25
	13-02-40 ESL1 F1 CC1 F5	17.40	-	0.27
	13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1	87.03	960.90	0.22
	13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F2	24.56	-	0.29
<i>Sargassum horridum</i>	16-01-40	29.10	-	0.53
	16-01-40 CC1 F5	10.20	-	-
	16-01-40 CC1 F6	9.80	-	-
	16-01-40 CC1 F7	8.60	-	-
	16-01-40 CC1 F8	3.00	-	-
<i>Acanthophora spicifera</i>	16-02-10	9.80	-	0.03
	16-02-40	3.48	-	0.19
	16-02-10 CC1 F1	n.a	-	-
	16-02-10 CC1 F3	7.50	-	0.13
	16-02-10 CC1 F4	n.a	-	-
	16-02-10 CC1 F5	n.a	-	-
	16-02-10 CC1 F6	n.a	-	-
	16-02-10 CC1 F7	4	-	0.23
	16-02-10 CC1 F8	n.a	-	-
	16-02-40 ESL1 F1	15.30	-	0.55
	16-02-40 ESL1 F2	20.75	-	0.65
	16-02-40 ESL1 F3	8.55	-	0.38
	16-02-40 ESL1 F4	8.72	-	0.49

En los ensayos de actividad inhibitoria con las enzimas acetilcolinesterasa y tirosinasa se identificó actividad en la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *L. johnstonii*. En ambos ensayos esta fracción presentó porcentajes de mortalidad superiores al 70% y valores de IC₅₀ inferiores a 1 mg·mL⁻¹, lo que sugiere que los compuestos presentes en la fracción podrían tener actividad inhibitoria contra más de una enzima objetivo. Por lo que se seleccionó esta fracción para determinar su inhibición en el ensayo de inhibición de la enzima angiotensina.

7.4.3 Inhibición enzimática: Angiotensina

La fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *Laurencia johnstonii* inhibió la angiotensina (Tabla XII), con un porcentaje de inhibición del 55.23% a una concentración del stock de 2 mg·mL⁻¹ y un valor de concentración inhibitoria media de 890.80 µg·mL⁻¹.

Tabla XII. Inhibición de la enzima angiotensina con la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *Laurencia johnstonii*. Porcentaje de inhibición calculado con stock de 2 mg·mL⁻¹. (IC₅₀, concentración inhibitoria media, E.S, error estándar).

Fracción	% Inhibición	IC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)	E.S.
13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1	55.23	890.80	0.68

7.5 Identificación de la estructura química de los terpenos aislados de *Laurencia johnstonii*

Debido a los resultados positivos en todos los ensayos de actividad biológica y al rendimiento de la fracción, se procedió al análisis de los compuestos presentes en la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *L. johnstonii*. Particularmente, en esta fracción se identificó la formación de cristales blancos, lo que pudiera indicar algún grado de pureza en la muestra, como consecuencia de los procesos de purificación y aislamiento. Por ello, se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplado a masas.

7.5.1 Cromatografía de gases acoplado a masas

En la fracción de *L. johnstonii* denominada 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 se identificaron tres picos correspondientes a compuestos distintos. En el cromatograma (Figura 13) se observó un compuesto mayoritario (86.3%) con un tiempo de retención de 20.56 min. En menor proporción, se identificó un segundo compuesto (9%) con un tiempo de retención de 17.53 min y el tercer compuesto (4.7%) con un tiempo de retención de 18.07 min.

Posteriormente, se analizaron los patrones de fragmentación de cada compuesto, con la finalidad de identificarlos en literatura publicada. El compuesto mayoritario, presentó un RT de 20.56 y una masa molecular de 295.22 g·mol⁻¹. El patrón de fragmentación coincidió con lo reportado para el sesquiterpeno laurinterol (Irie *et al.*, 1990), un terpeno abundante en especies del género. Por ello, se procedió a realizar una purificación del laurinterol y determinar su estructura química mediante resonancia magnética nuclear.

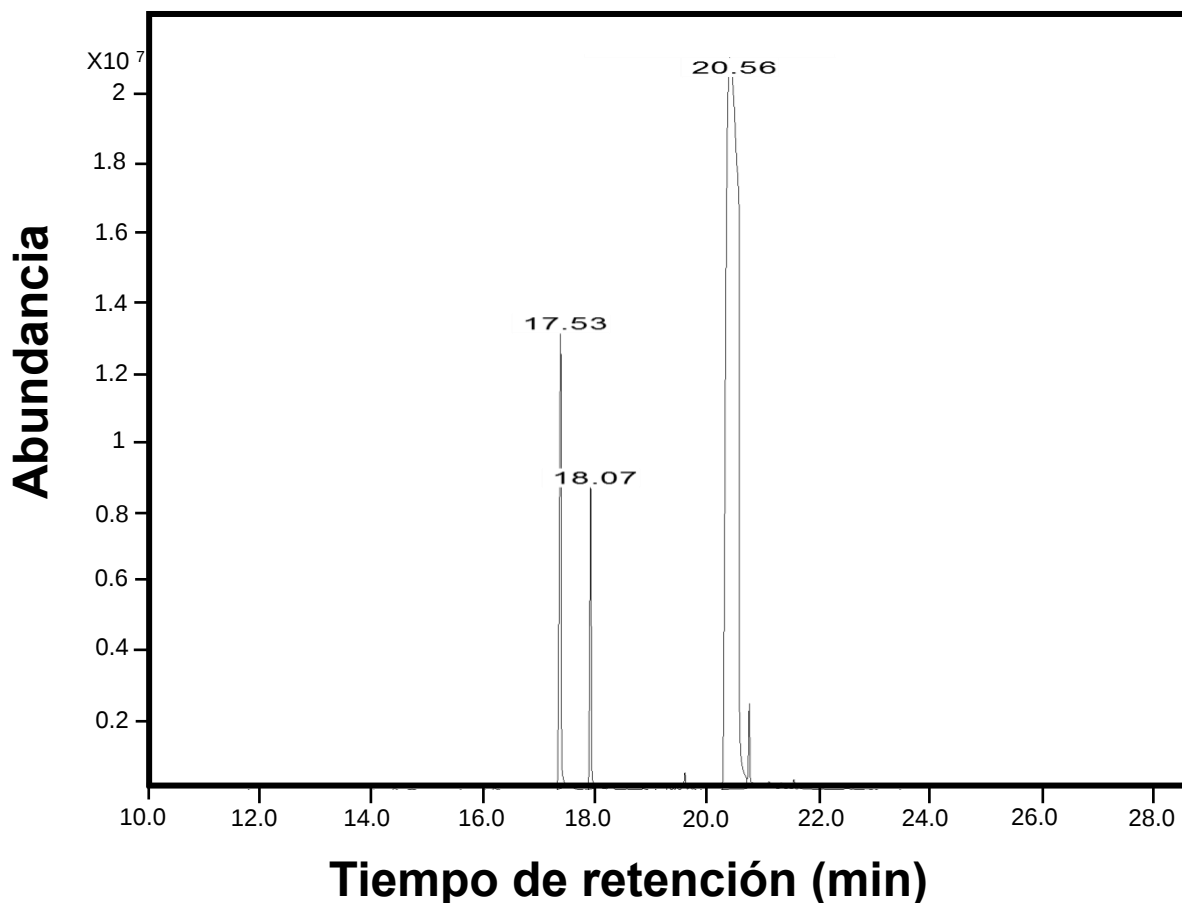


Figura 13. Cromatograma de gases de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *Laurencia johnstonii*.

También se identificó al sesquiterpeno debromolaurinterol con un RT de 17.53 y una masa molecular de 216 g·mol⁻¹. Finalmente, se identificó la presencia de sesquiterpeno isolaurinterol con un RT de 18.07 y una masa molecular de 294 g·mol⁻¹. Los patrones de fragmentación de ambos compuestos coincidieron con lo reportado por Irie *et al.* (1990).

Adicionalmente, se analizaron otras fracciones activas de *L. johnstonii* y con la información obtenida se realizó una base de datos (Tabla XIII), que consistió en la búsqueda de la masa molecular, y patrón de fragmentación de cada cromatograma y se realizaron comparaciones con literatura publicada y bibliotecas gratuitas de GC/MS (Dictionary of Marine Natural Products, PubChem). En algunos casos fue posible identificar a los compuestos (10 sesquiterpenos), sin embargo, las proporciones relativas fueron bajas y por ello no fue posible purificarlos.

Tabla XIII. Análisis de GC/MS de fracciones cromatográficas de *Laurencia johnstonii*. ND; no determinado. (RT, tiempo de retención, MM, masa molecular, - compuesto no identificado).

Fracción	RT (min)	MM (g/mol)	Abundancia relativa (%)	Posible compuesto
13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 CC1 F2	16.33	216	3.015	Debromoisolaurinterol
	18.06	294	3.68	Debromolaurinterol
	19.73	284	3.23	-
	20.56	295	88.76	Laurinterol
	34.02	ND	1.3	-
13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 CC1 F3	17.53	216	8.99	Debromolaurinterol
	18.07	294	4.68	Isolaurinterol
	20.56	295	86.32	Laurinterol
13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 CC1 F4	17.09	230	1.12	-
	17.56	216	16.07	Debromolaurinterol
	18.07	294	3.71	Isolaurinterol
	20.56	295	79.01	Laurinterol
13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 CC1 F6	15.08	204/189	1.82	-
	15.62	216	2.29	Debromolaurinterol
	15.76	216	6.49	Laur-11-en-10-ol
	16.04	200	6.33	-
	16.19	232	2.53	Laur-11-en-1,10-diol
	16.31	220	4.55	-
	16.39	218	4.22	-
	16.44	220	1.26	-
	16.58	232	2.63	Debromoaplysin
	17.04	232	6.59	Debromoaplysinol
	17.81	232	3.31	-
	19.54	310	4.71	-
	19.71	310	3.40	Aplysinol
	20.41	295	17.54	Isoaplysin
	20.50	295	7.07	Laurinterol
	20.88	123	25.26	

En todas las fracciones de *Laurencia* se identificó la presencia de laurinterol y debromolaurinterol (Tabla XIII). En la mayoría de las fracciones el laurinterol fue el sesquiterpeno mayoritario (70-88%), seguido del debromolaurinterol (3-16%). Ambas moléculas tienen estructura similar, a excepción del halógeno de bromo ausente en el debromolaurinterol. Adicionalmente, se logró la identificación de otros sesquiterpenos en menor proporción.

En la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 CC1 F6 se reconocieron 16 señales que posiblemente correspondan a diferentes compuestos, sin embargo, su proporción relativa fue inferior al 7%, lo que dificultaría su aislamiento e identificación mediante RMN. Particularmente, en esta fracción se observó la diversidad de sesquiterpenos halogenados del género *Laurencia*.

7.5.2 Identificación del laurinterol y su actividad biológica

Se identificó al sesquiterpeno laurinterol purificado de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de *L. johnstonii* con un rendimiento de 0.019%. Las señales identificadas en los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H NMR, ^{13}C NMR) correspondieron a lo reportado previamente (Ishii *et al.* 2017).

Laurinterol: (cristal blanco), $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{BrO}$, m/z 295.22 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.60, 6.61, 5.11, 2.29, 2.08, 1.95, 1.66, 1.42, 1.32, 1.28, 1.15, 0.59, 0.55, ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 153.27, 136.00, 134.02, 132.38, 118.87, 114.97, 77.33, 77.02, 76.70, 48.04, 35.98, 29.63, 25.31, 24.43, 23.56, 22.21, 18.63, 16.23

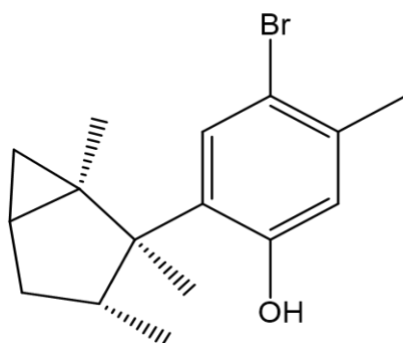


Figura 14. Sesquiterpeno laurinterol aislado de *Laurencia johnstonii* (Realizado con ChemDraw, 2019)

Respecto a su actividad biológica (Tabla XIV), se evaluó la inhibición enzimática del laurinterol contra las enzimas objetivo: acetilcolinesterasa, tirosinasa y angiotensina. Se identificó inhibición en las tres enzimas, sin embargo, se estableció un valor IC_{50} menor ($590 \pm 0.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) en el ensayo con la acetilcolinesterasa, lo que indica una mayor actividad inhibitoria sobre esta enzima en particular.

Tabla XIV. Actividad biológica del laurinterol aislado de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 de la macroalga *L. johnstonii* (**Resultado de la fracción).

Compuesto	Laurinterol
Clasificación	Sesquiterpeno
Fuente	<i>Laurencia johnstonii</i>
Lugar y fecha de recolecta	Punta Coyote, B.C.S, México. Abril, 2013
Rendimiento	0.019%
Inhibición enzimática (IC₅₀)	
Acetilcolinesterasa	590 ± 0.43 µg·mL ⁻¹
Tirosinasa	1410 ± 0.27 µg·mL ⁻¹
Angiotensina	890.8. ± 0.68 µg·mL ⁻¹
Actividad Insecticida** (LD₅₀)	
<i>Aedes aegypti</i>	240 ± 0.73 µg·mL ⁻¹

8. DISCUSIÓN

Las macroalgas tienen diversas aplicaciones en la agricultura: fertilizantes, bioestimulantes, fungicidas, antibacterianos, antivirales, nematocidas e insecticidas (Hamed *et al.*, 2018). Respecto a los insecticidas, el control se enfoca en dos grandes problemáticas; plagas agrícolas que interfieren en la disponibilidad de alimentos y el control de insectos vectores de enfermedades humanas. Sin embargo, el descubrimiento y desarrollo de insecticidas a partir de productos naturales de macroalgas ha sido lento, a pesar del gran potencial identificado en extractos orgánicos, aún no existe una base de datos que refleje la diversidad química del medio marino.

Hasta el momento, sólo se han identificado 14 compuestos de macroalgas con actividad insecticida; cuatro sesquiterpenos y cuatro acetogeninas del género *Laurencia*, cuatro monoterpenos del género *Plocamium*, y dos alcaloides del género *Caulerpa*. En este trabajo se identificó el sesquiterpeno laurinterol aislado de *Laurencia johnstonii* recolectada en Punta Coyote, Baja California Sur y es el primer registro de la actividad insecticida contra larvas del mosquito *Aedes aegypti* ($DL_{50}= 240 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Anteriormente, este compuesto fue aislado de *Laurencia nidifica* y se evaluó su actividad insecticida en gorgojos del maíz ($DL_{50}= 2.20 \mu\text{g}/\text{insecto}$) (Ishii *et al.*, 2017). Aunque estos datos no son comparables debido a la forma de aplicación del extracto en cada ensayo, se puede identificar la actividad insecticida del laurinterol sobre distintas plagas de insectos.

Respecto a la actividad insecticida de las macroalgas *Sargassum horridum*, y *Acanthophora spicifera* se identificaron valores de dosis letal media altos, lo que indicó una menor actividad insecticida en comparación con *L. johnstonii*. Pero independientemente de los valores de obtenidos, se observó un efecto insecticida a las 24 horas de exposición en la fracción 16-01-40 CC1 F5 ($DL_{50}= 1360 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

de *S. horridum*. Particularmente, especies del género *Sargassum* han sido evaluadas en ensayos previos con larvas de *Ae. Aegypti*, el extracto etanol:agua de *S. myriocystum* ha sido el más efectivo en el IV estadio ($DL_{50}= 0.086 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ali *et al.*, 2013), asimismo, en diferentes estudios con el extracto metanólico de la especie *S. wightii* es activo contra larvas del III estadio: ($DL_{50}= 97.28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Manilal *et al.*, 2011a), ($DL_{50}= 154.71 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Achary *et al.*, 2014). Es notoria la diferencia entre los de dosis letal media obtenidos y los reportados por diversos autores. Sin embargo, estas variaciones entre especies del mismo género puede atribuirse a factores geográficos y ecológicos, ya que estos tienen un efecto directo sobre la síntesis de los metabolitos secundarios (Yu *et al.*, 2015).

Adicionalmente, en este trabajo se utilizó hexano y etanol para la extracción de terpenos, contrario a los solventes de mayor polaridad utilizados en otros estudios, lo que indica una diferencia en la composición química de las fracciones (Tiwari *et al.*, 2011). y consecuentemente, variaciones en su actividad insecticida. Un ejemplo de ello son las saponinas, Achary y colaboradores (2014) atribuyen la actividad insecticida de *S. wightii* a la presencia de saponinas esteroidales en todos sus extractos evaluados, estos compuestos son extraídos fácilmente con metanol y agua. Particularmente, este grupo de metabolitos secundarios es conocido por su actividad insecticida contra diversas plagas de insectos (Chaieb, 2010).

En el caso de *Acanthophora spicifera*, se identificó actividad insecticida en las fracciones: 16-02-10 CC1 F3 ($DL_{50}= 770 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 16-02-40 ESL1 F2 ($DL_{50}= 780 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 16-02-40 ESL1 F4 ($DL_{50}= 1230 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a pesar de que estos valores obtenidos indican una baja actividad, se observó mortalidad del 100% en algunas fracciones evaluadas a la mayor concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta información, contrasta los datos obtenidos con un extracto etanólico de *A. spicifera* recolectada en la costa de la India, donde no se indetificó mortalidad de larvas de *Ae. eegypti* en ninguna conentración evaluada por los autores (Ravikumar *et al.*, 2011).

Además de la evaluación de la actividad insecticida, en este trabajo se considero la inhibición de enzimas como mecanismo de acción. Derivado de los problemas asociados al uso indiscriminado y desarrollo de resistencia de plaguicidas químicos, la industria de plaguicidas se ha enfocado en la búsqueda de nuevos sitios de acción y descubrir compuestos que inhiban solo un sitio o diana en específico, con la finalidad de disminuir o evitar una resistencia cruzada (Horowitz & Ishaaya, 2004). Inclusive, el proceso de registro de un plaguicida que posee solo un sitio de acción conocido es más sencillo. No obstante, la evolución de la resistencia a insecticidas desde una perspectiva epidemiológica, identifica a los plaguicidas con múltiples sitios de acción como los más adecuados para evitar o prolongar el desarrollo de resistencia (Gressel, 2019).

Existen muchas publicaciones científicas que enlistan productos naturales con actividad plaguicida y la mayoría de sus sitios de acción aún son desconocidos (Yu *et al.*, 2014). Estos estudios reconocen la utilidad de inhibidores con múltiples sitios de acción como parte de las estrategias de manejo de la resistencia. Por ello, la búsqueda de productos naturales insecticidas debería estar enfocada en compuestos multi-inhibidores (multi-target), donde los ensayos bioprospectivos de inhibición enzimática *in vitro* tienen un papel fundamental para su desarrollo. Los productos naturales tienen múltiples aplicaciones, y no es extraño encontrar un compuesto químico con más de una actividad biológica, con múltiples sitios de inhibición, cuya actividad ha persistido por muchos años sin presentar señales de resistencia evolutiva (Gressel, 2019). Tal es el caso de muchos compuestos marinos, específicamente, el sesquiterpeno laurinterol, que ha sido aislado de varias especies del género *Laurencia*.

En un estudio realizado con *L. nidifica* se evaluó la inhibición enzimática del laurinterol, específicamente, se considero a la acetilcolinesterasa ($IC_{50} = 46.85 \mu g \cdot mL^{-1}$) como posible mecanismo de acción insecticida. En comparación con los

resultados de inhibición enzimática obtenidos, el valor de IC_{50} fue superior a lo reportado, sin embargo, estas diferencias pudieran relacionarse a cambios metodológicos, ya que la acetilcolinesterasa evaluada en el estudio de Ishii y colaboradores (2017) fue obtenida a partir de un macerado de termitas, contrario a la enzima evaluada en este estudio cuya fuente es de una anguila eléctrica. Por lo cual, sería conveniente evaluar la inhibición enzimática a partir de una fuente similar para tener una comparación adecuada.

En este trabajo se identificó la actividad biológica del laurinterol: insecticida e inhibición enzimática de tres enzimas objetivo; acetilcolinesterasa ($IC_{50}= 590 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), tirosinasa ($IC_{50}= 1410 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y angiotensina ($IC_{50}= 890.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), por ello se considera al sesquiterpeno laurinterol un compuesto multi-inhibidor, cuyo mecanismo de acción insecticida es la inhibición de múltiples enzimas involucradas en distintos procesos fisiológicos del insecto.

No obstante, también es necesario analizar los posibles efectos sinérgicos. De manera general, con el laurinterol se identificaron valores IC_{50} más altos en comparación con los obtenidos con su fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1; ($IC_{50}=201.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), tirosinasa ($IC_{50}=960.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y angiotensina ($IC_{50}=890.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta fracción, además de presentar laurinterol (86.3%), también se identificó en menor concentración debromolaurinterol (9.0%) e isolaurinterol (4.7%). A pesar de encontrarse en menor proporción, es posible que la presencia e interacción entre los tres sesquiterpenos contribuyeron a que el efecto multi-inhibitorio de la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 fuera superior al compuesto puro.

Este efecto sinérgico ha sido previamente reportado por diversos autores, inclusive se consideran mezclas de compuestos que logren afectar a más de un sitio de

acción. En un estudio (Kumar *et al.*, 2012) se evaluó el efecto combinado de extractos orgánicos de la macroalga *Sargassum wightii* y la bacteria *Bacillus thuringiensis*, la cual produce toxinas con actividad insecticida; se identificó una mayor mortalidad de larvas del mosquito *Anopheles sundaicus* cuando se aplicó el tratamiento que contenía la mezcla de toxinas de la bacteria y los compuestos químicos presentes en el extracto metanólico de la macroalga. Además, se observó mortalidad en adultos y una inhibición en el crecimiento y desarrollo de las pupas. Los autores concluyen que los plaguicidas que poseen una mezcla de toxinas/compuestos funcionalmente diversos ejercen un mayor efecto que solo uno y el uso de mezclas ayudarían a disminuir o ralentizar la resistencia en los insectos. Esto también ha sido comprobado en un bioensayo realizado con el áfido *Myzus persicae*, donde se aplicó el compuesto activo azadiractina y extracto orgánico de plantas de neem que contenía la misma concentración del compuesto activo azadiractina. Se encontró que los insectos tratados con el compuesto activo desarrollaron resistencia en generaciones posteriores, caso contrario a los insectos tratados con el extracto de neem, los cuales no mostraron indicios de resistencia (Feng & Isman, 1995).

Otro aspecto para considerar en los compuestos marinos es la presencia de halógenos característicos del género *Laurencia* (Harizani *et al.*, 2016). En gran medida la ausencia/presencia y número de halógenos determinarán la actividad biológica. Por ejemplo, el laurinterol y elatol tienen estructuras químicas similares, ambos poseen un halógeno de bromo, por otro lado, el sesquiterpeno obtusol posee dos halógenos de bromo, esta “pequeña” diferencia le confiere mayor actividad insecticida al compuesto. Salvador-Neto *et al.* (2016) evaluaron la mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* y establecieron una DL_{50} para ambos sesquiterpenos: elatol ($DL_{50}= 10.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y obtusol ($DL_{50}= 3.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), donde el obtusol presentó la mayor mortalidad a una menor concentración. Estos resultados coinciden con lo observado en la fracción 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1 que contiene dos compuestos

bromados: laurinterol e isolaurinterol, posiblemente, el aumento en el número de bromos de la fracción, aumentó su efectividad.

Por otro lado, los ensayos de inhibición enzimática son una herramienta de búsqueda de compuestos potencialmente insecticidas. Con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* se logró una selección de las fracciones activas y la eventual identificación del compuesto multi-inhibitorio. Respecto a la tirosinasa, pocas fracciones lograron la concentración inhibitoria media y solo se identificaron tres fracciones de *Laurencia*, con valores de IC₅₀ superiores a los 900 µg·mL⁻¹. Una alternativa a considerar para tener una inhibición más efectiva de la tirosinasa, sería evaluar otro grupo de compuestos, los florotaninos, los cuales son abundantes en macroalgas pardas del género *Ecklonia* y *Sargassum*. En estudios independientes con enfoques médicos, se ha evaluado la inhibición enzimática de los florotaninos eckol y dieckol con la tirosinasa (Kang *et al.*, 2004) angiotensina (Jung *et al.*, 2006) y acetilcolinesterasa (Kannan *et al.*, 2013). Ambos compuestos inhiben de manera eficiente las enzimas objetivo, lo que podría convertirlos en candidatos para un bioensayo con larvas de mosquitos.

Otra opción viable, sería considerar nuevas enzimas objetivo, con la finalidad de encontrar más compuestos multi-target. En el caso de plagas agrícolas, se podrían considerar enzimas digestivas (proteasas y α-amilasas) que interfieran sobre la alimentación (Rocha-Estrada y García-Carreño, 2008) o inhibidores de la síntesis de quitina que interfieran en el desarrollo de la cutícula (Retnakaran & Wright, 1987).

Finalmente, la disponibilidad de macroalgas y producción a mayor escala representa un gran obstáculo para el desarrollo de insecticidas derivados de productos naturales. Una alternativa es la síntesis química, mediante la modificación

de moléculas y rutas metabólicas, o el empleo de las estructuras químicas con la finalidad de sintetizar moléculas similares que conserven la actividad (Llewellyn & Burnell, 2000). Sin embargo, es necesario evaluar de manera independiente a cada insecto objetivo, ya que se podría obtener un mejor efecto insecticida con fracciones cuyos compuestos podrían tener un efecto sinérgico significativo y menor tiempo y costo de producción.

El mecanismo de inhibición enzimática puede ser un método dirigido a investigaciones de bioprospección, donde se logre la identificación de compuestos inhibidores de enzimas involucradas en procesos catalíticos específicos de los insectos. Los productos naturales de macroalgas, particularmente, a partir del género *Laurencia*, representan una fuente de compuestos químicos con actividad insecticida, cuya multi-inhibición enzimática podría ser la clave para prolongar el desarrollo de la resistencia, y con ello obtener alternativas biorracionales más seguras y efectivas para el control de insectos.

9. CONCLUSIONES

Se identificó la actividad insecticida en fracciones de las tres especies de macroalgas evaluadas contra larvas de *Aedes aegypti* cepa Nueva Orleans. El mayor porcentaje de mortalidad y valores de dosis letales medias inferiores correspondieron a la fracción activa de *Laurencia johnstonii* 13-02-40 ESL1 F2 ESL2 F1. Asimismo, esta fracción mostró un mayor porcentaje de inhibición con las enzimas objetivo. Se identificaron tres sesquiterpenos, de los cuales el laurinterol fue el compuesto mayoritario. Adicionalmente, se evaluó la actividad inhibitoria del laurinterol contra las tres enzimas objetivo (acetilcolinesterasa, tirosinasa y angiotensina) y se identificó un efecto multi-inhibitorio. Lo que indicaría un mecanismo de acción enzimático.

Respecto a *Sargassum horridum* y *Acanthopora spicifera*, se identificó actividad insecticida en al menos una fracción evaluada, aunque los valores de dosis letal media fueron considerados altos en comparación con *L. johnstonii*, posiblemente, la actividad insecticida aumente si se continua con el aislamiento de los compuestos activos.

Los ensayos de inhibición de enzimas clave para el control de insectos resultaron adecuados para la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas. Particularmente, las fracciones terpénicas de las macroalgas mostraron una mayor actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa y en menor proporción a la tirosinasa, sin embargo, dada la diversidad química de las macroalgas, posiblemente, otros compuestos halogenados tendrán potencial para el desarrollo de nuevos plaguicidas.

10. RECOMENDACIONES

Es necesario establecer la dosis letal media del laurinterol en bioensayos con mortalidad de larvas. Adicionalmente, evaluar el compuesto y/o fracción sobre otras cepas susceptibles y resistentes del mosquito *Aedes aegypti*. Asimismo, evaluar un posible efecto repelente en bioensayos con adultos.

Para futuros trabajos, se sugiere una búsqueda dirigida de compuestos o fracciones que presenten un mayor número de grupos halogenados, específicamente bromo, lo cual le confiere una mayor actividad insecticida contra *Aedes aegypti*.

Respecto al ensayo bioprospectivo de inhibición enzimática, es recomendable utilizar formas enzimáticas aisladas o derivadas de insectos. Con la finalidad de obtener una concentración inhibitoria media adecuada para el organismo objetivo.

Adicionalmente, se sugiere la evaluación de otros compuestos (florotaninos) con potencial insecticida; eckol, dieckol y Phlorofucofuroeckol-A. Dada su actividad inhibitoria sobre enzimas objetivo de insectos, cuyo mecanismo multi-inhibitorio representa una alternativa para el desarrollo de plaguicidas biorracionales.

11. LITERATURA CITADA

- Abou-Elnaga, Z.S., W.M. Alarif & S.S. Al-lihaibis. 2011. New larvicidal acetogenin from the red alga *Laurencia papillosa*. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 39(8):787-794.
- Achary, A., Muthalagu, K., & M. Saravaana Guru. 2014. Identification of phytochemicals from *Sargassum wightii* against *Aedes aegypti*. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 29(1):314-319.
- Ahmad, I., A. Yanuar, K. Mulia, & A. Mun'im. 2017. Review of angiotensin-converting enzyme inhibitory assay: rapid method in drug discovery of herbal plants. *Pharmacogn Rev*, 11(21):1-7.
- Alarif, W.M, Z.S Abou-Elnaga, S.N. Ayyad & S. Al-lihaib. 2010. Insecticidal metabolites from the green alga *Caulerpa racemosa*. *CLEAN – Soil, Air, Water* 38(5-6):548-557.
- Ali, M.S., S. Ravikumar & J.M. Beula. 2013. Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pac J Trop Dis*, 3(3):196-201.
- Argadoña, V., T. Del Pozo., A. San-Martín & J. Rovirosa. 2000. Insecticidal activity of *Plocamium cartilagineum* monoterpenes. *Bol Soc Chi. Qui.*, 45(3):371-376.
- Asha, A., Rath, M., Raja, D.P. & K. Sahayaraj. 2012. Biocidal activity of two marine green algal extracts against third instar nymph of *Dysdercus cingulatus* (Fab.) (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *J Biopest*, 2 (Supp):129-134.
- Bantoto, V. & D. Dy. 2013. The larvicidal activity of brown algae *Padina minor* (Yamada 1925) and *Dictyota linearis* (Greville 1830) against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn 1762) (Diptera: Culicidae). *J Vector Borne Dis*, 50: 68-70.
- Benítez-Leite, R.S. 2012. Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: Un estado del arte. *Serpaj Py*, 17: 98.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. W.H. Freeman. New York, E.U.A. 1050 p.

- Beula, J., Ravikumar, S., & M.S. Ali. 2011. Mosquito larvicidal efficacy of seaweed extracts against dengue vector of *Aedes aegypti*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(2) (Supp): S143–S146.
- Bianco, E.M., Pires, L., Santos, G.K.N., Dutra, K.A., Reis, T.N.V., Vasconcelos, E., Cocentino, A. & D. Navarro. 2013. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Ind Crops Prod*, 43:270-275.
- Cabanes, J., García-Carmona, F., García-Cánovas, F. & J.A. Lozano. 1982. Discusión y mejora del método espectrofotométrico de medida de la oxidación de L-tirosina por tirosinasa. *Anales de la Universidad de Murcia*, 371-380.
- Cabrita, M.T., Vale, C. & A.P. Rauter. 2010. Halogenated compounds from marine algae. *Mar Drugs*, 8(8):2301-2317.
- Cardellina, J. 1986. Marine natural products as leads to new pharmaceutical and agrochemical agents. *Pure & Appl. Chem*, 58(3):365-374.
- Chaieb, I. 2010. Saponins as insecticides: a review. *Tunis J Plant Prot.*, 5:39-50.
- Cetin, H., Gokoglu, M. & E. Oz. 2010. Larvicidal activity of the extract of seaweed *Caulerpa scalpelliformis*, against *Culex pipiens*. *J Am Mosq Control Assoc*, 26(4):433-435.
- Cha, S.H., Ko, S.C., Kim, D. & Y.J. Jeon. 2011. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: Those inhibitors reduced tyrosinase activity and lemanin synthesis in zebrafish. *J Dermatol*, 38(4):354-363.
- Chang, T.S. 2009. An update review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*, 10:2440-2475.
- ChemDraw, 2019. Perkin Elmer informatics.
- Cromartie, T.H. 1986. The inhibition of enzymes by drugs and pesticides. *J Chem Educ*, 63(9):765-768.
- Crombie, L. 1990. Natural models for the design of insect control compounds: the mammeins. 23-51, En: Crombie, L & T. Saito (Eds.). Recent advances in the Chemistry of insect control II. The Royal Society of Chemistry, Special publication 79, Cambridge, Inglaterra.

- Desoti, V., Lazarin-Bidóia, D., Sudatti, D.B., Pereira, R.C-, Alonso, A., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.D., Nakamura, C.V. & S. Silva. 2012. Trypanocidal action of (-)-Elatol involves an oxidativa stress triggered by mitochondria dysfunction. *Mar Drugs*, 10:1631-1646.
- Devine, G., Eza D., Ogusuku, E & M. J. Furlong. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 25(1):74-100.
- El Sayed, K., Dunbar, D.C., Bartyzel, P., Zjawiony, J.K., Day, W. & M. Hamann. 2000. Marine natural products as leads to develop new drugs and insecticides. 232-252, En: Cutler, S. & H. Cutler (Eds.). *Biologically active natural products: Pharmaceuticals*. New York, EUA, CRC Press.
- El-Wakeil, N. 2013. Botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen*, 65:125-149.
- Ellman, G., K.D Courtney, Andres V & R. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7(2):88-95.
- Feng, R & M.B. Isman. 1995. Selection for resistance to azadirachtin in the greenpeach aphid *Myzus persicae*. *Experientia*, 51:831-833.
- Fenical, W. 1997. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends in Biotechnology*, 15:338-341.
- Finney, D.J. 1964. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University. 333 p.
- Fukuzawa, A. & T. Masamune. 1981. Laurepinnacin and isolaurepinnacin: new acetylenic cyclic ethers from the marine alga *Laurencia pinnata* Yamada. *Tetrahedron Lett*, 22:4081-4084.
- Galindo, J.D & F.A. Bernabeu, 1984. Estabilización de un intermediario de la ruta biosintética e las melaninas, el dopacromo. *Anales de la Universidad de Murcia*, 51-72.
- Georghiou, G.P. 1983. Management of resistance in arthropods. 769-792, En: Georghiou, G.P & T. Saito (Eds.). *Pest resistance to pesticides*. Plenum Press, New York, E.U.A.

- Ghannadi, A., Plubrukarn, A., Zandi, K., Sartavi, K. & A. Yegdaneh. 2013. Screening for antimalarial and acetylcholinesterase inhibitory activities of some Iranian seaweeds. *Res Pharm Sci*, 8(2):113-118.
- Ghosal, A. 2018. Mode of action of insecticides. 01-17. En: Chandel, B.S. (Ed.). Applied entomology and zoology. Volume 1. Akinik Publications. New Delhi.
- Gómez-García, G.F. 2018. *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Dipera: Culicidae) y su importancia en salud humana. *Rev. Cubana Med Trop*, 70(1):55-70.
- GraphPad, 2019. Prism version 8.00 for Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com".
- Gross, K. & J. Rosenheim. 2011. Quantify secondary pest outbreaks in cotton and their monetary cost with causal-interference statistics. *Ecol Appl*, 21(7):2770-2780.
- Guerrero, A. & G. Rosell. 2005. Biorational approaches for insect control by enzymatic inhibition. *Curr med chem*, 12: 461-469.
- Hamed, S.M., A.A. Abd El-Rhman, N. Abdel-Raouf, & I. Ibraheem. 2018. Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *J. Basic Appl Sci*, 7:104-110.
- Hames, D., & N. Hooper. 2014. *Bios, notas instantáneas de bioquímica*. Mc Graw Hill, Ciudad de México, México. 374 p.
- Hara, A.H. 2000. *Finding alternative ways to control alien pests - part 2: New insecticides introduced to fight old pests*. *Hawaii Landscape* 4(1):5.
- Harizani, H., Ioannou, E. & V. Roussis. 2016. The *Laurencia* paradox: an endless source of chemodiversity. 91-252, En: Kinghorn, A.D, Falk, H., Gibbons, S. & J. Kobayashi (Eds.). Progress in the chemistry of organic natural products, Volume 102. Springer, Switzerland.
- Harwood Jr, H.J. 2004. Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs*, 5(3):283-289.
- Horowitz, A.R & I. Ishaaya. 2004. Biorational insecticides - Mechanisms, selectivity and importance in pest management. 1-28, En: Horowitz, A.R. & I. Ishaaya (Eds.). *Insect Pest Management - Field and Protected crops*. Springer, Berlin, Heidelberg.

- Hutchinson, M. & E. Fazzini. 1996. Cholinesterase inhibition in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61(3):324-325.
- IBM, Corp, 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 25.0. Armonk, NY.
- Insecticide Resistance Action Committee. 2020. IRAC Mode of action classification scheme. <https://www.irac-online.org>
- Ishii, T., Nagamine, T., Nguyen, B.C.Q. & S. Tawata. 2017. Insecticidal and repellent activities of Laurinterol from the Okinawa red alga *Laurencia nidifica*. *Rec Nat Prod*, 11(1):63-68.
- Jiménez-Díaz, M. & V. Martínez-Monge. 2000. Validación de la determinación de la acetilolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm. *Rev Biomed*, 11:161-168.
- Jimsheena, V.K. & L. Gowda. 2009. Colorimetric, High-throughput assay for screening angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Anal Chem*, 81:9388-9394.
- Jung, H.A., Hyun, S.K., Kim, H.R. & J.S. Choi. 2006. Angiotensin-converting enzyme I inhibitory activity of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish Sci*, 72:1292-1299.
- Kang, H., Kim, H., Byun, D.S., Son, B.W., Nam, T.J., & J.S. Choi. 2004. Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch Pharm Res*, 27(12):1226-1232.
- Kannan, R., Aderogba, M., Ndhlala, A., Stirk, W.A. & J. Van Staden. 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity of phlorotannins isolated from the brown alga, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Res Int*, 54(1):1250-1254.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. 2019. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1102–D1109
- Kim, K.T., Rioux, L.E. & S.L. Turgeon. 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98:27-33.

- Kumar, K.P., Murugan, K., Kovendan, K., Kumar, A.N., Hwang, J. & D.R. Barnard. 2012. Combined effect of seaweed (*Sargassum wightii*) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the coastal mosquito, *Anopheles sundanicus*, in Tamil Nadu, India. *ScienceAsia*, 38:142-146.
- Lakshmana, S.S., Kumar, V., Geetharamani, D., Suja, G., Yesudas, R. & A. Chacko. 2015. Fucoidan - An α -amylase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to NIDDM. *Int J Biol Macromol*, 81:644-647.
- Llewellyn, L. & J. Burnell. 2000. Marine organisms as sources of C4-weed-specific herbicides. *Pesticide outlook*, 2(11):64-67.
- Manilal, A., Thajuddin, N., Selvin, J., Idhayadhulla, A., Kumar, R.S. & S. Sujith. 2011a. *In vitro* mosquito larvicidal activity of marine algae against the human vectors, *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera:Culicidae). *Int J of Zool Res*, 7(3):272-278.
- Manilal, A., Sujith, S., Sabarathnam, B., Kiran, G., Selvin, J., Shakir, C. & A. Lipton. 2011b. Biological activity of the red alga *Laurencia brandenii*. *Acta Bot Croat*, 70(1):81-90.
- McChesney, J.D. 2000. Commercialization of plant-derived natural products as pharmaceuticals: A view from the trenches. 253-264, En: Cutler, S. & H. Cutler (Eds.). *Biologically active natural products: Pharmaceuticals*. New York, EUA, CRC Press.
- McGleenon, B.M., Dynan, K.B. & A.P. Passmore. 1999. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*, 48(4):471-480.
- McKee, T. & J. McKee. 2003. *Bioquímica: la base molecular de la vida*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España. 773 p.
- Miyazawa, M. & N. Tamura. 2007. Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biol. Pharm. Bull*, 30(3) 595-597.
- Momtaz, S., Lall, N. & A. Basson. 2008. Inhibitory activities of mushroom tyrosine and DOPA oxidation by plant extracts. *S Afr J Bot*, 74(4):577-582.

- Montesino-Valdés, M., López-Flores, H., Hernández-Abreu, J. & E. Zayas-Izaguirre. 2009. Insecticidas botánicos como alternativas para el manejo de plagas en sistemas agroforestales. *Agricultura orgánica*, 1:24-26.
- Nelson, D.L., & M. Cox. 2009. *Lehninger Principios de bioquímica*. Omega, Barcelona, España. 1296 p.
- Ondetti, M.A., Rubin, B. & D.W. Cushman. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196(4288):441-444.
- Ortíz-Ruíz, C.V. 2016. Análisis y discriminación entre sustratos e inhibidores de tirosinasa. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 216 pp.
- Pang, Y. 2006. Novel acetylcholinesterase target site for malaria mosquito control. *PLoS ONE*, 1(58):1-8.
- Peters, T.L., J. Tillotson J., Yeomans A.M., Wilmore, S., Lemm, E., Jiménez-Romero, C., Amador, L.A., Li, L., Amin, A.D., Pongtornpipat, P., Zerio, C.J., Ambrose, A.J., Paine-Murrieta, G., Greninger, P., Vega, F., Benes, C.H., Packham, G., Rodríguez, A.D., Chapman E. & J.H. Schatz. 2018. Target-Based Screening against eIF4A1 reveals the Marine Natural Product Elatol as a Novel Inhibitor of Translation Initiation with *In Vivo* Antitumor Activity. *Clin Cancer Res*, 24(17):4256-4270.
- Petroski, R.J. & D.W. Stanley. 2009. Natural compounds for pest and weed control. *J Agric Food Chem*, 57:8171-8179.
- Plataforma de Información en Salud de las Américas (PLISA). 2019. Datos reportados por los Ministerios de Salud de los Países. Número de casos de la enfermedad del virus del Zika, casos acumulados. Disponible: http://www.paho.org/data/index.php/es/?option=com_content&view=article&id=528&Itemid=
- Poonguzhali, T.V., & J.L. Nisha. 2012. Larvicidal activity of two seaweeds, *Ulva fasciata* and *Grateloupiaa lithophila* against mosquito vector, *Culex quinquefasciatus*. *Int J Curr Sci*, 4:163-168.

- Posser, T., Pereira, B.K., Zemolin, A.P.P., Belo, C.A.D., Pereira, A.B. & J.L. Franco. 2010. Insecticidal effects of Antarctic Algae *Prasiola crispa* extract in the adult fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Annual Activity Report*, 73-77.
- Ravikumar, S., Ali, M.S. & J.M. Beula. 2011. Mosquito larvicidal efficacy of seaweed extracts against dengue vector of *Aedes aegypti*. *Asian Pac J Trop Biomed*, S143-S146.
- Rengasamy, K.R.R., Kulkarnim M.G., Stirk, W.A., & J.V. Staden. 2014. Advances in algal drug research with emphasis on enzyme inhibitors. *Biotechnol Adv*, 32:1364-1381.
- Retnakaran, A. & J. E. Wright. 1987. Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. 205-282, En: *Chitin and benzoylphenyl ureas*. Wright, J. E. y A. Itetnakaran (Eds.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Rhee, K., Van Rijin, R.M., & R. Verpoorte. 2003. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem Anal*, 14(3):127-131.
- Rocha-Estrada, J. & F. García-Carreño. 2008. Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: avances en el entendimiento de su mecanismo de acción. *BioTecnología*, 12(1):50-62.
- Sahayaraj, K. & S. Kalidas. 2011. Evaluation of nymphicidal and ovicidal effect of a seaweed, *Padina pavonica* (Linn.) (Phaeophyceae) on cotton pest, *Dysdercus cingulatus* (Fab.). *IJMS*, 40(1):125-129.
- Sahayaraj, K. & Y. Jeeva. 2012. Nymphicidal and ovipositional efficacy of seaweed *Sargassum tenerrimum* (J. Agardh) against *Dysdercus cingulatus* (Fab.) (Pyrrhocoridae). *Chilean J. Agric*, 72(1):152-156.
- Salvador-Neto, O., Azevedo-Gomes, S., Ribeiro-Soares, A., Silva-Machado, F.L., Samuels, R.I., Nunes na Fonseca, R., Souza-Menezes, J., Cunha-Moares, J.L., Campos, E., Borges-Mury, F. & J. R. Silva. 2016. Larvicidal potential of the halogenated sesquiterpene (+)-Obtusol, isolated from the alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodomelaceae), against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera:Culicidae). *Mar Drugs*, 14(20):1-14.

- Siegfried, B.D. & S.C. Scott. 1990. Biochemical characterization of hydrolytic and oxidative enzyme in insecticide resistant and susceptible strain of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol*, 85, 1092–1098.
- Silva G., Lagunes A., Rodríguez, J.C & D. Rodríguez. 2002. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 66:4-12.
- Stenersen, J. 2004. *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC Press, Florida, E.U.A. 296 p.
- Thacker, J.R.M. 2002. *An introduction to arthropod pest control*. Cambridge University Press, U.K. 343 p.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. & H. Kaur. 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *IPS*, 1(1):99-106.
- Tundis, R., Loizzo, M.R. & F. Menichini. 2010. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*, 10(4):315-331.
- Vargas-Bernal, R., Rodríguez-Miranda, E. & G. Herrera-Pérez. 2012. Evolution and expectations of enzymatic biosensors for pesticides. 329-356, En: Soundararajan, R.P. (Ed.). *Pesticides- Advances in chemical and botanical pesticides*. IntechOpen, London.
- Veiga-Santos, P., Pelizzaro-Rocha K.J., Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Silva, S.O., Sudatti, D.B., Bianco, E.M., Pereira, R.C. & C.V. Nakamura. 2010. *In vitro* anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology*, 137:1661-1670.
- Watanabe, K., Miyakado, M., Ohno, N., Okada, A., Yanagi, K., & K. Moriguchi. 1989. A polyhalogenated insecticidal monoterpene from the red alga, *Plocamium telfairiae*. *Phytochemistry*, 28(1):77-78.
- Watanabe, K., Umeda, K., Kurita, Y., Takayama, C. & M. Miyakado. 1990. Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A from the red alga *Plocamium telfairiae*: Structure elucidation, biological activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. *Pestic Biochem Physiol*, 37(3):275-286

- Wiesner, J., Z. Kriz, K. Kuca, D. Jun & J. Koca. 2007. Acetylcholinesterases—the structural similarities and differences. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 22(4): 417-424.
- Wijesinghe, W.A., Seok-Chun, K. & J. You-Jin. 2011. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Nutr Res Pract*, 5(2):93-100.
- Wilson, B. 2001. Cholinesterases. 967-985. En: Krieger, R. & W.C. Krieger. Handbook of pesticide toxicology. Second edition. Academic Press. USA.
- World Health Organization. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larval to insecticides. Geneva, Suiza. 807 p.
- World Health Organization. 1998. The world health report 1990- Life in the 21 st century, a vision for all. WHO, Geneva, Switzerland. 232 p.
- Yoon, N.Y., Chung, H.Y., Kim, H.R., & J.S. Choi. 2008. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of serols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries science*, 74:200-207.
- Yu, K. X., Jantan, I., Ahmad, R., & Wong, C. L. 2014. The major bioactive components of seaweeds and their mosquitocidal potential. *Parasitol Res*, 113(9):3121-3141.
- Yu, K.X., Wong, C.L., Ahmad, R. & I. Jantan, 2015. Larvicidal activity, inhibition effect on development, histopathological alteration and morphological aberration induced by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asia, Pac J Trop Med*, 8(12): 1006-1012.
- Yu, K.E., Wong, C.L., Ahmad, R. & I. Jantan, 2015. Larvicidal activity, inhibition effect on development, histopathological alteration and morphological aberration induce by seaweed extracts in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Med*, 8(12):1006-1012.