

## ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE MACROALGAS MARINAS DEL ORIENTE DE VENEZUELA

LEONOR BRITO L.<sup>1</sup>, MARY ISABEL SEGNINI DE B.<sup>1</sup> & OSCAR CRESCENTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.  
leonorbritolara@gmail.com*

<sup>2</sup>*Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.*

**RESUMEN:** El objetivo de este estudio fue determinar la citotoxicidad de extractos orgánicos obtenidos de las algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* provenientes del oriente de Venezuela. La actividad citotóxica de los extractos se evaluó *in vitro* frente a nauplios del crustáceo *Artemia salina*, mediante la determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y, en gametos del erizo de mar *Lytechinus variegatus*, mediante la observación de la formación o no del cigoto y la posible inhibición mitótica de éste. Los resultados obtenidos indicaron que los extractos de las macroalgas presentaron un efecto letal moderado frente a *A. salina*, excepto el extracto metanólico de *K. alvarezii*. Actividad probablemente atribuida a la presencia del ácido graso hexadecanoico (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) identificado en mayor porcentaje en *G. serrulatum* (72,79%) y en un menor porcentaje en *G. tenuifrons* (16,83%), mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM). En el desarrollo embrionario de *L. variegatus* se evidenció la formación de la membrana de fecundación (cigoto) en un 80% y la segmentación de éste con un 10% de alteraciones en el clivaje por efecto de los extractos ensayados. Las especies de macroalgas estudiadas podrían ser una fuente promisoría de metabolitos bioactivos con potenciales aplicaciones farmacológicas.

**Palabras clave:** Algas rojas, extractos, letalidad, actividad citotóxica, Venezuela.

**ABSTRACT:** The toxicity of organic extracts from red algae from eastern Venezuela, *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum*, and *Kappaphycus alvarezii*, was tested *in vitro* by both evaluation of the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) on nauplii of *Artemia salina* and observation of whether gametes of sea urchin, *Lytechinus variegatus*, underwent zygote formation; and if they did, whether possible mitotic inhibition ensued. Results indicate that all extracts save the methanol extract from *K. alvarezii* had but a moderately toxic effect on *A. Salina*, probably on account of hexadecanoic acid, (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>), a fatty acid found in high percentage (72.79%) in *G. serrulatum*, and in smaller percentage (16.83%) in *G. tenuifrons*. In 80% of the cases the embryonic development of *L. Variegatus* evidenced the formation of a fertilization membrane and further segmentation of the zygote, with a 10% of cleavage alterations due to the extraction trials. The macroalga studied are a wellspring of bioactive metabolites harboring great pharmacological potential.

**Key words:** Red algae, extracts, lethality, cytotoxic activity, Venezuela.

### INTRODUCCIÓN

Las algas marinas tropicales son una rica fuente de compuestos bioactivos con potencial biomedicinal, es decir, poseen propiedades anticoagulantes, antioxidantes, antivirales, antibacterianas, citotóxicas, entre otras, ya que producen inusuales e interesantes sustancias químicas para disuadir a sus consumidores. Basándose en esto, se cree que la evolución de diversos organismos marinos implicó el desarrollo de sistemas de defensas químicas en lugar de los sistemas inmunológicos conocidos hasta entonces en el reino animal (MASCHECK & BAKER 2008; PEREIRA & DA GAMA 2008). Particularmente, en Venezuela, el estudio biológico y químico de los compuestos naturales de origen

marino se ha enfocado principalmente en los invertebrados como corales, esponjas, equinodermos (HERNÁNDEZ & HERNÁNDEZ 2005), existiendo muy pocos trabajos en macroalgas marinas, (CHARZEDDINE & FARIÑAS (2001); CORDERO (2003); CHARZEDDINE (2004); SEGNINI (2007); BRITO & CRESCENTE 2009). El presente estudio, mediante pruebas *in vitro*, pretende aportar información sobre la letalidad y la citotoxicidad en extractos orgánicos obtenidos de las algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. BIRD & E. C. DE OLIVEIRA 1986) FREDERICQ & HOMMERSAND 1989, *Gelidium serrulatum* J. AGARDH 1847 y *Kappaphycus alvarezii* (DOTY 1985), especies de importancia comercial, poco estudiadas desde el punto de vista químico y biológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *G. tenuifrons* fueron recolectadas en la localidad de La Vega (10° 37' Lat. N y 64° 7' Long. W) y *G. serrulatum* en Punta Guarapo (10° 38' Lat. N y 63° 43' Long. W), península de Araya, estado Sucre; mientras que *K. alvarezii* se recolectó en el Puerto Internacional El Guamache (10° 52' Lat. N y 64° 03' Long W), estado Nueva Esparta, Venezuela. Las muestras fueron cuidadosamente lavadas para eliminar epífitos e impurezas, y se secaron a temperatura ambiente a la sombra. Luego fueron molidas y extraídas con metanol obteniéndose así el extracto metanólico (EM) o extracto crudo, al cual se le añadió una mezcla metanol:agua (9:1) para separar las fases orgánica y acuosa. La fase orgánica fue extraída a 37 °C y a presión reducida obteniéndose, respectivamente, los extractos hexánico (EH), clorofórmico (EC) y en acetato de etilo (EAE) en las tres especies de algas estudiadas. Por cromatografía de capa fina preparativa y revelado con yodo y luz ultravioleta, se fraccionaron el EH de *G. tenuifrons* con hexano:acetato de etilo 7:3; el EH de *G. serrulatum* utilizando hexano:cloroformo 1:4, mientras que para el EAE de *K. alvarezii* se usó hexano:acetato de etilo 1:1, obteniéndose nueve, seis y siete fracciones, respectivamente. Estos extractos se fraccionaron debido a que fueron los que presentaron actividad antibacteriana (BRITO & CRESCENTE 2009).

La actividad letal se determinó según el método descrito por MEYER *et al.* (1982) mediante el empleo de nauplios del crustáceo *Artemia salina* LINNAEUS 1758. Los extractos: EM de *G. tenuifrons*, EM, EH y EC de *G. serrulatum* y los EM, EC y EAE de *K. alvarezii*, se emplearon a concentraciones sucesivas de 1000, 100, 10, 1, 0,1, y 0,01 µg/ml. La mortalidad de los organismos se observó una vez transcurridas 24 horas de iniciar el bioensayo. Se determinaron valores de Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) obtenidos a intervalos de confianza de 95% (STEPHAN 1977).

Para realizar la prueba de citotoxicidad (SEGNINI 2007), se utilizaron gametos del erizo de mar *L. variegatus* (LAMARCK 1816) obtenidos por estimulación química (KCl 0,5 M) de ejemplares adultos de ambos sexos recolectados en la Ensenada de Turpialito, estado Sucre. Como control del bioensayo de citotoxicidad, se colocaron en viales 100 µl de esperma, 100 µl de agua de mar y 1800 µl de óvulos. Para el ensayo de toxicidad se utilizaron los extractos EH de *G. tenuifrons* y de *G. serrulatum*, y el EAE de *K. alvarezii*. Para

ello se pesaron 25 mg de cada extracto y se disolvieron en 2,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), equivalente a una concentración de 10000 µg/ml. A partir de ésta se prepararon concentraciones de 500, 250, 125 y 50 µg/ml. Las pruebas se realizaron por triplicado. Adicionalmente fue empleado un control con DMSO. Para demostrar la confiabilidad del experimento, al inicio de éste se verificó la viabilidad de los gametos, el proceso de fecundación y segmentación del cigoto de *L. variegatus*, tanto en el control como bajo la acción de los diferentes extractos orgánicos. Para la cuantificación del bioensayo (huevos sin fertilizar y cigotos divididos), se contaron bajo el microscopio binocular siete campos escogidos al azar (por concentración/extracto/réplica). Además, se observó si existían o no alteraciones en su desarrollo embrionario. Los resultados se expresaron en porcentaje.

La separación e identificación de los compuestos orgánicos presentes en las fracciones obtenidas de los EH de *G. tenuifrons* y de *G. serrulatum*, y en el EAE de *K. alvarezii* se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), para lo cual se utilizó un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo HP 5890 serie II y un detector selectivo de masas HP 5971 A, ambos conectados a un computador con un programa de edición de datos HPCHEM. Seguidamente, la identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con una librería o base de datos WILEY 138L. Los espectros de masas y cromatogramas de gases se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica Biodirigida del Departamento de Química, de la Universidad Simón Bolívar, Caracas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación las pruebas de letalidad de los diferentes extractos de las algas *G. tenuifrons* (EM), *G. serrulatum* (EM, EH y EC) y *K. alvarezii* (EM, EC y EAE), mostraron actividad frente a los nauplios del crustáceo *A. salina*, a excepción del EM de *K. alvarezii*; hay que hacer notar que el extracto de esta misma especie, pero recolectada en Guaranache y en Cubagua, Venezuela, presentó una significativa actividad letal frente a este crustáceo (SEGNINI *et al.* 2011). Los valores de CL<sub>50</sub> variaron entre 55,03 y 599,16 µg/ml (Tabla 1), los cuales están comprendidos en el margen de concentración letal media (CL<sub>50</sub> < 1000 µg/ml) propuesto por MEYER *et al.* (1982). La actividad letal provocada por los extractos obtenidos de las tres especies de algas estudiadas frente

a *A. salina*, mostró que la más significativa fue *G. tenuifrons*. Los resultados evidencian que las especies de algas evaluadas presentan compuestos fisiológicamente activos y posiblemente utilizan éstos como defensas químicas para protegerse de depredadores y de organismos patógenos presentes en el medio (IBRAHIM *et al.* 2005).

Aunque hasta la fecha existen escasos estudios al respecto, para las especies evaluadas en esta investigación, los trabajos relacionados con ensayos de letalidad de extractos de otras macroalgas frente a nauplios de *A. salina* han sido bien documentados. YOSHINORI *et al.* (2002), reportaron que el diterpeno brominado, neoirietetraol, aislado de *Laurencia yonaguniensis* presentó letalidad frente a *A. salina* ( $CL_{50} = 40,1 \mu\text{g/ml}$ ); mientras que CORDERO (2003) obtuvo diferentes extractos de las algas rojas *Bryocladia thyrsgera* (J. AGARDH) F. SCHMITZ 1901 e *Hydropuntia pauciramosa* (N. RODRÍGUEZ de RIOS 1991) y no encontró actividad letal frente a este crustáceo. VALDÉS-IGLESIAS *et al.* (2003) evaluaron la toxicidad de 63 extractos de algas marinas cubanas e informaron que 33,8% resultaron muy tóxicos, 52,3% moderadamente tóxicos (mayoritariamente los de algas rojas) y el resto no tóxico. SELVIN & LIPTON (2004), en un estudio con *Ulva fasciata* DELILE 1813 e *Hypnea musciformis* (WULFEN) J. V. LAMOUROUX 1813, reportaron que ambas especies mostraron potente actividad antibacterial, actividad citotóxica frente a *A. salina*, y actividad larvicida, anti-fouling e ictiotóxica. IBRAHIM *et al.* (2005) señalaron que en 17 algas recolectadas en diferentes estaciones del año encontraron que la actividad citotóxica en *A. salina* y antitumoral en *Agrobacterium tumefaciens* variaban con respecto a la época de recolección. LHULLIER *et al.* (2006) estudiaron 19 especies de macroalgas (cuatro clorofitas, cinco feofitas y diez rodofitas) de las cuales las rojas presentaron mayor actividad, con  $CL_{50} < 50$  para las especies *Acanthophora spicifera* (M. VAHL) BØRGESSEN 1910, *Centroceras clavulatum* (C. AGARDH) MONTAGNE 1846, *Galaxaura marginata* (J. ELLIS & SOLANDER) LAMARCK 1816, *Gracilaria domingensis* (KÜTZING) SONDER EX DICKIE 1874, *Hypnea musciformis* (J. ELLIS & SOLANDER) LAMARCK 1816 y *Pterocladia capillacea* (S. G. GMELIN) SANTELICES & HOMMERSAND 1997. SEGNINI (2007) reportó en *Eucheuma denticulatum* que la toxicidad frente a los crustáceos *Daphnia magna* STRAUS 1820 y *A. salina* se incrementaba a medida que aumentaba la polaridad en los extractos obtenidos de esta rodofita. FREYLE-PELEGRÍN *et al.* (2008) señalaron que el extracto orgánico de *Laurencia microcladia* presentó actividad citotóxica frente a

TABLA 1.- Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los diferentes extractos orgánicos obtenidos de las algas *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* frente a *Artemia salina*.

Extracto	$CL_{50}$	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
EM <i>G. tenuifrons</i>	55,03	27,19	121,83
EM <i>G. serrulatum</i>	212,62	136,29	358,28
EH <i>G. serrulatum</i>	316,23	100	1000
EC <i>G. serrulatum</i>	250,70	0,10	1000
EM <i>K. alvarezii</i>	> 1000		
EAE <i>K. alvarezii</i>	361,45	260,43	513,26
EC <i>K. alvarezii</i>	599,16	100	1000

EM: extracto metanólico, EH: extracto hexánico, EC: extracto clorofórmico, EAE: extracto en acetato de etilo.

*Leishmania mexicana* y *A. salina*. SAEIDNIA *et al.* (2009) en los extractos en acetato de etilo obtenidos de *Gracilaria salicornia* e *Hypnea flagelliformis* GREVILLE EX J. AGARDH 1851 encontraron que ambas especies mostraron potente efecto citotóxico frente a *A. salina* ( $CL_{50} = 3$  y  $4 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente). LEÓN-DENIZ *et al.* (2009), en un ensayo con 29 especies de algas marinas, de las cuales 14 eran rodofitas, sólo *Laurencia microcladia* mostró toxicidad frente a *A. salina* ( $CL_{50} = 119,8 \mu\text{g/ml}$ ). En un ensayo *in vitro* con *A. salina*, encontraron una toxicidad de  $190 \mu\text{g/ml}$  en el extracto etanólico del alga roja *Melanothamnus afaqhusainii* M. SHAMEEL, 1999 (HIRA *et al.* 2010).

Con respecto a la prueba de citotoxicidad realizada con huevos del erizo de mar *L. variegatus*, en los extractos orgánicos obtenidos de las tres especies de algas estudiadas, se observó la presencia de óvulos no fertilizados y fertilizados (presencia de la membrana de fecundación), y en división de 2, 4, 8 y 16 blastómeros. Además, se observaron escasas alteraciones, tales como: células fecundadas con expulsión del contenido citoplasmático por rotura de la membrana celular y desincronización en el proceso de segmentación de una a dos y a cuatro blastómeros durante la división celular, lo cual pudiera reflejar, un efecto retardante de la mitosis.

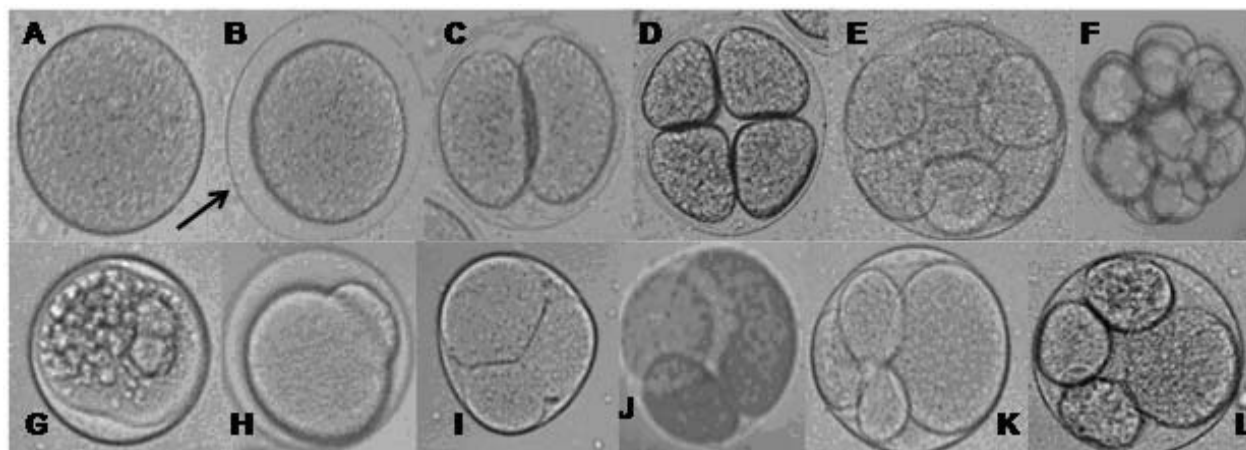


Fig. 1.- Efecto de los extractos orgánicos obtenidos de las algas estudiadas sobre el desarrollo temprano del erizo de mar *L. variegatus*. Nótese el proceso normal de segmentación: óvulo no fertilizado (A), cigoto con membrana de fecundación (B), división en 2 blastómeras (C), 4 blastómeras (D), 8 blastómeras (E) y 16 blastómeras (F). Alteraciones de la división celular (G-L): nótese el efecto de los extractos en la no sincronización en el clivaje hacia 2 blastómeras (H) y 4 blastómeras (I y J), blastómeras de diferentes tamaños (J-L), blastómeras de diferentes densidades ópticas (J).

También se observaron células con blastómeras de diferentes densidades ópticas, indicando diferentes actividades fisiológicas (Fig. 1). Resultados similares reportan SEGNI (2007) para el alga roja *Eucheuma denticulatum*, recolectada en Guaranache, estado Sucre, y en *K. alvarezii* proveniente de isla Cubagua, estado Nueva Esparta, Venezuela (SEGNI *et al.* 2011).

Las investigaciones existentes sobre la citotoxicidad de extractos de macroalgas marinas frente a huevos de erizos de mar son muy limitadas. DIAZ *et al.* (2006) señalaron que de las ocho especies de macroalgas evaluadas, solamente el alga parda *Dictyota pulchella* HÖRNIG & SCHNETTER 1988 mostró diferencias significativas con respecto al control en el porcentaje de huevos fecundados tratados con el extracto, en los cigotos en los estadios IV, XVI células y no divididos. Sin embargo, en todos los casos no existió un efecto retardante de la mitosis. De acuerdo a los resultados obtenidos con respecto a la citotoxicidad de los extractos de las macroalgas *G. tenuifrons*, *G. serrulatum* y *K. alvarezii* evaluados en este experimento, se puede señalar, que no existen suficientes evidencias para calificar a los extractos como citotóxicos, ya que el porcentaje de cigotos no divididos y anormales fue muy bajo. Es de hacer notar que por cromatografía de gases-espectrometría de masas en las tres especies de algas estudiadas se logró identificar en forma mayoritaria hidrocarburos saturados e insaturados, alcoholes, fenoles, lactonas, cetonas, ácidos grasos y esteroides, y

posiblemente alguno de estos compuestos sea responsable de la actividad letal presente en los extractos de las macroalgas estudiadas. Particularmente, en la fracción 3 del EH de *G. tenuifrons* y de *G. serrulatum* se logró identificar en mayor porcentaje el ácido graso hexadecanoico, en *G. serrulatum* (72,79 %) y *G. tenuifrons*

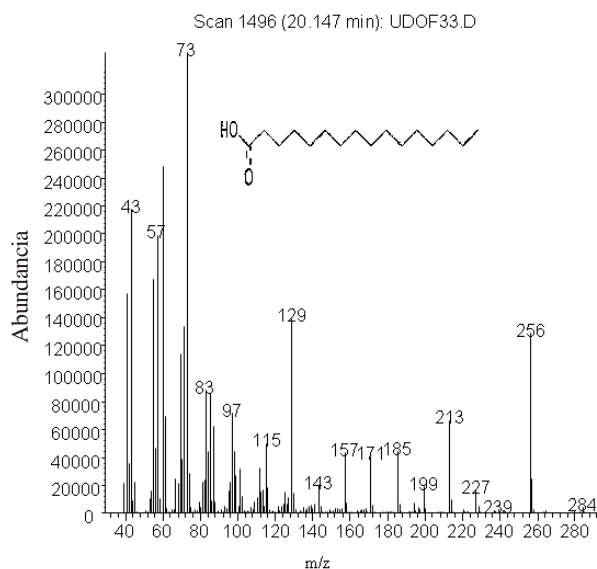


Fig.2.- Espectro de masas, para un TR de 20,147 min, del ácido hexadecanoico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) de la fracción 3 del extracto hexánico de *G. serrulatum*.



(16,83 %) (Fig. 2). Es posible que este compuesto sea uno de los responsables de la letalidad presentada por estas algas. Estos resultados coinciden con los reportados por MANILAL *et al.* (2009), quienes atribuyeron la actividad citotóxica del alga roja *Laurencia brandenii* SAITO & WOMERSLEY 1974 a los ácidos grasos 9,12-ácido octodecadienoico (49,75 %) y al ácido n-hexadecanoico (14,24 %) y señalaron que las algas marinas contienen un alto porcentaje de ácidos grasos y muchos de ellos poseen bioactividad potencial.

### CONCLUSIONES

Los resultados sobre la actividad letal y citotóxica de los extractos orgánicos de *G. tenuifrons*, *G. serrulatum* y *K. alvarezii* frente a *A. salina* y a los huevos del erizo de mar *L. variegatus* constituyen los primeros reportes para Venezuela.

El ácido hexadecanoico identificado mediante CG/EM, posiblemente sea uno de los compuestos responsables de la bioactividad *in vitro* observada en los diferentes organismos ensayados.

### REFERENCIAS

- BRITO L., L. & O. CRESCENTE. 2009. Actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del Oriente de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 48(1): 29-33.
- CORDERO, J. 2003. *Actividad antimicrobiana, biotóxica y análisis químico de extractos de las algas rojas Bryocladia thyrsgera (Ceramiales: Rhodomelaceae) e Hydropuntia pauciramosa (Gracilariaceae) procedentes de "El Rincón de Araya", Edo. Sucre, Venezuela*. Trab. Grad. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 56 pp.
- CHARZEDDINE, L. & M. FARIÑAS. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del Nororiente de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*. 40(1&2): 49-54.
- \_\_\_\_\_. 2004. *Aislamiento, caracterización parcial y actividad biológica de una lectina presente en el alga marina Halimeda opuntia (Linneaus) Lamouroux (Chlorophyta)*. Trab. Grad. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 118 pp.
- DIAZ, M., G. BULA-MEYER, S. ZEA & A. MARTINEZ. 2006. Ensayos de actividad biológica y ecología química de extractos orgánicos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 35: 241-247.
- FREILE-PELEGRÍN, Y., D. ROBLEDO, M. J. CHAN-BACAB & B. O. ORTEGA-MORALES. 2008. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia* 79: 374-377.
- HERNÁNDEZ, M. V. & M. M. HERNÁNDEZ. 2005. Bioactivos marinos en Venezuela: Una revisión. *Saber* 17(2):188-194.
- HIRA, A., V. SULTANA, J. ARA & S. EHTESHAMUL-HAQUE. 2010. *In vitro* cytotoxicity of seaweeds from Karachi coast on brine shrimp. *Pak. J. Bot.* 42(5): 3555-3560.
- IBRAHIM, A., M. MOSTAFA, M. EL-MASRY & M. EL-NAGGAR. 2005. Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae. *Egypt. J. Aquat. Res.* 31(1): 146-155.
- LEÓN-DENIZ, L., E. DUMONTEIL, R. MOO-PUC & Y. FREILE-PELEGRÍN. 2009. Antitrypanosomal *in vitro* activity of tropical marine algae extracts. *Pharm. Biol.* 47(9): 864-871.
- LHULLIER, C., P. HORTA & M. FALKENBERG. 2006. Avaliação de extratos de macroalgas béticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16(2): 158-163.
- MANILAL, A., S. SUJITH, G. SEGHAL, J. SELVIN & CH. SHAKIR. 2009. Cytotoxic potentials of red alga, *Laurencia brandenii* collected from the Indian coast. *Global. J. Pharmacol.* 3(2): 90-94.
- MASCHECK J. A. & B. J. BAKER, 2008. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities. In Asmler, C.D. (ED) *Algal chemical ecology*. Springer-verlag. Berlin, Heidelberg. Germany. 313p.
- MEYER, B., N. FERRIGNI, J. PUTNAM, L. JACOBSEN, D. NICHOLS & J. MCLAUGHLIN. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34.
- PEREIRA, R. C. & D. A. P. DA GAMA. 2008. Macroalgal

- chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities. En Asmler, C.D. (ED). Algal chemical ecology. Springer-verlag. Berlin, Heidelberg. Germany. 313p.
- SAEIDNIA, S., A. GOHARI, A. SHAHVERDI, P. PERMED, M. NASIRI, K. MOLLAZADEH & F. FARAHANI. 2009. Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian Gulf. *Pharmacog. Res.* 428-430.
- SEGNINI DE BRAVO, M. I. 2007. *Evaluación de la actividad biológica y determinación de los mecanismos de acción primaria de extractos orgánicos obtenidos de Eucheuma denticulatum (Gigartinales, Rhodophyta) y Fagara monophylla (Rutaceae) en varios organismos.* Trab. Grad. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 133 pp.
- SEGNINI, M., L. BRITO, M. NEYRA, H. D'ARMAS & J. BARRIOS. 2011. Evaluación toxicológica del alga *Kappaphycus alvarezii* en la región Oriental de Venezuela. *Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui. III*: 341-350.
- SELVIN, J. & A. LIPTON. 2004. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the Peninsular coast of India. *J. Mar. Sci. Tec.* 12(1): 1-6.
- STEPHAN, C. 1977. Methods for calculating in  $LC_{50}$ . In: American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L. Mayer & J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pensilvania USA. 65-84 pp.
- VALDÉS-IGLESIAS, O., N. DÍAZ, Y. CABRANES, M. ACEVEDO, A. ARECES, L. GRAÑA & C. DÍAZ. 2003. Macroalgas de la plataforma insular Cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia* 16: 36-45.
- YOSHINORI, T., D. MOTONARI, M. SUSUKI, A. TSUYOSHI & M. MICHIO. 2002. Halogenated metabolites from the new Okinawan red alga *Laurencia yonaguniensis*. *J. Nat. Prod.* 65(3): 395-398.

RECIBIDO: Julio 2011

ACEPTADO: Febrero 2012