



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

EVALUACIÓN QUÍMICA, POSIBLE LETALIDAD Y CITOTOXICIDAD DEL  
ALGA INVASORA *Kappaphycus alvarezii*  
(Modalidad: Investigación)

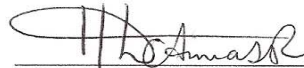
MARYLÍN ESTEFANÍA NEYRA JURADO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA

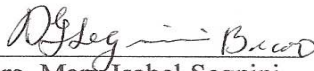
CUMANÁ, 2011.

EVALUACIÓN QUÍMICA, POSIBLE LETALIDAD Y CITOTOXICIDAD DEL  
ALGA INVASORA *Kappaphycus alvarezii*

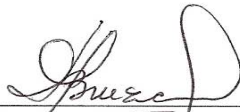
APROBADO POR:



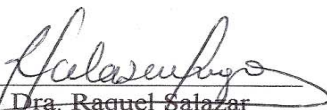
Dra. Haydelba D' Armas  
Asesora



Dra. Mary Isabel Segnini  
Coasesora



Dra. Doris Bruzco  
Jurado principal



Dra. Raquel Salazar  
Jurado principal

## INDICE

DEDICATORIA .....	i
LISTA DE TABLAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN .....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	7
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	7
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL ALGA.....	8
PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES.....	9
Alcaloides .....	9
Saponinas.....	10
Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos.....	10
Glicósidos cianogénicos y cardiotónicos.....	10
Polifenoles .....	10
Metilencetonas.....	11
Antraquinonas.....	11
Flavonoides.....	11
FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO MÁS LETAL Y /O CITOTÓXICO .....	11
Cromatografía de columna (CC).....	12
Cromatografía de capa fina (CCF).....	12
Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) .....	12
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	13
Espectroscopia de RMN- <sup>1</sup> H y RMN- <sup>13</sup> C.....	13
Espectroscopia infrarroja (IR) .....	14
Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM).....	14
Constante física (punto de fusión).....	15
EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD .....	15
Actividad letal en <i>Artemia salina</i> .....	16
Actividad letal en <i>Litopenaeus vannamei</i> (Crustacea, Penaeidae).....	17
Citotoxicidad con huevos de erizo de mar <i>Echinometra lucunter</i> .....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DEL ALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	21

ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR .....	22
PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS CON LOS EXTRACTOS CRUDOS DE <i>K. alvarezii</i> .....	25
Actividad tóxica de <i>K. alvarezii</i> frente al crustáceo <i>Artemia salina</i> .....	26
Actividad tóxica de <i>K. alvarezii</i> frente a <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	28
Citotoxicidad de los extractos crudos en células de erizos de mar <i>Echinometra     lucunter</i> . .....	29
FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS.....	33
Fraccionamiento del extracto crudo en éter de petróleo de <i>K. alvarezii</i> .....	33
Fraccionamiento del extracto crudo en cloroformo de <i>K. alvarezii</i> .....	42
Fraccionamiento del extracto crudo en acetato de etilo de <i>K. alvarezii</i> .....	70
Fraccionamiento del extracto crudo en metanol de <i>K. alvarezii</i> .....	84
CONCLUSIONES .....	92
<b>APÉNDICES</b> .....	101
HOJAS DE METADATOS .....	107

## DEDICATORIA

*Tanta felicidad viene dada gracias a un ser espiritual de gran supremacía, a ese ser divino que es Dios, le dedicó este logro primeramente. Pues a él, le debo que haya puesto en mí ser todo el talento y sabiduría no solo para realizarme profesionalmente, sino también para crecer moralmente.*

*Cada día para mí representa un nuevo amanecer y consigo un reto a confrontar, oyendo los sabios consejos de mis padres, fieles servidores y guías incansables no escatimé esfuerzos y decidí asumir el logro de esta meta que representa el sueño anhelado, por el cual no he desmayado a pesar de las vicisitudes, por ello le dedico este triunfo también a Victor Neyra y María Jurado, por darme la vida.*

*A la memoria de mi abuelito Fernando Jurado y mi tío Fernando porque a pesar de no estar presentes físicamente, sé que me desean lo mejor.*

*A mi abuelita Encarnación, mi hermana María Isabel y mis hermanos Demetrio y Huguito, porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan, me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.*

*A ti mi ángel bello ALEXIS MENDOZA, como Dios camina por senderos misteriosos, inesperadamente te puso en mi camino, una ilusión bella. Tú infinito apoyo incondicional, siempre transmitiéndome esa gran vitalidad y energía positiva que irradian, fortaleciendo la ejecución y culminación, de este éxito. Yo, sé que Dios te puso en mi camino, para darle a mi vida esa inmensa alegría que le faltaba. Tú te has convertido en mi fortaleza y eres pieza fundamental de mi vida. Gracias a ti siempre...*

*A mis amigos: Rafael, Jesusmarit, Jesli, José Gregorio, Marines, Miguel, Rosanny, Berenice, Ana Karina, Salome, Yolimar, Enrique, Julinet. Durante todo el tiempo transcurrido de mi formación en esta carrera, que un día escogí como parte de mis sueños y metas, fueron añadiéndose amigos con el pasar del tiempo, que siempre han compartido conmigo los momentos excelentes (más finos) y los no tan buenos. Sé que aunque exista distancia entre nosotros, inconvenientes y disgustos, siempre quedarán escritos en mi corazón, cada uno de sus nombres.*

*A tí Charlotte, te adoro mi princesa, eres la más bella del universo. Te quiero.*

## AGRADECIMIENTOS

Muchas han sido las personas que de manera directa o indirecta han ayudado en la realización de esta tesis. Quiero dejar constancia de todas ellas y agradecerles con sinceridad su participación.

Gracias a tu fuerza divina DIOS, que en todo momento estuviste a mi lado, para guiar mis pasos, mis acciones y mi vida. Siempre encaminándome y enseñándome que todo en la vida es experiencia sea bueno o sea malo. Depende de uno crecer como persona ante los obstáculos y seguir adelante. Pase lo que pase lo más importante es estar feliz con uno mismo y sentir que en todo se ha dado lo mejor de uno mismo.

En segundo lugar, a mi segunda madre Dra Haydelba D' Armas, por no solo su asesoría, sino también por su apoyo, por abrirme la puerta al laboratorio de productos naturales y lípidos, enseñándome y transmitiéndome todos los días un poco más de sus conocimientos y experiencias, enriqueciéndome profesionalmente y como persona. Representando para mí persona, un ejemplo a seguir como gran ser humano.

A la profesora Mary Isabel Segnini, por su orientación, ayuda e inmensa colaboración y por facilitarme el uso de las instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Ecología Química y al Prof. Jorge Barrios y la Dra. Leonor Brito, por su constante ayuda. Gracias.

Al Departamento de Química de la Universidad de Oriente, que a pesar de sus caídas, las cuales han sido muy ondas, siempre sigue adelante, gracias por su colaboración parcial en cuanto al suministro de materiales y reactivos necesarios.

A las personas e instituciones que prestaron su colaboración en la realización de los análisis, en especial a MSc. Matilde Gómez (IVIC), Profa. Noris (IUTE), Noelani Ciguela (USB) y MSc. Liz Cubillán (IVIC). Gracias.

A mis compañeros, Victoria, Nirosqui, Adriana, Jean Paul, Raúl, Joel, Fátima, Carmen, Brimar, Laurenis, Aidyn, Melissa, Octavio. Gracias.

Al Prof. Gustavo Liendo, por su gran apoyo, ayuda y orientación, en una etapa de mi carrera en que me encontraba bloqueada y con dificultades. Gracias.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Rendimientos porcentuales de los diferentes extractos crudos.....	22
Tabla 2. Familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos de <i>K. alvarezii</i> . detectados a través de pruebas químicas.....	23
Tabla 3. Actividad biotóxica de los extractos crudos de <i>K. alvarezii</i> contra <i>A. salina</i> . ..	27
Tabla 4. Actividad biotóxica de los extractos crudos de <i>K. alvarezii</i> contra <i>L. vannamei</i> . .....	29
Tabla 5. Fraccionamiento del extracto soluble en éter de petróleo del alga <i>K. alvarezii</i> .	34
Tabla 6. Fracciones obtenidas de la CCF de los eluatos de EEP. ....	34
Tabla 7. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción X del EEP. ....	37
Tabla 8. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción EP <sub>3</sub> del EEP. ....	38
Tabla 9. Subfracciones obtenidas en la recristalización de la fracción Y del EEP.....	40
Tabla 11. Fracciones obtenidas del extracto soluble en CHCl <sub>3</sub> y sus respectivas masas.	44
Tabla 12. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción C del EEP.....	45
Tabla 13. Compuestos identificados en la subfracción C <sub>2,3</sub> mediante CG-EM. ....	45
Tabla 14. Compuestos identificados en la fracción D mediante CG-EM.....	52
Tabla 15. Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción G <sub>2</sub> y sus respectivas señales.....	62
Tabla 16. Fraccionamiento por CC de la fracción H del extracto en cloroformo del alga <i>K. alvarezii</i> .....	65
Tabla 17. Subfracciones obtenidas de la CC de la fracción H del extracto en cloroformo. ....	65
Tabla 18. Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción FH <sub>4</sub> y sus respectivas señales.....	66
Tabla 20. Correlación entre los desplazamientos químicos de RMN <sup>13</sup> C, HMQC y HMBC.....	69
Tabla 21. Fracciones obtenidas de la CCFP del extracto en acetato de etilo (EAE) proveniente de <i>K. alvarezii</i> . ....	70
Tabla 22. Compuestos identificados en la fracción A <sub>2</sub> mediante CG-EM. ....	72
Tabla 23. Fraccionamiento del extracto soluble en metanol del alga <i>K. alvarezii</i> . ....	84
Tabla 24. Fracciones resultantes de la CC del extracto soluble en metanol del alga <i>K. alvarezii</i> . ....	86
Tabla 25. Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción EM <sub>7</sub> y sus respectivas señales.....	88
Tabla A1. Actividad biotóxica de algunas fracciones del extracto soluble en éter de petróleo de <i>K. alvarezii</i> contra <i>Artemia salina</i> . ....	102
Tabla A2. Actividad biotóxica de algunas fracciones del extracto soluble en cloroformo de <i>K. alvarezii</i> contra <i>Artemia salina</i> . ....	102

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Habito de <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	7
Figura 2. Zona de muestro. ....	8
Figura 3. Esquema del bioensayo de letalidad de los extractos de <i>K. alvarezii</i> ante el crustáceo <i>A. salina</i> . ....	16
Figura 4. Esquema del bioensayo de letalidad de los extractos de <i>K. alvarezii</i> ante el crustáceo <i>L. vannamei</i> . ....	18
Figura 5. Esquema de recolección de gametos de los erizos de mar <i>E. lucunter</i> . ....	19
Figura 6. Esquema del bioensayo de citotoxicidad de los extractos de <i>K. alvarezii</i> frente a <i>E. lucunter</i> . ....	20
Figura 7. Control del bioensayo del desarrollo embrionario del erizo de mar <i>E. lucunter</i> . <b>A-B</b> : formación de la membrana de fecundación. Distintas etapas de división celular, <b>C</b> : inicio de la división del cigoto; <b>D</b> : formación de 2 blastómeros; <b>E</b> : huevo dividido en 4 blastómeros; <b>F</b> : célula dividida en 8 blastómeros, comenzando su división en 16; <b>G</b> : mórula; <b>H e I</b> : blástulas; <b>J</b> : gástrula. ....	31
Figura 8. Efectos citotóxico de los extractos de <i>K. alvarezii</i> , frente al desarrollo embrionario del erizo de mar <i>E. lucunter</i> . <b>A-C</b> : células expulsando su contenido citoplasmático (lisis); <b>C</b> : diferencia de densidad óptica; <b>D-G</b> : sincronización alterada en la división celular; <b>H</b> : diferente densidad óptica. ....	32
Figura 10. Espectro IR-TF de la fracción X indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes. ....	37
Figura 11. Espectro IR-TF de la fracción Y indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes. ....	39
Figura 12. Esquema de recristalización de la fracción Y. ....	40
Figura 13. Espectro IR-TF de la fracción EP11 indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes.....	41
Figura 15. Cromatograma de gases de la subfracción C <sub>2,3</sub> . ....	46
Figura 16. Espectro de masas del 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona. ....	47
Figura 17. Patrón de fragmentación del 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona. ....	48
Figura 18. Espectro de masas del estigmasterol. ....	49
Figura 19. Patrón de fragmentación del estigmasterol. ....	50
Figura 20. Cromatograma de gases de la fracción D. ....	51
Figura 21. Espectro de masas del 3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona. ....	52
Figura 22. Patrón de fragmentación del 3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona.....	53
Figura 23. Espectro de masas del ácido tetradecanoico.....	54
Figura 24. Patrón de fragmentación de ácido tetradecanoico.....	55
Figura 25. Espectro de masas del ácido hexadecanoico. ....	56
Figura 26. Patrón de fragmentación de ácido hexadecanoico. ....	57
Figura 27. Espectro de masas del ácido octadecanoico. ....	58
Figura 28. Patrón de fragmentación de ácido octadecanoico. ....	59



Figura 29. Espectro IR-TF de la subfracción G <sub>2</sub> indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes.....	61
Figura 30. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la subfracción G <sub>2</sub> , ampliado en la región de las señales con su respectiva asignación. ....	62
Figura 31. Espectro DEPT-135 de la subfracción G <sub>2</sub> . ....	63
Figura 32. Posible estructura propuesta para G <sub>2</sub> . ....	63
Figura 33. Posible estructura propuesta para G <sub>2</sub> , indicando δ <sub>H</sub> teóricos. ....	64
Figura 34. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la subfracción H <sub>4</sub> , ampliado en la región de las señales con su respectiva asignación. ....	66
Tabla 19. Algunos desplazamientos químicos obtenidos del espectro de RMN <sup>13</sup> C de la subfracción H <sub>4</sub> y sus respectivas señales. ....	67
Figura 35. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de la subfracción H <sub>4</sub> . ....	67
Figura 36. Estructura propuesta indicando para la subfracción FH <sub>4</sub> , algunas interacciones HMBC.....	69
Figura 37. Estructura del compuesto H <sub>4</sub> , indicando los δ <sub>H</sub> y δ <sub>C</sub> respectivos.....	70
Figura 38. Diagrama de fraccionamiento del extracto soluble en acetato de etilo del alga <i>K. alvarezii</i> . ....	71
Figura 39. Cromatograma de gases de la fracción A <sub>2</sub> .....	72
Figura 40. Espectro de masas del ácido 2- fenilacético.....	73
Figura 41. Patrón de fragmentación del ácido 2- fenilacético. ....	74
Figura 42. Espectro de masas del 1-(1-propoxietoxi) propano.....	75
Figura 43. Patrón de fragmentación del ácido 1-(1-propoxietoxi) propano. ....	76
Figura 44. Espectro de masas de la 2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona.....	77
Figura 45. Patrón de fragmentación de la 2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona. ....	78
Figura 46. Espectro de masas de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. ....	78
Figura 47. Patrón de fragmentación de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona. ....	79
Figura 48. Espectro de masas de la dibutilftalato. ....	80
Figura 49. Patrón de fragmentación del dibutilftalato. ....	81
Figura 50. Espectro de masas del colestano. ....	82
Figura 51. Patrón de fragmentación del colestano.....	83
Figura 53. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción EM <sub>3</sub> . ....	87
Figura 54. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción EM <sub>7</sub> . ....	88
Figura 55. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción EM <sub>7</sub> , ampliado en la zona a campo alto. ....	89
Figura 56. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la fracción EM <sub>7</sub> . ....	90
Figura 57. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la fracción EM <sub>7</sub> , ampliado a campo alto.....	90
Figura 58. Espectro DEPT- 135° de la fracción EM <sub>7</sub> . ....	91
Figura 59. Estructura del compuesto (ácido octadecanoico) de la fracción EM <sub>7</sub> . ....	91
Figura B1. Espectro COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de la subfracción H <sub>4</sub> , ampliada en la región de las señales.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. CC	Cromatografía en columna
2. CCF	Cromatografía en capa fina
3. CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
4. CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
5. CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
6. COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	Correlación espectroscópica homonuclear
7. DBP	Dibutilftalato
8. DEPT	Distortionless enhancement through polarization transfer
9. DMSO	Dimetilsulfóxido
10. EEP	Extracto en éter de petróleo
11. EC	Extracto en cloroformo
12. EAE	Extracto en acetato de etilo
13. EM	Extracto en metanol
14. HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
15. HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity
16. IR	Espectroscopia Infrarroja
17. MAH	Molibdato de amonio ácido
18. R <sub>f</sub>	Relación entre el desplazamiento del soluto y el solvente
19. RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protones
20. RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono - 13
21. Tr	Tiempo de retención

## RESUMEN

A los extractos crudos en éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol del alga *Kappaphycus alvarezii* (recolectada en la Isla de Cubagua), se les realizó un estudio químico y de bioactividad. Todos los extractos ensayados evidenciaron presencia de esteroides insaturados; sin embargo, los extractos crudos en éter de petróleo y metanol, mostraron la presencia de alcaloides; a diferencia del extracto crudo en cloroformo y en acetato de etilo, los cuales dieron positiva la prueba para triterpenos pentacíclicos. Los valores de  $CL_{50}$  de todos los extractos obtenidos en este bioensayo mostraron toxicidad ante los crustáceos *Artemia salina* y *Litopenaeus vannamei*. Mediante cromatografías en columna y capa fina preparativa, se fraccionaron continuamente los extractos en cloroformo y en acetato de etilo, analizándose algunas subfracciones obtenidas mediante CG-EM e identificándose algunos de sus constituyentes por sus patrones de fragmentación y comparación de sus espectros de masas con los existentes en la base de datos. Encontrándose que la fracción  $A_2$  proveniente del extracto en acetato de etilo presentó como componentes mayoritarios al ácido hexadecanoico, dibutilftalato y el compuesto esteroideal colestano; además de 2,6-diter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; ácido 2- fenilacético y 1-(1-propoxi) propano. Mientras que la fracción FD del extracto en cloroformo exhibió a los ácidos grasos saturados palmítico, esteárico y mirístico, como componentes abundantes; y en menor proporción a la 3-etil-4-metil-1*H*-pirrol-2,5-diona. En la fracción  $EM_7$  proveniente del fraccionamiento del extracto metanólico, se logró identificar al ácido octadecanoico a través de RMN uni y bidimensional y en la fracción FG del extracto en cloroformo, se caracterizó al 1-fenilbutan-1-ol, mediante esta misma técnica.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos, los científicos están sugiriendo nuevas direcciones para la futura investigación de los productos naturales marinos. Estas nuevas direcciones se hacen necesarias, si se piensa que cada vez resulta más difícil encontrar nuevos compuestos a partir de organismos marinos cuya recolección sea ecológicamente sencilla. Por este motivo, quienes pretendan sólo el hallazgo de nuevos productos, deben prestar atención a los organismos que son extraños o difíciles de recoger. En definitiva, queda todavía mucho por ser descubierto sobre la “química del mar”. Sin duda, habrá muchas ocasiones en que la determinación de mecanismos de acción, tanto ecológica como farmacológica, requerirá la intervención de los “químicos marinos” (1).

Los resultados de los estudios en productos naturales marinos indican que más del 80% de sus aplicaciones van dirigidas a tres campos principales, los cuales corresponden a la salud humana, la alimentación y la industria cosmética. Por lo tanto, la razón primordial de las investigaciones en ésta área, es la búsqueda de compuestos químicos bioactivos útiles y aplicables para los seres humanos (2). Los constituyentes químicos que más han llamado la atención, son aquéllos que han sido aislados de organismos que viven en aguas tropicales, ya que es precisamente en estas zonas donde existe un mayor grado de biodiversidad, fenómeno que genera una mayor competencia por espacio y alimento y que necesariamente hace que cada organismo deba producir una serie de estrategias químicas que le aseguren su propio desarrollo (3).

Los organismos marinos se han revelado como una fuente importante de sustancias bioactivas, de gran valor para el tratamiento de numerosas enfermedades por sus propiedades terapéuticas (antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antibióticas, entre otras). Han sido identificados cerca de 600 nuevos metabolitos, provenientes de varios organismos de origen marino (4-5). Dentro de ellos, se encuentran las algas de agua dulce y marinas, las cuales han desarrollado estrategias de defensa que dan lugar a un nivel significativo de diferentes estructuras químicas, de diversas rutas metabólicas (6-7). Encontrándose grupos de metabolitos como: diterpenos, eicosanoides, lectinas, esteroides y alcaloides (8). La biodiversidad de las especies de algas marinas, junto a la

diversidad química encontrada en cada especie, constituye un recurso prácticamente ilimitado que puede ser utilizado de forma beneficiosa, para el desarrollo de biofármacos antitumorales, antivirales y antibióticos (9).

El potencial antibacteriano de las algas se debe a su capacidad para sintetizar, entre otros, a los diterpenos en las algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos tipo terpeno-aromático en las algas pardas (10-13). Sin embargo, el uso de las algas marinas data de muchos siglos atrás, sirviendo de alimento humano y como fertilizante en agricultura (14). Este importante recurso marino es muy apreciado en países asiáticos (Japón, China), debido a que constituye un alimento sano, rico en polisacáridos, proteínas, minerales, vitaminas y otros nutrientes como ácidos grasos poliinsaturados (15-16). Además de eso, las algas han sido explotadas, desde hace ya más de un siglo, como fuente de coloides que son usados exitosamente y con un amplio espectro de posibilidades como espesantes, gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria. Pero, es desde hace aproximadamente 30 años que las algas marinas han sido reconocidas como fuentes potenciales de sustancias con propiedades farmacológicas (14).

En relación con bioproductos provenientes de algas, las tendencias recientes en la investigación de las drogas procedentes de fuentes naturales, sugieren que las algas son un grupo prometedor para suministrar nuevas sustancias bioquímicamente activas (17-21). Siendo numerosas las revisiones que señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos (22-24), en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos (25), con posibles usos antibacterianos, anticancerígenos, cardiotónicos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes, entre otros (26).

Estos organismos marinos constituyen un total de veinticinco a treinta mil especies, con una gran diversidad de formas y tallas, pueden existir como organismos unicelulares microscópicos (microalgas) y pluricelulares de gran tamaño (macroalgas) (26). Aunque el número de especies de macroalgas estudiadas únicamente alcanza alrededor de un 2% del total de las conocidas, en la actualidad los compuestos químicos caracterizados son aproximadamente dos mil, pero solamente en algunos se ha podido

establecer claramente el mecanismo de acción (27). Miembros de los principales grupos de algas marinas (rodofitas o algas rojas, feofitas o algas pardas, clorofitas o algas verdes) han mostrado ser capaces de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias, virus y hongos (26). Entre algunas de las investigaciones, se encuentran la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de 11 especies de algas marinas, cuyos resultados obtenidos permiten afirmar que especies del *Phylum Rhodophyta*, *Chlorophyta* y *Phaeophyta*, son productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano, resultando ser las algas pardas y rojas los grupos con mayor número de especies con potencial antibacteriano (28).

Cabe destacar, que son muy pocas las publicaciones científicas realizadas en Venezuela, en las que se hayan caracterizado metabolitos provenientes de algas marinas de costas venezolanas y determinado su actividad biológica, pudiendo así establecerse el mecanismo de acción de esos compuestos activos identificados. El ensayo de la actividad antimicrobiana, biotóxica y análisis químico de dos especies de algas rojas, estableciéndose mediante los resultados obtenidos que los extractos de ambas especies presentaban propiedades antimicrobianas (29); aislamiento, caracterización parcial y actividad biológica de una lectina presente en el alga verde, *Halimeda opuntia* (30). Evaluación de la actividad biológica y determinación de los mecanismos de acción primaria de los extractos orgánicos del alga roja *Eucheuma denticulatum* (31); el estudio de la actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del Oriente de Venezuela, concluyéndose que las tres especies de algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (32); la determinación de las propiedades bioactivas de doce especies de algas marinas del Nororiente de Venezuela, presentando actividad hemaglutinante y antibacteriana los extractos acuosos de las algas pertenecientes a las *Rhodophyceae* y *Chlorophyceae*, pudiendo ser atribuido a la presencia de aglutininas tipo lectinas (33).

Treinta años de investigación en productos naturales de algas marinas, han llevado a la conclusión de que, las algas de color marrón y las rojas, poseen mecanismos bioquímicos con la disponibilidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos

secundarios con biofuncionalidades y tipos de esqueletos muy diferentes a los de las plantas superiores (34). Se ha encontrado que una gran diversidad de estructuras químicas como proteínas, terpenoides, cumarinas, xantonas, alcaloides, flavonoides, polifenoles y polisacáridos, elaboradas por especies de algas, son capaces de inhibir la enzima transcriptasa reversa (TR) del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (35). Polisacáridos extraídos del alga *Gracilaria corticata*, exhibieron actividad antiviral contra el virus del herpes simple tipo 1 y 2 (36).

Por otra parte, dos nuevos metabolitos bromofenólicos aislados del alga roja *Vidalia obtusaloba*, resultaron con actividad antiinflamatoria enfocada en la inhibición de la fosfolipasa A2 (37) y todas las fracciones de extractos del alga *Sargassum siliquastrum*, contenían compuestos fenólicos con una amplia actividad antioxidante (38). La variada actividad farmacológica de los polifenoles, en general, ha sido asociada a la capacidad de actuar como agentes antioxidantes (39). Pareciera ser, que las propiedades de los polifenoles como antioxidantes, es potenciada por soluciones de hierro (40).

Las algas más usadas por los humanos como alimento, son las algas rojas *Porphyra*, *Gracilaria*, *Gloiopeltis*, *Echeuma* y algas marrones como, *Laminaria* y *Undaria* (41). En Venezuela, no se han reportado casos de intoxicación alimenticia por el consumo de algas. Sin embargo, en Japón fueron reportados dos casos de intoxicación por *Gracilaria verrucosa* en octubre de 1993, resultando una persona fallecida (42) y en Hawai para septiembre de 1994, varias personas presentaron síntomas de intoxicación por la ingestión de *Gracilaria coronopifolia* (43). Aunque las algas son importantes como una fuente de alimentación, su principal uso industrial es para extraer productos polisacáridos como agar-agar, carragenina y alginatos.

Hay tres tipos de carragenina: kappa, iota, lamda. Kappa se usa para hacer geles muy fuertes. Iota es de *Eucheuma* y se usa para hacer geles suaves. Lambda es diferente y forma gel cuando se mezcla con proteínas y por eso se usa para espesar productos de leche. Se usa la carragenina en la carne enlatada, en la mayoría de los helados, leche y chocolate (44).

Las especies de *Euchema* y *Kappachycus* presentan características de crecimiento invasivas que les permiten limitar el espacio disponible sobre el sustrato para otras especies; tienen una alta capacidad de regeneración que permite su reproducción por fragmentación y puede crecer libremente en la columna de agua sin necesidad de sustrato por lo que constituyen algas invasoras (45). Además, estas algas están caracterizadas por una toxicidad que las mantiene libre de epifitas y de herbívoros (46). La información con respecto al tema de las invasiones por algas foráneas a nivel mundial, da una idea acerca del peligro que éstas representan para los recursos bióticos (47). La introducción y el traslado de especies con el objeto de acuicultura puede alterar o empobrecer la biodiversidad y los recursos genéticos del ecosistema marino a través de cruzamiento, predaciones, rivalidades y destrucción del hábitat, posiblemente, mediante la transmisión de parásitos y enfermedades (48, 49).

Las especies de algas invasoras y comercialmente importantes, pertenecen a la familia *Solieriaceae* (Figura 1), *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Gigartinales, Rhodophyta), es una de las carragenofitas cultivadas que ha tenido mayor éxito en mares tropicales, constituyendo la principal fuente mundial de materia prima para la producción de carragenina kappa-I (50-52).

El alga *K. alvarezii*, fue introducida en Venezuela con fines comerciales en 1996, realizándose los primeros cultivos en la Ensenada de Guaranache, estado Sucre. Posteriormente, fue llevada y cultivada en Playa La Uva, Isla de Coche, estado Nueva Esparta en 1997 (53), generando polémicas por todos los potenciales riesgos ambientales que pudiera generar su cultivo (47). El establecimiento de esta alga en las costas venezolanas fue demostrado por la aparición de ejemplares de *K. alvarezii* en áreas alejadas de los cultivos iniciales, observándose ejemplares saludables en arribazones en diferentes puntos de la costa de los estados Sucre y Nueva Esparta (54). La invasión y daño de arrecifes coralinos por *K. alvarezii* registrada para la Isla de Cubagua, demuestran lo peligroso que puede ser esta alga para la biodiversidad (49). Por otra parte, existen advertencias previas sobre el efecto de la invasión de *Kappaphycus sp* en zonas coralinas (45, 55).



Todos los trabajos de investigación existentes de *K. alvarezii*, hasta el año 2009 hacen referencia a aspectos taxonómicos, biológicos, de cultivo, respecto a sus propiedades antioxidantes (47,53, 56), así como estudios químicos enfocados a la identificación de los polisacáridos que presenta (57), principalmente en el aspecto económico de producción. Acerca de la identificación de algunos metabolitos secundarios, su caracterización, así como la determinación de la actividad biológica, solo se ha realizado una investigación, donde las muestras de *K. alvarezii* provenían del Puerto Internacional El Guamache, estado Nueva Esparta y en las fracciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> del extracto en acetato de etilo, por medio de un cromatografo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, se pudieron identificar varios compuestos mayoritariamente hidrocarburos insaturados, entre éstos se encontraron el 5- octadeceno, el 1- octadeceno y el eicosiltriclorosilano entre otros; determinándose además la actividad antibacteriana (58-59).

A pesar de los numerosos reportes existentes acerca de las propiedades que exhiben las algas, la química y la farmacología de *K. alvarezii* han sido poco estudiadas. En este sentido, el propósito del presente trabajo fue evaluar químicamente el alga *Kappaphycus alvarezii*, su posible letalidad y citotoxicidad, mediante la realización de pruebas químicas, que permitieron detectar la presencia de algunos metabolitos secundarios, y técnicas cromatográficas para su separación; pudiendo ser identificados aplicando análisis espectroscópicos y espectrométricos. Mientras que, la detección significativa de la actividad biológica, se realizó a través de bioensayos de letalidad y citotoxicidad en los diferentes extractos y fracciones.

La posterior evaluación del potencial antimicrobiano, y la caracterización química de sus metabolitos, abre la posibilidad de concretar investigaciones en biotecnología marina, tan indispensable en estas latitudes, por ser Venezuela un país tropical, con un gran potencial de riqueza todavía sin explotar. Disponiéndose esta información para dirigir estudios, no solo hacia la aplicación en la industria farmacéutica e industrial, sino también a investigaciones interdisciplinarias posteriores, para establecer mejores mecanismos de control ante la introducción de especies exóticas, aumentando así la calidad de la salud marina y vida humana.

## METODOLOGÍA

### RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Gigartinales, Rhodophyta) (Figura 1) fue recolectada en las aguas costeras de Cubagua, municipio Tubores, estado Nueva Esparta, Venezuela, a 10°50'23'' Lat. N y 64°05'08'' Lat. W (Figura 2), por el Prof. Jorge Barrios del Instituto Oceanográfico de Venezuela (I.O.V.), quién realizó también la identificación taxonómica. Fue almacenada en una cava con hielo y trasladada al Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, para su respectivo análisis. La cantidad de muestra algal total de los muestreos fue de 5 Kg, aproximadamente, en masa húmeda.



Figura 1. Habito de *Kappaphycus alvarezii*.

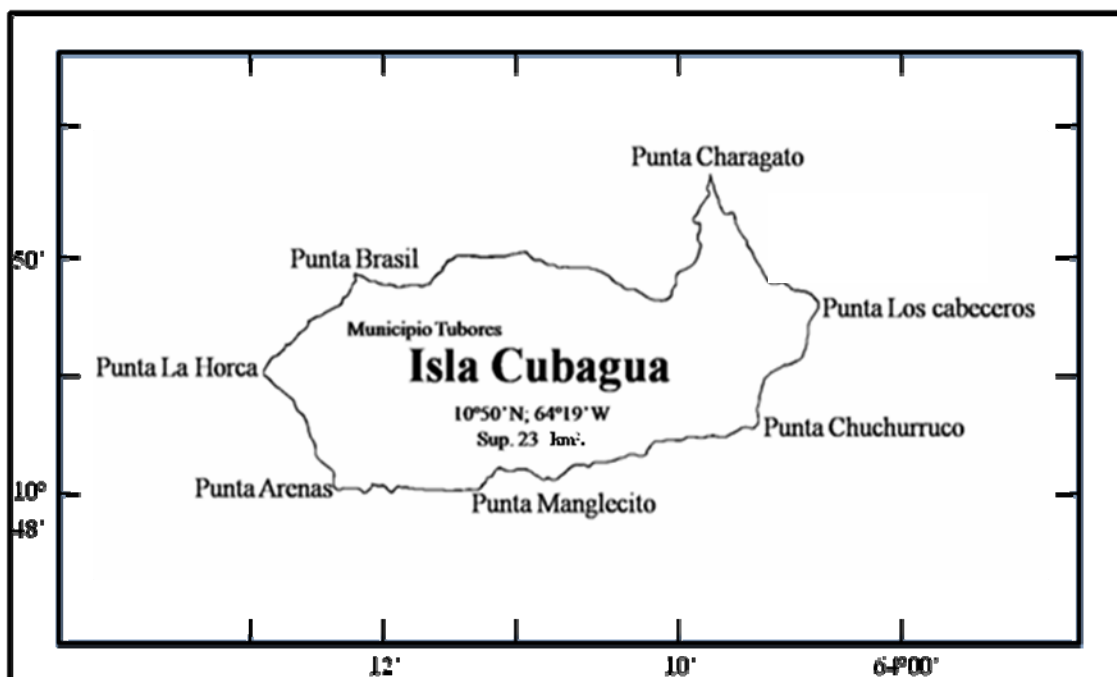


Figura 2. Zona de muestro.

### **OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL ALGA**

El material vegetal recolectado fue lavado varias veces con abundante agua destilada, para eliminar organismos epibiontes o partículas extrañas adheridas al alga, evitando así la contaminación de la muestra. Posteriormente, se deshidrató a temperatura ambiente y a la sombra durante un período de 5 días. Una vez eliminada la mayor cantidad de agua presente, se procedió a pulverizarla en un molino eléctrico y se pesó la muestra en una balanza analítica.

Los diferentes metabolitos secundarios o principios activos se extrajeron exhaustivamente con éter de petróleo, por espacio de 72 horas; posteriormente, se separó el filtrado y el residuo se maceró con el mismo solvente, durante 48 horas hasta agotamiento. Seguidamente, el residuo se volvió a reextraer sucesivamente con solventes más polares de polaridad creciente como: cloroformo, acetato de etilo y metanol, siguiendo el proceso de extracción anteriormente señalado. Cada uno de los filtrados se combinaron y fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador Hildolph a una temperatura menor de 45°C, para no desnaturalizar la muestra,

obteniéndose finalmente cuatro extractos crudos en orden ascendente según su polaridad: extracto en éter de petróleo (EEP), extracto en cloroformo (EC), extracto en acetato de etilo (EAE) y extracto metanólico (EM). Obtenidos todos los extractos, se procedió a la realización de las pruebas de letalidad y citotoxicidad, y el estudio fitoquímico.

## **PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES**

A cada uno de los extractos crudos (EEP, EC, EAE y EM), se le realizaron algunas pruebas químicas con ciertos reactivos de clasificación, para así poder tener una visión de la presencia o ausencia de algunas familias de metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, polifenoles, triterpenos, saponinas entre otros), información muy importante al momento de direccionar el trabajo, permitiendo también caracterizar los extractos. Estas pruebas fueron realizadas, siguiendo la metodología descrita a continuación (60):

### **Alcaloides**

Del extracto casi seco, se tomó una pequeña fracción y se colocó en un tubo de ensayo, redisolviéndola después con HCl al 10% y agitándola con un solvente inmiscible (cloroformo); la mezcla fue trasvasada a un embudo de separación, se dejó en reposo por un instante, hasta que se observaron las dos fases; la acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$  al 10%) y se extrajo con cloroformo, obteniéndose dos nuevas fases, las cuales, junto a la primera, se analizaron por separado para los tres tipos de alcaloides, utilizando el reactivo de Meyer y de Dragendorff (1,3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua destilada y 5 g de yoduro de potasio, aforando a 100 ml con agua), lo que permitió detectar alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio. La presencia de una coloración rojo intenso o la aparición de un precipitado de igual color, son indicativas de la presencia de alcaloides.

### **Saponinas**

Se tomó una pequeña porción del extracto crudo y se colocó en un tubo de ensayo con 2 ml de agua destilada; posteriormente, se agitó vigorosamente la muestra durante 30 segundos. Se asumió la presencia de saponinas por la formación de una espuma persistente durante 20 minutos, en una zona de 3 cm por encima de la superficie del líquido.

### **Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos**

Una parte del crudo total se hidrolizó con HCl al 10%, luego el hidrolizado se concentró y se extrajo con cloroformo. Tanto el crudo como el extracto orgánico proveniente de la hidrólisis, se analizaron para esteroles y triterpenos, mediante el uso del reactivo de Liebermann-Burchard (1 ml de anhídrido acético frío y 1 ml de diclorometano, al que se le añadieron unas gotas de ácido sulfúrico concentrado). Una coloración azul o verdosa indicó la presencia de esteroles, mientras que una coloración roja o violeta se consideró positiva para triterpenos.

### **Glicósidos cianogénicos y cardiotónicos**

Para detectar glicósidos cianogénicos, al material fresco macerado se le añadieron unas gotas de cloroformo y se calentó entre 50 y 70°C en un tubo de ensayo cerrado, los vapores fueron puestos en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10%. Los compuestos cianogénicos se manifiestan como una mancha roja sobre el papel.

Los glicósidos cardiotónicos fueron detectados por la reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) y KOH (0,5 mol·l<sup>-1</sup>). La observación de coloraciones azules o violetas se consideró positiva para esta prueba.

### **Polifenoles**

Para la detección de polifenoles, el extracto crudo se evaporó a sequedad, se retomó en agua destilada y se filtró. Seguidamente, se hizo reaccionar con una solución

de cloruro de hierro (III) al 1%, el cambio hacia una coloración parda indica la presencia de fenoles.

### **Metilencetonas**

El extracto crudo se disolvió en agua destilada, se filtró y luego fue tratado con el reactivo de Baljet (mezcla 1:1 de 1 g de ácido pícrico en 25 ml de etanol y 2 g NaOH en 25 ml de agua) (61). Una coloración roja indica la presencia de metilencetonas.

### **Antraquinonas**

Los extractos crudos se extrajeron con KOH ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ); posteriormente, se filtraron y acidificaron con ácido acético y, después, se agitaron con benceno. Si las capas orgánicas toman una coloración roja al alcalinizar con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.

### **Flavonoides**

Del extracto crudo, aproximadamente 1 g, se desgrasó con éter de petróleo, se filtró y el residuo se analizó para flavonoides empleando los siguientes métodos:

Se tomó parte del residuo y se colocó en un tubo de ensayo. Se agregaron 2 ml de HCl concentrado y virutas de magnesio. El “test” se considera positivo para flavonoides si se produce una coloración roja al dejar en reposo la reacción por unos 10-20 minutos.

Una gota del extracto se colocó sobre un papel de filtro y se roció con una solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol. La aparición de una mancha fluorescente amarilla bajo luz UV indica la presencia de flavonoides.

## **FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO MÁS LETAL Y /O CITOTÓXICO**

Para el aislamiento de los metabolitos secundarios, provenientes de los extractos seleccionados del alga, se llevó a cabo el respectivo fraccionamiento, mediante las siguientes técnicas cromatográficas:

### **Cromatografía de columna (CC)**

La separación de los componentes o metabolitos se realizó en una columna cromatográfica de dimensiones acorde con la masa del extracto, las cuales fueron empaquetadas con sílica gel 75 mesh a una proporción 1:30 ó 1:50 (m/m), según fuese el caso. Se empleó éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, y metanol en diferentes proporciones y mezclas como eluyentes.

### **Cromatografía de capa fina (CCF)**

Este tipo de cromatografía fue empleada con fines cualitativos para la combinación de los eluatos provenientes de las cromatografías en columna (CC) realizadas a cada uno de los extractos. Se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm<sup>2</sup>) recubiertas con sílica gel 60 mesh, con un espesor de 0,5 mm., siendo las fases móviles el solvente o las mezclas de solventes con las cuales salieron las fracciones, al momento de ser eluidas de la columna cromatográfica del extracto. Los  $R_f$  de las fracciones analizadas por CCF, se midieron de acuerdo con el desplazamiento de los compuestos frente a la luz ultravioleta o molibdato de amonio, y las que presentaron  $R_f$  semejantes o iguales se combinaron en una sola fracción.

### **Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)**

La CCFP es similar a la CCF con una variante en el espesor de la sílica, el cual fue ahora de 1 mm. Esta técnica se usó para separar las fracciones obtenidas en subfracciones y de esta forma purificar los metabolitos aislados del alga. Para la utilización de esta técnica, se aplicó una cantidad determinada y uniforme de la muestra sobre la placa preparativa, colocándose ésta, posteriormente, dentro del tanque cromatográfico que contenía las mezclas de solventes de elución empleados. Luego de desarrollada la cromatografía y visualizados los distintos  $R_f$  mediante la luz ultravioleta, se procedió a raspar la sílica de la placa de vidrio, de acuerdo con cada banda y los componentes fueron extraídos con un solvente apropiado.

## CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

La estructura de los metabolitos secundarios aislados se lograron elucidar mediante la aplicación de diversas técnicas espectroscópicas convencionales, tales como resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR) y cromatografía de gases con acoplamiento a un espectrómetro de masas (EM); además de la determinación de parámetros físicos tales como: puntos de fusión.

Las técnicas espectroscópicas implican la interacción de alguna forma de energía electromagnética con las moléculas, para producir un espectro que se interpreta, a fin de poner de manifiesto la presencia de grupos funcionales y rasgos estructurales característicos.

### Espectroscopia de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C

La RMN aporta información estructural importante acerca de las moléculas orgánicas. Es una de las técnicas más usadas en el campo de los productos naturales por su naturaleza no destructiva y es la que permite obtener una información más precisa y acertada, que la ofrecida por otras técnicas, al momento de elucidar la estructura de algún compuesto químico.

Esta técnica proporciona información sobre la estructura molecular, al examinar las propiedades magnéticas de átomos específicos de las moléculas. Los metabolitos aislados y/o fracciones obtenidas fueron analizados en un equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 400 MHz de la Universidad Simón Bolívar (U.S.B), así como también en el equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 300 MHz perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la obtención de estos espectros, las muestras fueron disueltas en un solvente deuterado y colocadas en un tubo de resonancia, el cual se introdujo en el equipo de RMN. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) obtenidos en los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, se reportaron en ppm relativo a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS). También, se empleó el experimento Distortionless Enhancement through Polarization Transfer (DEPT), ya que los espectros DEPT-135 permiten visualizar las resonancias de los CH<sub>3</sub> y CH como señales positivas,



mientras que las resonancias de CH<sub>2</sub> aparecen como señales negativas; es decir, como señales por debajo de la línea base.

Igualmente, se realizaron análisis de RMN bidimensionales utilizando experimentos como: HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherente) o HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity).

### **Espectroscopia infrarroja (IR)**

La radiación infrarroja corresponde a energías relacionadas con las vibraciones moleculares. Los espectrofotómetros de infrarrojo (IR) cubren las regiones de tensión y de deformación molecular, permitiendo observar la absorción por parte de las moléculas en estas regiones y, por ende, la obtención de las bandas que se observan en los espectros IR. El empleo de esta técnica, permitió la determinación de los grupos funcionales específicos correspondientes a bandas características. Basándose en esto, se mezclaron los compuestos aislados con KBr para preparar las pastillas respectivas o se disolvieron en CHCl<sub>3</sub>, dependiendo del estado físico y cantidad de la muestra, y se analizaron en un espectrofotómetro de IR con Transformada de Fourier (FT), marca Perkin Elmer del Instituto Universitario de Tecnología (IUT-Cumaná).

### **Cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM)**

La espectrometría de masas es el método más simple para determinar la masa molar de un compuesto, e incluso, la fórmula molecular correspondiente. La fragmentación, característica de cada clase de compuestos, es aprovechada para la ubicación de ciertos grupos funcionales en entornos particulares de las moléculas. El análisis de un espectro de masas consiste en relacionar los picos principales y en interpretarlos simultáneamente. La comparación con el espectro de una muestra conocida y el análisis del patrón de fragmentación es, por lo general, la manera como, finalmente, se obtiene la elucidación estructural del compuesto. Una de las grandes ventajas de este método, es que se necesita de pequeñas cantidades de sustancias para obtener el espectro. El análisis de mezclas complejas, se realizó mediante la

separación e identificación de los constituyentes mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM).

Distintas subfracciones procedentes de los extractos estudiados del alga *K. alvarezii*, fueron analizadas por esta técnica, ya que la misma proporciona una información valiosa acerca de los diferentes componentes presentes en las fracciones y subfracciones. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas por impacto electrónico (70 eV), se realizaron en el laboratorio de espectroscopia del instituto venezolano de investigación científica (IVIC). Siendo registrados en un CG-EM marca VARIAN modelo Saturno 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones. Se utilizó una columna de CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I y helio (He) como gas de arrastre. La temperatura del inyector fue de 280°C, la temperatura inicial del horno fue de 100 °C con una rapidez de calentamiento de 5 °C por minuto, hasta llegar a una temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST.

### **Constante física (punto de fusión)**

La pureza e identidad de una sustancia orgánica, puede quedar establecida cuando sus constantes físicas corresponden con las indicadas en la literatura. El punto de fusión también indica cual es la temperatura a la que se puede usar la muestra, sin que cambie su estado sólido.

En el desarrollo de esta investigación se midió el punto de fusión de una muestra, mediante la utilización de un fusiómetro eléctrico Stuart Scientific Cat. No. SMP3.

### **EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD**

Una parte indispensable en el proceso de investigación, fué la evaluación de la actividad letal y citotoxicidad de los extractos y fracciones del alga, en tal sentido, se realizaron los siguientes bioensayos:

### Actividad letal en *Artemia salina*

Para obtener los nauplios de *Artemia salina*, los quistes se colocaron con agua de mar bifiltrada en un envase de plástico con aeración continua y luz artificial durante 24 horas. La actividad letal, contra larvas del crustáceo se evaluó mediante la realización de un bioensayo en el cual se preparó, como se muestra en la Figura 3, una solución patrón de  $10\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  del extracto o fracción, en una mezcla de  $\text{H}_2\text{O}$  y dimetil sulfóxido (DMSO).

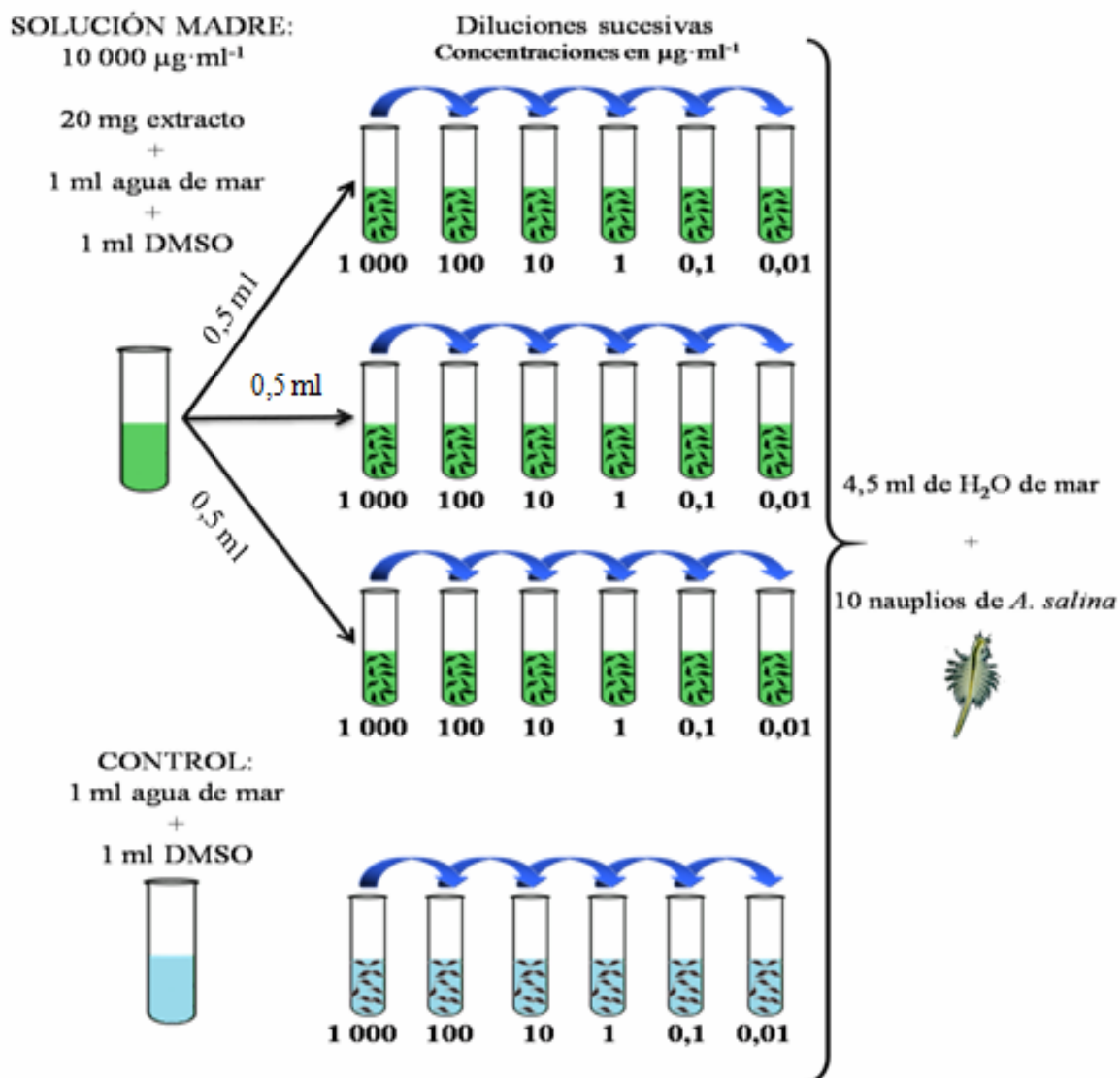


Figura 3. Esquema del bioensayo de letalidad de los extractos de *K. alvarezii* ante el crustáceo *A. salina*.

Según la solubilidad de cada uno de los extractos y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada en viales que contendrán 10 nauplios de *A. salina* eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 horas. El número de organismos muertos (depositados en el fondo del vial) en cada una de las concentraciones se determinó mediante su visualización a través una lupa estereoscópica y fueron analizadas usando diversos métodos estadísticos (Binomial, Moving Average, Probit y Logit), para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) (62, 63).

#### **Actividad letal en *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae)**

Las larvas de *L. vannamei* fueron proporcionadas por la empresa Acuamarina de la Costa, ubicada en Santa Fé, estado Sucre. El agua de dilución consistió en agua de mar natural, filtrada y colocada en un sistema recirculante con carbón activado por espacio de 2 semanas en el laboratorio.

Para la realización del bioensayo, se disolvieron 25 mg de extracto en 1 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada con 500  $\mu\text{l}$  de DMSO para obtener una solución madre 25 000  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , a partir de la cual se prepararon soluciones seriadas de exposición de 1 000, 100, 10, 1 y 0,1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , en viales de vidrio con volumen final de 10 ml. Se colocaron 2 réplicas con 5 individuos para un total de 10 individuos por concentración, utilizando un control sin DMSO y un control con DMSO (Figura 4).

Los bioensayos estáticos se mantuvieron por espacio de 96 h en condiciones de laboratorio. Las larvas fueron alimentadas diariamente con nauplios de *Artemia franciscana* recién eclosionados. Al final de los bioensayos, se realizó un conteo del número de larvas vivas y muertas en cada envase de prueba, analizándolas posteriormente, usando diversos métodos estadísticos (Binomial, Moving Average, Probit y Logit), para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) (62, 63).

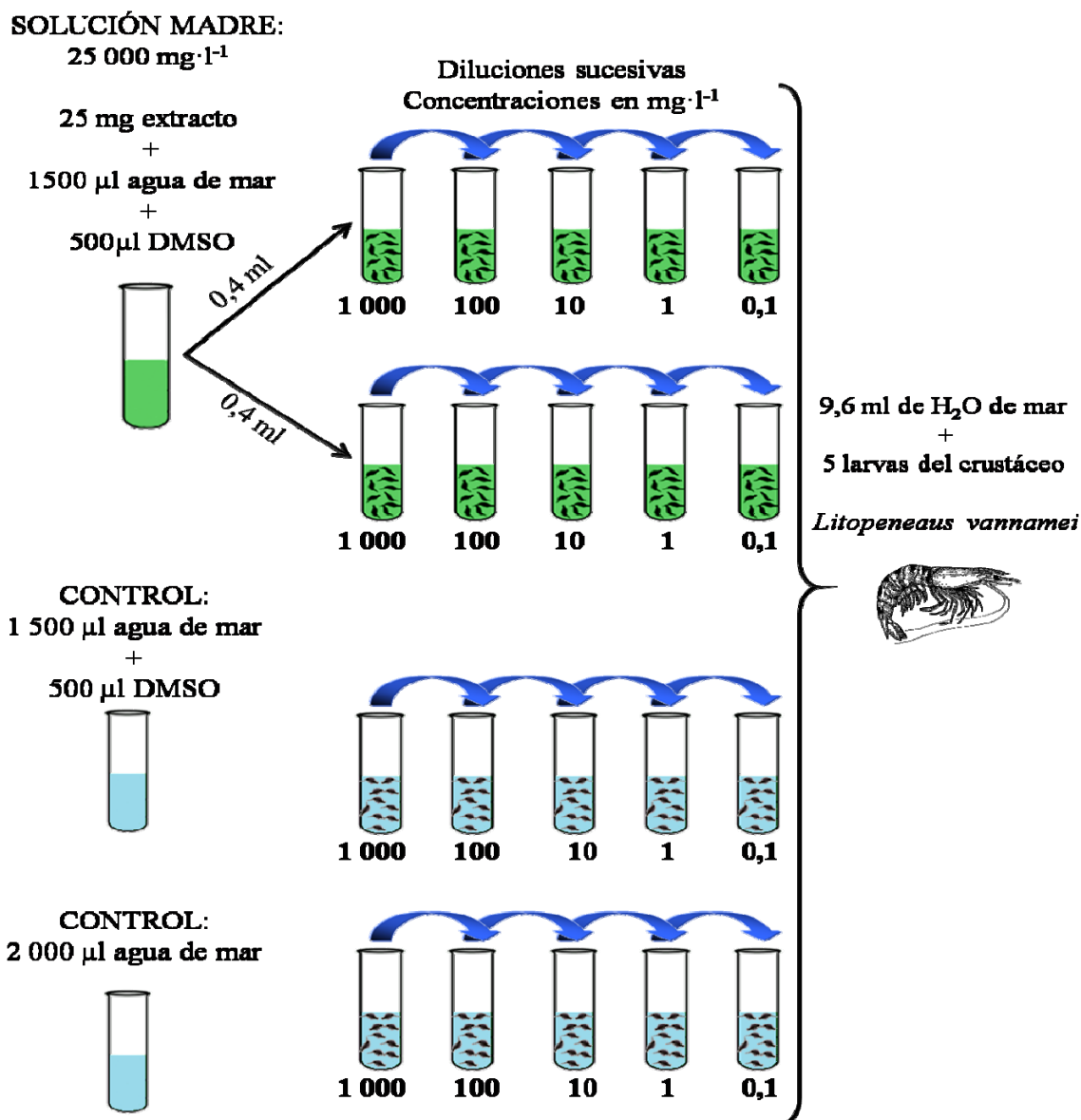


Figura 4. Esquema del bioensayo de letalidad de los extractos de *K. alvarezii* ante el crustáceo *L. vannamei*.

#### Citotoxicidad con huevos de erizo de mar *Echinometra lucunter*

Para este bioensayo, se colectaron manualmente ejemplares del erizo de mar *Echinometra lucunter* en la Estación Hidrobiológica de Turpialito, Cumaná, estado Sucre, los cuales se trasladaron hasta el laboratorio de Fisiología y Ecología Química del Instituto Oceanográfico de Venezuela, mantenidos en agua de mar y con aireación continua. Una vez en el laboratorio, para provocar la expulsión de los gametos, se

inocularon en tres puntos diferentes de la región peribucal con 1 ml de KCl al 5 M; posteriormente, se invirtieron los ejemplares y se colocaron sobre una cápsula de Petri con agua de mar para coleccionar los gametos. Seguidamente, se lavaron las células femeninas (óvulos), colocándolos en una probeta con 500 ml de agua de mar, para que perdieran gradualmente la capa gelatinosa que las recubría, se dejó transcurrir 20 min para decantar los óvulos. Luego se descartó un poco de agua de mar hasta tener un total de 100 ml. Aparte, en un vaso de precipitado se recolectaron los gametos masculinos, como se puede observar en el esquema de la Figura 5.

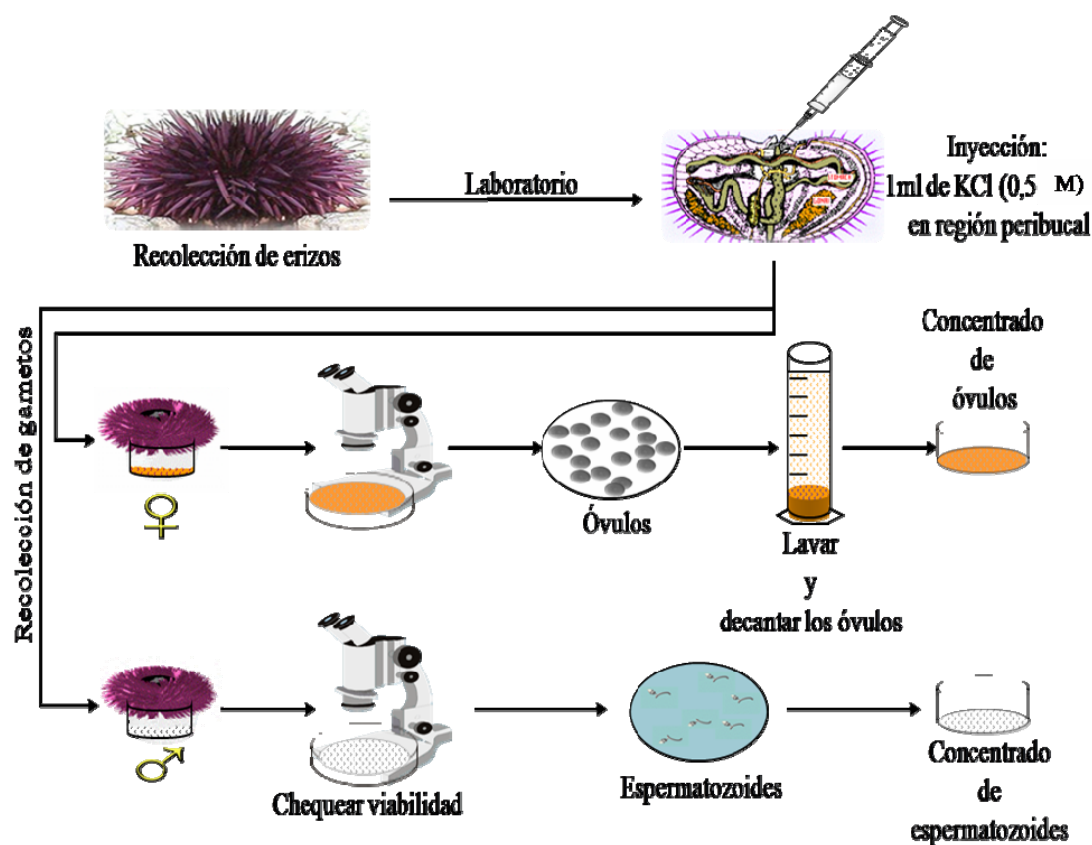


Figura 5. Esquema de recolección de gametos de los erizos de mar *E. lucunter*.

Como control del bioensayo citotóxico se colocaron en viales, 100  $\mu$ l de esperma, 100  $\mu$ l de agua de mar y 1 800  $\mu$ l de óvulos. La solución madre se preparó pesando 12,5 mg del extracto y disolviéndolo en 1,25 ml de DMSO, equivalente a una

concentración de  $10\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Igualmente, se prepararon concentraciones de 500, 250, 125, 75 y  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , transfiriendo 100, 50, 25, 15 y  $2\ \mu\text{l}$  de la concentración más elevada y se completaron con agua de mar hasta  $2\ 000\ \mu\text{l}$  para cada vial. A todas las concentraciones se les agregó la misma cantidad de gametos masculinos  $100\ \mu\text{l}$  y femeninos  $1\ 800\ \mu\text{l}$ , como se puede observar en la Figura 6. Se realizaron 3 réplicas para el control y para cada una de las concentraciones. Además, se realizó un control de solvente con DMSO, ya que los extractos fueron disueltos en éste. Se espero que transcurrieran 3 minutos para observar los procesos de fecundación y posteriormente la segmentación, blastulación, gastrulación y las eventuales anomalías producidas por los extractos a ensayar. El conteo se realizó bajo microscopio binocular escogiendo 7 campos al azar. En los experimentos donde se probaron los extractos, se conto el número de huevos sin fertilizar y el número de cigotos con alteraciones en su desarrollo embrionario, expresados en porcentaje.

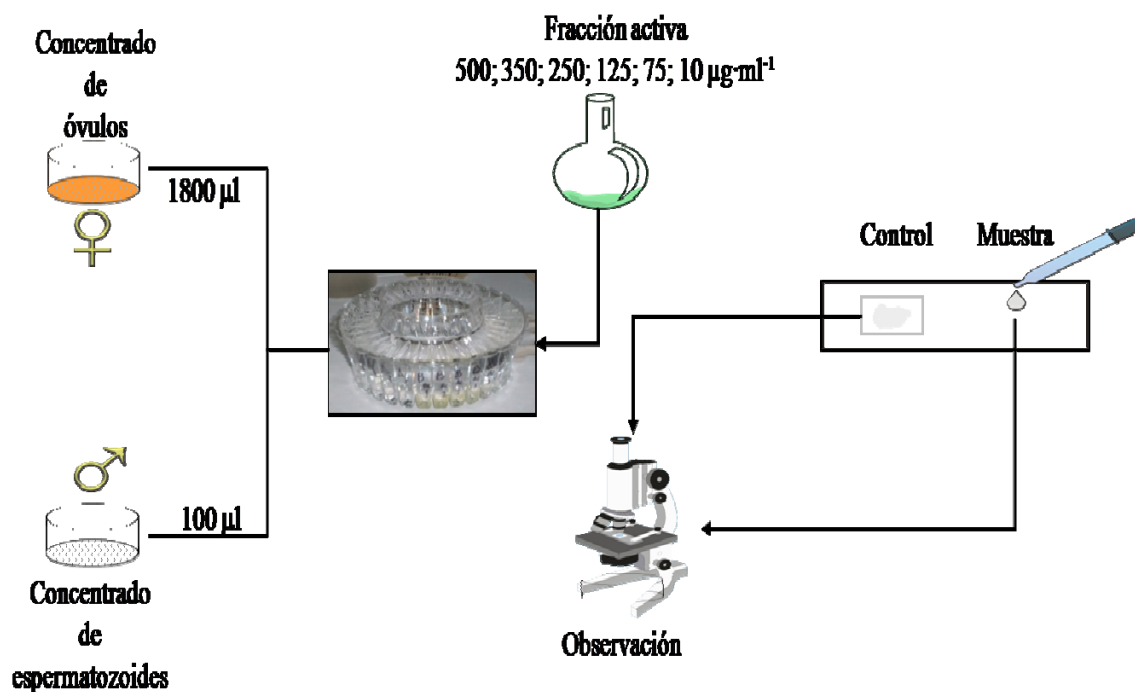


Figura 6. Esquema del bioensayo de citotoxicidad de los extractos de *K. alvarezii* frente a *E. lucunter*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DEL ALGA

#### *Kappaphycus alvarezii*

Para el inicio del desarrollo de este trabajo investigativo, se realizó un proceso de extracción con las muestras del alga previamente lavadas, deshidratadas y molidas. Es importante resaltar que para la conservación de las muestras algales, las condiciones de almacenamiento fueron muy controladas para evitar alteraciones posteriores. El almacenamiento se realizó en un lugar fresco, sabiendo que la temperatura es un factor importante en la conservación debido a que el calor puede producir pérdidas y alteración de los principios bioactivos. La molturación de las muestras se efectuó para poder extraer adecuadamente sus metabolitos activos, obteniéndose un polvo de aspecto “grueso”, pues los polvos finos forman barro e impiden la adecuada extracción. A su vez, se resguardo de la luz para que no se produjeran decoloraciones y procesos de degradación del alga, causados principalmente por la luz ultravioleta.

El proceso de extracción se llevó a cabo con diferentes solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y por último metanol, para poder obtener extractos con diferentes polaridades, arrastrando metabolitos secundarios con diferente polaridad; lográndose así una separación inicial-parcial, facilitando la eficacia en el desarrollo de las técnicas de separación aplicadas posteriormente. Los principios activos suelen encontrarse en el alga en muy bajas concentraciones, por lo que se trató de realizar una buena extracción de los mismos, ya que si ésta es deficiente, se podría dar como negativo a un resultado que es positivo. Otro aspecto importante es el tiempo de extracción, que ha de ser suficiente, ya que puede darse un resultado como falso negativo, en el caso de que el tiempo sea demasiado corto. Para evitar esto se realizaron dos extracciones con cada solvente, la primera de un período de 72 horas y la segunda de 48 horas.

De cada uno de los extractos crudos se obtuvo su masa, obteniéndose 1,35 g de extracto en éter de petróleo; 1,40 g de extracto en cloroformo; 0,81 g de extracto en acetato de etilo y 4,32 g de extracto en metanol. Para cada una de estas masas se



determinó el rendimiento porcentual, respecto a la muestra algal deshidratada (molida), utilizada desde el inicio de las extracciones, obteniéndose los rendimientos porcentuales para cada uno de los extractos crudos, expresados en la Tabla 1. Es de notar entre todos los porcentajes obtenidos, la relevancia del rendimiento del extracto en metanol, considerando el hecho de que por ser un organismo marino presentó un alto contenido de sales marinas y agua, por lo cual se tuvieron que realizar tres extracciones por partición para lograr eliminar, en su mayoría, el contenido de éstas en el extracto, permitiendo deducir, a pesar de las pérdidas de masa, la presencia de compuestos mayoritariamente polares en el alga. Mientras que para el extracto en acetato de etilo, se obtuvo el menor rendimiento, indicando que la gran mayoría de los metabolitos poco polares ya habían sido extraídos con los primeros solventes y los compuestos químicos de polaridad intermedia, se obtuvieron en el extracto en acetato de etilo.

Todos estos resultados se encuentran tabulados en la Tabla 1, a continuación el rendimiento porcentual de los extractos, respecto a la masa de la muestra algal (deshidratada y molida), así como la masa de cada extracto crudo.

Tabla 1. Rendimientos porcentuales de los diferentes extractos crudos.

<b>Muestra algal (g)</b>	<b>Extractos</b>	<b>m<sub>EC</sub> (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
305,30	EEP	1,35	0,44
	EC	1,40	0,46
	EAE	0,81	0,26
	EM	4,32	1,41

EEP: Extracto en éter de petróleo, EC: Extracto en cloroformo, EAE: Extracto en acetato de etilo, EM: Extracto en metanol, m<sub>EC</sub>: masa del extracto crudo.

## **ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR**

Las algas tienen un contenido variable de principios bioactivos y su importancia terapéutica radica en la presencia de familias de compuestos químicos que poseen propiedades farmacológicas variadas. La lista de esta familia de compuestos es amplia y variada, por lo que en esta oportunidad se efectuaron algunas pruebas químicas, para identificar las familias de metabolitos de mayor importancia para la industria farmacéutica. Con cada uno de los diferentes extractos crudos (EEP, EC, EAE, EM) se

ensayaron una serie de reacciones analíticas encaminadas a poner de manifiesto, de forma cualitativa, la presencia de los distintos grupos fitoquímicos que caracterizan a los extractos objeto de esta investigación. Estos ensayos se ejecutaron, una vez redisoluertos los extractos secos en su correspondiente disolvente de extracción, de acuerdo con la solubilidad de los grupos investigados. Es fundamental añadir en todos los casos el reactivo gota a gota, ya que un exceso del mismo puede ocasionar una coloración muy intensa o una redisolución del precipitado en su caso.

El estudio fitoquímico, realizado a los diferentes extractos crudos para detectar la presencia de los metabolitos secundarios, se encuentra resumido en la Tabla 2, resultando positiva la presencia de esteroides insaturados en todos los extractos; sin embargo, los extractos en éter de petróleo (EEP) y metanólico (EM) mostraron la presencia de alcaloides; a diferencia de los extractos en cloroformo (EC) y acetato de etilo (EAE), los cuales dieron positiva la prueba para triterpenos pentacíclicos.

Tabla 2. Familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos de *K. alvarezii*. detectados a través de pruebas químicas.

<b>Familia de metabolitos</b>	<b>Prueba</b>	<b>Prueba positiva</b>	<b>EEP</b>	<b>EC</b>	<b>EAE</b>	<b>EM</b>
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado naranja	+	-	-	+
Antraquinonas	Bornträger	Roja capa alcalina	-	-	-	-
Esteroides insaturados	Liebermann-Burchard	Coloración azul	+	+	+	+
Flavonoides	Shinoda	Coloración roja	-	-	-	-
Glicósidos cianogénicos	Grignard	Manchas rojas	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	Azul o violeta	-	-	-	-
Metilencetonas	Baljet	Coloración roja	-	-	-	-
Polifenoles	Cloruro de Fe (II)	Coloración parda	-	-	-	-
Saponinas	Espuma	Espuma	-	-	-	-
Taninos	Gelatina-sal	Precipitado blanco	-	-	-	-
Triterpenos pentacíclicos	Liebermann-Burchard	Coloración roja	-	+	+	-

(+): Detectado      (-): No detectado

También hay que destacar que determinar la ausencia de una familia de compuestos en un extracto dado, mediante la aplicación de una determinada prueba fitoquímica, no es suficiente para negar su presencia, porque quizás las pruebas de detección aplicadas no fueron las más adecuadas o simplemente que la concentración del metabolito secundario no es lo suficientemente alta en la especie o bien porque el método de extracción no es el más indicado.

Los constituyentes de las algas marinas incluyen: ácidos carboxílicos, alcaloides, aminas, celulosa, enzimas, glicósidos, lípidos, esteroides, compuestos fenólicos, aminoácidos, proteínas, vitaminas, alcoholes, péptidos, minerales y tanto sustancias tóxicas como con actividad antibacteriana, antibiótica, antifungales y antivirales (64). Entre los diferentes compuestos con propiedades funcionales, los antioxidantes son los más estudiados (65).

Mediante el ensayo de Liebermann-Burchard, se pudo establecer la posible presencia de esteroides y triterpenos en el alga, al añadir las gotas de ácido sulfúrico la solución se tornó rojiza. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, la misma es muy utilizada. Algunos autores aseguran que la dan positiva solamente los esteroides que tengan en su estructura grupos dieno conjugados reales o potenciales. Respecto a la posible presencia de triterpenos, se puede señalar que se han aislado numerosos compuestos de este tipo a partir de invertebrados marinos, quienes han presentado propiedades citotóxicas ante líneas celulares humanas en ensayos *in vitro* (66).

Los esteroides son una importante familia de lípidos, presentes en la mayoría de las células. Debido a las diferentes vías de síntesis, los esteroides de las plantas, hongos y animales, muestran marcadas diferencias. A los esteroides se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas esteroidales), como ésteres o como glicósidos. Todos contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el C-3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de carbono y un enlace doble en el C-5. Las algas rojas han sido conocidas por ser fuentes importantes de colesterol y desmosterol (66).

Estudios confirman que los ácidos grasos y esteroides de clases de algas, familias y a veces incluso especies, son característicos de los taxones en particular y podrían ser

útiles como indicadores taxonómicos. El conocimiento de la biosíntesis de esteroides ha contribuido al desarrollo de la quimiotaxonomía vegetal, particularmente en el caso de las algas, y ha servido para correlacionar la estructura de estas sustancias con aspectos evolutivos (67). Aunque a los esteroides naturales no se les conocen actividades biológicas específicas fuera de las funciones biológicas citadas al principio, se ha reportado la acción antipirética del 24-etilcolesta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol (asterosterol) presente en el ajenojo *Artemisia absinthium* (Compositae) en conejos, y se ha informado la presencia de esteroides citotóxicos en algas rojas, especialmente esteroides oxigenados en la cadena lateral; otros polihidroxiesteroides de corales blandos presentan acción citotóxica (66).

Con el empleo de la prueba de Dragendorff, se estableció la posible presencia de alcaloides en algunos de los extractos (EEP y EM), al formarse un precipitado naranja rojizo. Un grupo de metabolitos secundarios de gran importancia, es el conformado por los alcaloides, lo cual se debe a que presentan actividad contra una gran cantidad de herbívoros provenientes de diferentes familias. De igual manera, han demostrado presentar actividad en el cuerpo humano, aunque no siempre benéfica (67).

Los alcaloides se encuentran poco distribuidos en el reino vegetal, sin embargo presentan actividad en contra de la mayoría de especímenes representativos de las diferentes familias de artrópodos. Actualmente existen más de 12 mil alcaloides conocidos con actividad farmacológica significativa y su número aumenta constantemente. Desde el punto de vista semisintético, desempeñan un valioso papel en la obtención de fármacos indicados en el tratamiento de procesos neoplásicos. A pesar de sus estructuras distintas, poseen propiedades fisiológicas y toxicológicas que se ejercen fundamentalmente sobre el sistema nervioso central, con predominio en alguno de sus niveles (68-69).

### **PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS CON LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *K. alvarezii***

Las algas viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por las interacciones con otros organismos (efectos sinérgicos o antagónicos) como

por las características físicas y químicas de su entorno. Como consecuencia de esas interacciones, se producen metabolitos secundarios, con actividades biológicas variadas, que juegan un papel importante en su sobrevivencia.

Unas de las tecnologías de vital importancia para el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos de origen natural, son los ensayos biológicos (70). En las últimas décadas, se han incorporado algunos ensayos de gran utilidad y eficacia que requieren pequeñas cantidades de muestras y permiten la evaluación rápida de extractos crudos y fracciones, conduciendo con seguridad a los principios activos y descartando todo lo que no sea de interés. Hay que indicar claramente la diferencia entre un estudio de productos naturales convencional, cuyo objetivo es el conocimiento de los componentes químicos de una planta, y la búsqueda de nuevos productos bioactivos que depende siempre de los ensayos biológicos que guían el fraccionamiento biodirigido y el aislamiento final de estos principios. En muchas ocasiones, el factor clave que ha impedido el descubrimiento rápido de nuevos constituyentes bioactivos, ha sido el uso insuficiente e inadecuado de la tecnología del bioensayo (70-72).

#### **Actividad tóxica de *K. alvarezii* frente al crustáceo *Artemia salina***


Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos de toxicidad más utilizados, lo ocupa el ensayo de *Artemia* spp. Fue en 1982, cuando se incorporó el uso de las larvas de *Artemia salina* en sustitución de animales superiores en la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con bioactividad (62). El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se empleó *A. salina* para este bioensayo.

Las concentraciones letales media ( $CL_{50}$ ) de los extractos crudos del alga *K. alvarezii* frente a *Artemia salina*, luego de 24 y 48 horas de exposición, se muestran en la Tabla 3. Al haber transcurrido las primeras 24 horas ya se observaba un efecto tóxico de los extractos del alga en las larvas. El resultado de mortalidad de las larvas significa la existencia de grupos de compuestos potencialmente activos. El  $CL_{50}$  obtenido para el extracto crudo en acetato de etilo de ( $6,85 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), permite posicionarlo como un blanco para posteriores estudios farmacológicos con los cuales se puedan aprovechar las

propiedades terapéuticas que se le adjudican a *K. alvarezii*. Un extracto o sustancia es considerada potencialmente útil como citotóxico, cuando su  $CL_{50}$  es  $\leq 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (62 y 73), aunque un  $CL_{50} < 1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  se considera significativo o no despreciable. Cabe mencionar que el bioensayo basado en nauplios de *A. salina* presenta una correlación positiva con la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388) (leucemia *in vivo*) (70). También se ha empleado este ensayo con éxito en la búsqueda de compuestos citotóxicos del tipo de las acetogeninas (74).

Por otro lado, el extracto en cloroformo presentó el mayor  $CL_{50}$  a las 48 horas ( $461,82 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); esta concentración letal media es baja en comparación con la que exhibió el EAE. Considerando el efecto tóxico de todos los extractos ante el crustáceo y analizando los valores de  $CL_{50}$  obtenidos, se puede inferir que todos son significativos y posiblemente letales, debido a que se encuentran en el rango de  $100-1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tabla 3. Actividad biotóxica de los extractos crudos de *K. alvarezii* contra *A. salina*.

Crustáceo	Extracto	$CL_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$		Intervalo de confianza 95%
		24 horas	48 horas	
 <i>salina</i>	EEP	860,72	363,89	100-1000
	EC	945,23	461,82	100-1000
	EAE	784,15	6,85	0,10-1000
	EM	816,30	152,88	96,6-253,73

EEP: Extracto en éter de petróleo, EC: Extracto en cloroformo, EAE: Extracto en acetato de etilo, EM: Extracto en metanol,  $m_{EC}$ : masa del extracto crudo.

De acuerdo a los resultados obtenidos del efecto de toxicidad de los extractos de *K. alvarezii* frente a éste crustáceo, se pudo comprobar que es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los extractos en las larvas de *A. salina* y así predecir un efecto potencial primario de los compuestos químicos, presentes en los extractos. Pudiendo dar inicio a estudios posteriores en líneas celulares cancerígenas en

cultivos de tejidos, efecto insecticida o pesticida y ejercer un amplio rango de actividades farmacológicas (71-72).


#### **Actividad tóxica de *K. alvarezii* frente a *Litopenaeus vannamei***

Otra prueba de actividad biológica ampliamente usada es la de letalidad aguda ( $CL_{50}$ ) con *L. vannamei*, conocido comúnmente como “camarón blanco”. Este ensayo se centró en la evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos bioactivos presentes en el alga frente a las postlarvas (PL-5) juveniles de los camarones peneidos. Estos estadios se proponen como organismos de prueba, comúnmente para evaluar el efecto tóxico de contaminantes en ambientes lagunares-estuarinos (75). Evidencia directa demuestra que las postlarvas juveniles de la especie *L. vannamei* son sensibles al efecto tóxico de compuestos nitrogenados (76-78), a los metales pesados (79), a plaguicidas, bifenilos policlorinados y a fluidos de perforación del petróleo, entre otros compuestos químicos. El mecanismo innato de defensa de los artrópodos está basado en la inmunidad humoral (situación de estrés) y celular (80).

Al transcurrir los 4 días (96 horas) de exposición de las larvas en los extractos de *K. alvarezii*, se procedió a determinar la actividad biológica. En la Tabla 4 se observa que todos los extractos mostraron ( $CL_{50} < 1000 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), siendo más activos los extractos EEP y EM con valores de  $CL_{50}$  iguales a 29,16 y 49,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  respectivamente. En base a estos resultados, queda confirmado con mayor firmeza la presencia de compuestos químicos con propiedades farmacológicas en esta alga y particularmente en estos dos extractos. En los bioensayos de toxicidad es posible realizar un análisis homogéneo de la población muestreada y obtener un valor correcto de la concentración letal junto a los límites de confianza de esos valores. Si la población de los organismos vivos es heterogénea, la mortalidad a diferentes concentraciones producida por una toxina, puede ser significativamente desigual. Por esta razón las mayores determinaciones de concentraciones letales, son reportadas solamente con un rango de valores entre los cuales la verdadera concentración es para el 50 % de mortalidad  $CL_{50}$  (89). El estrés oxidativo es un factor importante en la génesis de la patología del cáncer, las enfermedades cardiovasculares y degenerativas, lo cual sugiere

la utilidad de *K. alvarezzi* para varios productos nutricionales, incluyendo antioxidantes para la salud y alimentos o suplementos nutracéuticos (65).

Tabla 4. Actividad biotóxica de los extractos crudos de *K. alvarezii* contra *L. vannamei*.

Crustáceo	Extracto	CL <sub>50</sub> (µg·ml <sup>-1</sup> ) (96 horas)	Método	Intervalo de confianza (95%)
<i>L. vannamei</i>	 EEP	29,16	Probit	5,54 - 84,93
	EC	134,74	Moving Average	50,75 - 421,13
	EAE	208,98	Logit	86,68 - 858,40
	EM	49,5	Probit	18,73 - 127,43

#### Citotoxicidad de los extractos crudos en células de erizos de mar *Echinometra lucunter*.

Actualmente, algunos fármacos obtenidos de organismos marinos han mostrado resultados prometedores en diversas fases de las enfermedades cancerígenas. Las capacidades metabólicas y fisiológicas de los organismos marinos que les permiten sobrevivir en un hábitat complejo, les confieren un enorme potencial para la producción de metabolitos únicos que no se encuentran en ambientes terrestres. Entre estos organismos, las algas se reconocen también como una de las fuentes más ricas en compuestos bioactivos nuevos (3).

El bioensayo de citotoxicidad en el erizo de mar muestra ser una prueba muy rápida, que es utilizada como un método *screening* genotóxico-teratogénico para sustancias aisladas o mezclas complejas a partir de los extractos vegetales. Un número de factores hacen este sistema adecuado para conducir una amplia gama de pruebas biológicas. Estos incluyen: desove, fertilización, desarrollo sincronizado y embriogénesis (81).

Los efectos citotóxicos fueron evaluados observando el proceso desde la formación del cigoto hasta la etapa de gastrulación del erizo de mar. Y también fueron evidenciadas algunas anomalías durante el desarrollo embrionario. Para verificar la viabilidad del ensayo se observó por separado los gametos (óvulos y espermatozoides)



después de la unión de éstos, se verificó que el porcentaje de fertilización fue aproximadamente de un 98%, demostrando la confiabilidad del ensayo (control, Figura 7). El efecto de los extractos en los embriones del erizo de mar *E. lucunter*, en el desarrollo celular, se puede apreciar en la Figura 8.

Los cuatro extractos (EEP, EC, EAE, EM) produjeron citotoxicidad y alteraciones citológicas importantes en los embriones del erizo de mar, tales como anomalías morfológicas, lisis de blástulas y exogastrulación. Los daños citológicos observados fueron diferencias en tamaño de los blastómeros, desincronización del clivaje temprano y diferentes densidades ópticas de éstos. El porcentaje de fertilización que presentaron las células del erizo de mar fue de 95%, es decir, los extractos no mostraron un efecto inhibitorio de la formación de la membrana de fecundación de los cigotos. La presencia de compuestos citotóxicos en el alga, se observó al comienzo de los procesos de segmentación.

Hasta el presente, solo existía un estudio de citotoxicidad de *K. alvarezii* en el cual con el extracto soluble en acetato de etilo no se evidenció una gran capacidad inhibitoria del proceso de división celular del erizo de mar *Lytechinus variegatus* (59). En base a este reporte y a los efectos citotóxicos de los extractos del alga observados en las células del erizo de mar *E. lucunter* (presente estudio), se puede considerar a *K. alvarezii* como un alga promisoría para futuras investigaciones. Es importante destacar que al ser los extractos una mezcla de varios compuestos, el efecto citotóxico podría ser el resultado de la acción conjunta de dos o más compuestos actuando sinérgicamente.

En relación con su prometedora actividad para el tratamiento del cáncer, se ha encontrado que varias especies de algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad antitumoral (3). Los polisacáridos extraídos de *Sargassum stenophyllum* y de *Capsosiphon fulvescens* inhibieron la migración y la viabilidad de las células de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* (82) y la inducción de apoptosis en células gástricas humanas (83), respectivamente. Los fucanos de baja masa molecular extraídos de *Ascophyllum nodosum* mostraron actividad antiproliferativa contra el adenocarcinoma de colon humano (84). Por otro lado, los esteroides aislados de *Galaxaura marginata* y de

*Galaxaura oblongata* han demostrado ser citotóxicos a varios tipos de células de cáncer (85 y 86).

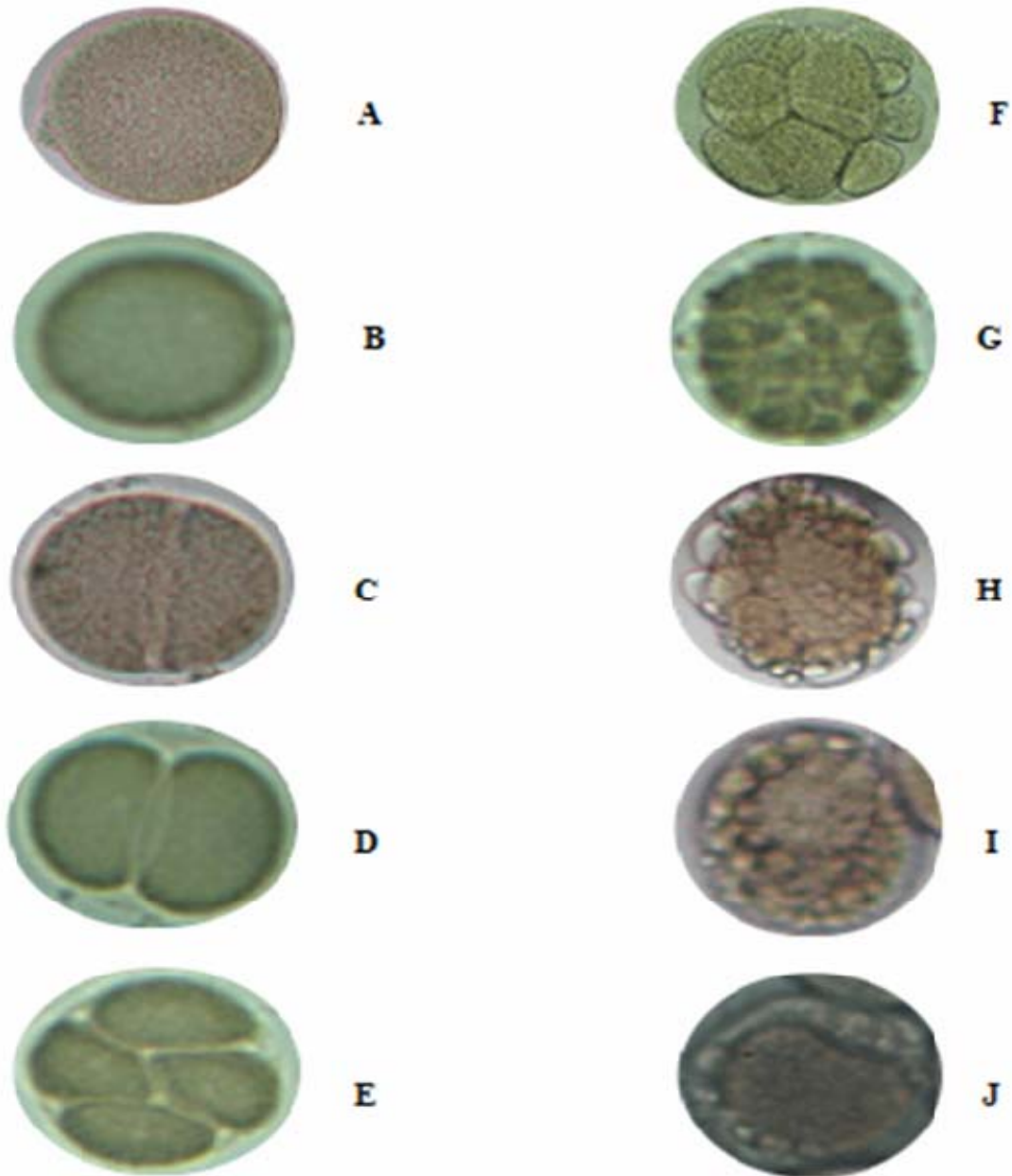


Figura 7. Control del bioensayo del desarrollo embrionario del erizo de mar *E. lucunter*. **A-B**: formación de la membrana de fecundación. Distintas etapas de división celular, **C**: inicio de la división del cigoto; **D**: formación de 2 blastómeros; **E**: huevo dividido en 4 blastómeros; **F**: célula dividida en 8 blastómeros, comenzando su división en 16; **G**: mórula; **H e I**: blástulas; **J**: gástrula.

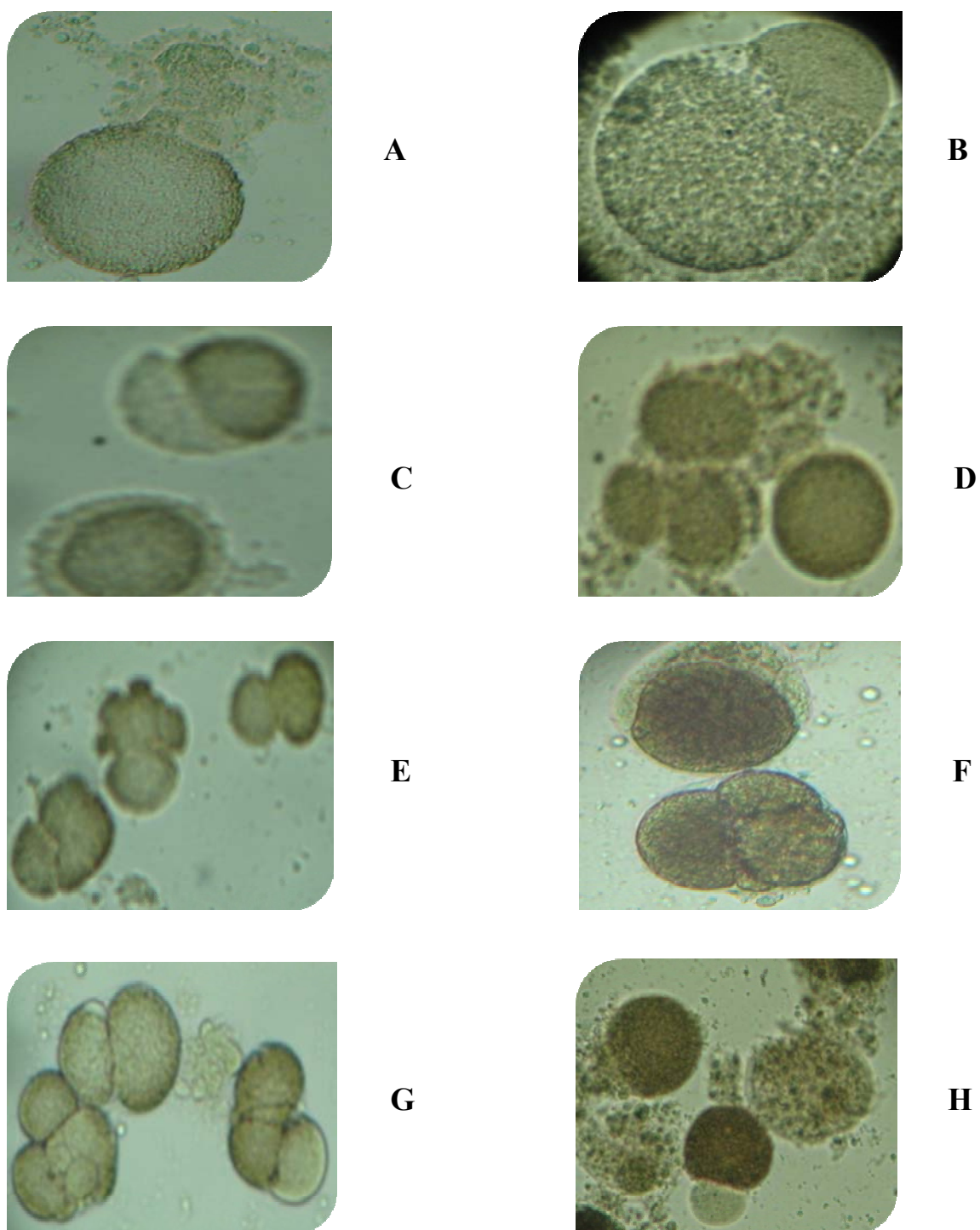


Figura 8. Efectos citotóxico de los extractos de *K. alvarezii*, frente al desarrollo embrionario del erizo de mar *E. lucunter*. **A-C**: células expulsando su contenido citoplasmático (lisis); **C**: diferencia de densidad óptica; **D-G**: sincronización alterada en la división celular; **H**: diferente densidad óptica.

Además, el incremento de los estudios en modelos con roedores han mostrado una prometedora actividad en especies de algas rojas y verdes contra la carcinogénesis de mama (87), intestinal y de la piel. De hecho, el consumo de algas se ha sugerido como agente quimiopreventivo contra el cáncer de mama (88). Estos hallazgos permiten continuar la realización de experimentos biológicos, para evaluar los efectos farmacológicos de estos extractos para esta especie que crece en nuestro país.

## **FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS**

Entre los métodos más empleados a nivel mundial, la cromatografía tiene lugar prioritario, teniendo aplicabilidad en todas las ramas de la ciencia tanto para la separación como para la purificación de extractos y finalmente de los compuestos químicos. Siendo ésta una de las principales técnicas de separación empleada en este trabajo, permitiendo el aislamiento de algunos compuestos bioactivos, en los diferentes extractos del alga *K. alvarezii*, lográndose identificarlos mediante distintas técnicas espectroscópicas y espectrométrica.

### **Fraccionamiento del extracto crudo en éter de petróleo de *K. alvarezii***

El extracto soluble en éter de petróleo (EEP) fue fraccionado por cromatografía de columna (CC), en una columna de vidrio de 1,5 cm de diámetro y 50 cm de alto, la cual se relleno con sílica gel 35-70 mesh (0,2-0,5 mm), utilizando como solvente de empaquetamiento éter de petróleo. Para ello se empleó una relación 1:50 (g de muestra: g sílica gel) debido a la poca cantidad de extracto, utilizándose 1,35 g del extracto crudo y 67,50 g de sílica gel. La cromatografía fue iniciada con una mezcla poco polar de éter de petróleo-AcOEt 9:1 V/V y luego, se eluyó con mezclas de polaridad creciente finalizándose con MeOH al 100%. Se colectaron 62 eluatos contentivos de 25 ml cada uno (Tabla 5), los cuales fueron agrupados en 12 fracciones, tomando en cuenta su comportamiento en la cromatografía de capa fina (CCF) por comparación de sus  $R_f$ . Como agentes reveladores se utilizó luz ultravioleta de longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución ácida de molibdato de amonio (MAH).

Subsecuentemente, se combinaron los eluatos en un total de 12 fracciones, según sus  $R_f$  como se muestra en la Tabla 6. El material orgánico recuperado en la CC de la EEP fue de 1,18 g (87,33%) indicando un rendimiento moderado del material cromatografiado. Sin embargo, los solventes utilizados pudieron estar actuando como contaminantes afectando las masas respectivas de las fracciones, ya sea al no eliminarse completamente (quedando atrapados o disueltos en la matriz de la fracción) o proporcionando humedad a las mismas.

Tabla 5. Fraccionamiento del extracto soluble en éter de petróleo del alga *K. alvarezii*.

<b>Eluatos</b>	<b>Eluyentes</b>	<b>Porcentaje (%) V/V</b>
1 – 20	éter de petróleo – AcOEt	90-10
21 – 27	éter de petróleo – AcOEt	80-20
28 – 33	éter de petróleo – AcOEt	60-40
34 – 42	éter de petróleo – AcOEt	40-60
43 – 48	AcOEt	100
49 – 52	AcOEt – Me <sub>2</sub> CO	50-50
53 – 55	Me <sub>2</sub> CO	100
56 – 62	MeOH	100

Tabla 6. Fracciones obtenidas de la CCF de los eluatos de EEP.

<b>Fracción</b>	<b>Eluatos</b>	<b>Característica</b>	<b>Masa (mg)</b>
EP <sub>1</sub>	1-3	Aceite amarillo claro	54,60
EP <sub>2</sub>	4-6	Aceite amarillo claro	63,30
EP <sub>3</sub>	7-8	Sólido amorfo amarillento	48,70
EP <sub>4</sub>	9-10	Sólido blanco	41,20
EP <sub>5</sub>	11-12	Sólido amorfo amarillento	35,60
EP <sub>6</sub>	13-20	Sólido amorfo amarillento	175,90
EP <sub>7</sub>	21-27	Sólido amorfo verdoso	120,40
EP <sub>8</sub>	28-42	Aceite amarillo claro	76,40
EP <sub>9</sub>	43-48	Aceite amarillo claro con sólido amorfo	100,30
EP <sub>10</sub>	49-56	Sólido amarillo en solución verde	153,70
EP <sub>11</sub>	57	Solución verde con sólido suspendido	94,10
EP <sub>12</sub>	58-62	Gomoso y amarillo	215,30

Posteriormente, las distintas fracciones se analizaron mediante CCF para visualizar los posibles metabolitos que podían ser aislados, en base a la información

obtenida por dicha técnica y además, por los rendimientos obtenidos y las solubilidades que presentaron los eluatos de cada fracción en la CC, se seleccionaron las fracciones EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub>, EP<sub>6</sub>, EP<sub>8</sub> y EP<sub>11</sub>, para ser analizadas y determinar cuales cromatografiar. Por otro lado, las demás fracciones no fueron tomadas en cuenta como objeto de estudio, ya que mostraban ser mezclas de compuestos con R<sub>f</sub> muy próximos, lo que dificultaba su separación. Se decidió unir la dos primeras fracciones EP<sub>1</sub> y EP<sub>2</sub> en una sola fracción denominada como X, porque en sus revelados presentaron manchas definidas y con R<sub>f</sub> similares y muy cercanos. En la Figura 9 se muestra el diagrama de fraccionamiento completo del EEP.

Con la finalidad de llevar a cabo un trabajo biodirigido, se le realizó el bioensayo de letalidad frente al crustáceo *A. salina* a las seis fracciones escogidas, para tener un conocimiento de las fracciones más bioactivas del extracto soluble en éter de petróleo y así establecer cual cromatografiar, considerando también sus características y propiedades. Todas las fracciones mostraron ser letales, siendo la fracción X la que presentó un menor CL<sub>50</sub> de 637,24 µg·ml<sup>-1</sup>, seguida por las fracciones EP<sub>11</sub> y EP<sub>4</sub> con CL<sub>50</sub> de 753,63 µg·ml<sup>-1</sup> y 784,62 µg·ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla A1- Apéndice A).

La fracción X (aceite amarillo claro) fue analizada por espectroscopia infrarroja, con la finalidad de observar los grupos funcionales presentes en la muestra, su espectro IR (Figura 10) presentó las siguientes bandas de absorción: 3 550 cm<sup>-1</sup> (vibraciones de tensión -O-H) indicando grupos hidroxilos presentes en la molécula; alrededor de los 2 880-3 110 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las frecuencias de estiramiento debidas a los enlaces C-H, características de las moléculas orgánicas; 1 200 cm<sup>-1</sup>, asignable a la frecuencia de estiramiento del enlace C-O de posible grupo hidroxilo e indicando también la posible presencia de grupos éteres en algunos de los constituyentes de la fracción, y 790 cm<sup>-1</sup> (bandas asignadas a la deformación de los C-H de grupos metilenos).

La fracción X (117,90 mg) fue separada utilizando cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) utilizando una placa de vidrio 20 x 20 cm<sup>2</sup>, sobre sílica gel (como fase estacionaria) y éter de petróleo- AcOEt (fase móvil) en una proporción 4:1 V/V como mezcla de solvente. De esta separación se obtuvieron 3 bandas cromatográficas con R<sub>f</sub> definidos (Tabla 7)

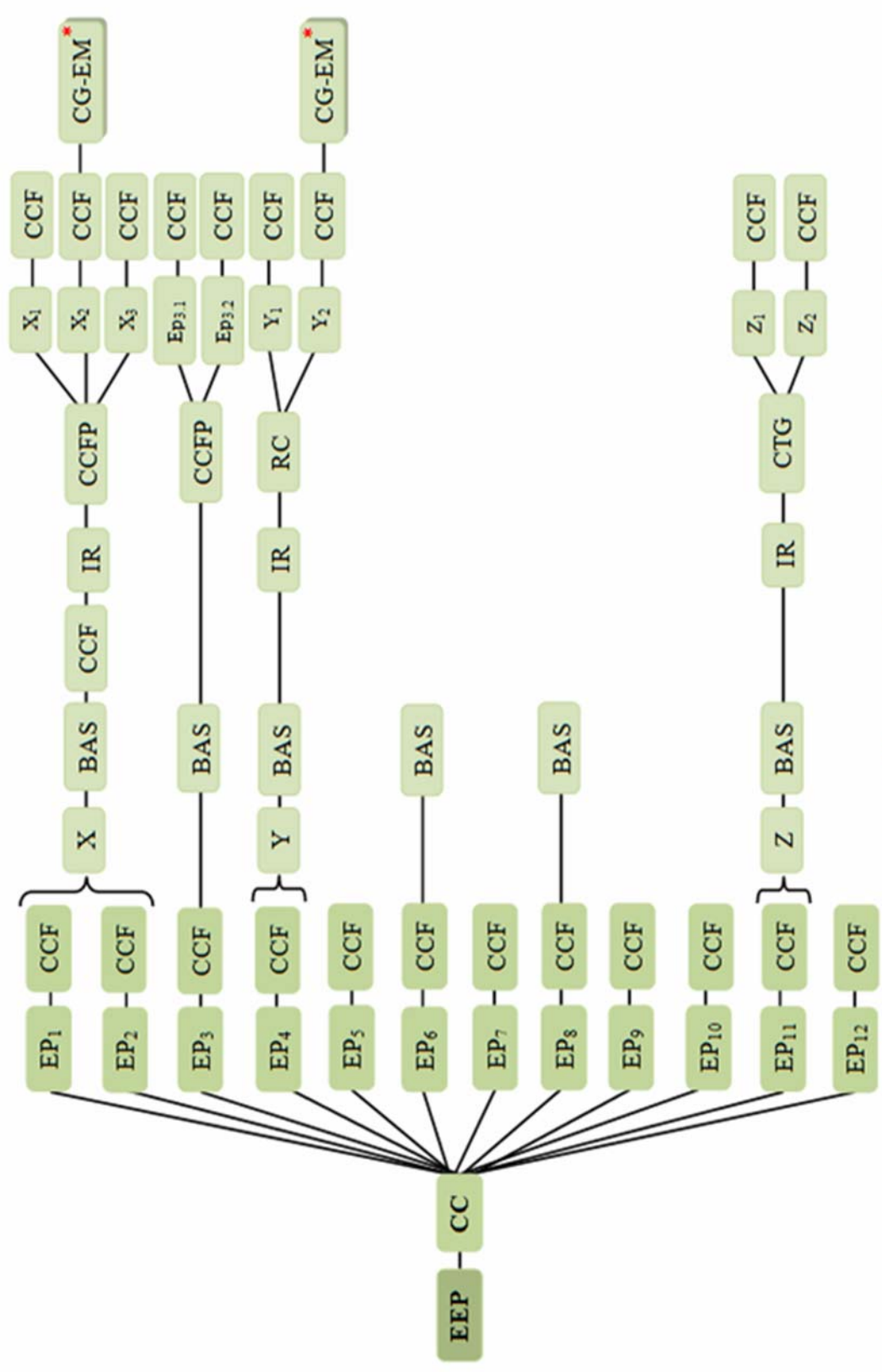


Figura 9. Diagrama de fraccionamiento del extracto soluble en éter de petróleo del alga *K. alvarezii*. (BAS: Bioensayo en *A. salina*; CTG: Centrifugación; \* : Análisis en proceso)

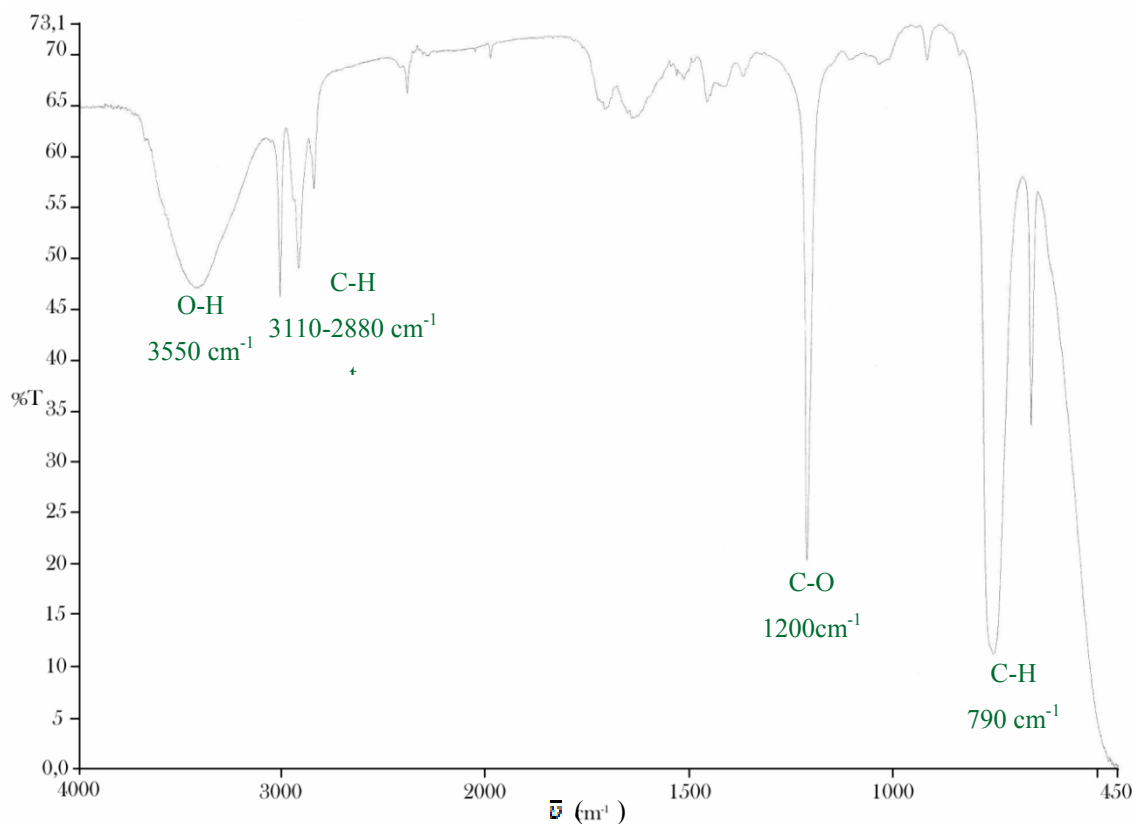


Figura 10. Espectro IR-TF de la fracción X indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes.

Tabla 7. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción X del EEP.

Subfracción	R <sub>f</sub>	Masa (mg)
X <sub>1</sub>	0,333	24,60
X <sub>2</sub>	0,593	35,30
X <sub>3</sub>	0,741	48,70

De la CCFP realizada a la fracción X se recuperaron 108,60 mg, lo cual representó el 92,11% del material cromatografiado. A cada subfracción obtenida se le realizó CCF con distintas mezclas de solventes, observándose en X<sub>2</sub> (aceite amarillo) una sola mancha, lo que sugirió la presencia de un posible compuesto puro; debido a esta característica y a la masa obtenida se decidió analizar el mismo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), con el objeto de identificar en lo posible el o los constituyentes presentes en dicha subfracción. Este análisis se está



realizando en el laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto de Investigaciones Científicas (IVIC). Por lo que, no se dispone de dicho análisis.

La fracción EP<sub>3</sub> (sólido amorfo amarillento), presentó una letalidad media de 886,20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , resultando este el CL<sub>50</sub> más alto, no por esto deja de ser una fracción bioactiva, ya que su CL<sub>50</sub> se encuentra por debajo de 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Debido a que en la CCF, EP<sub>3</sub> fue una de las fracciones que presentó buena separación, aunada a la cantidad que se tenía de la misma (48,7 mg), se realizó una cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), para tratar de separar los componentes de la fracción, utilizándose una placa de vidrio de 20 x 20 cm<sup>2</sup> recubierta de sílica gel 60 mesh de 1 mm de espesor. Como eluyente se utilizó una mezcla de éter de petróleo- acetato de etilo en proporción 4:1 V/V y como revelador luz UV, obteniéndose como resultado dos subfracciones, por separación de las bandas observadas en la placa cromatográfica y extracción de las mismas con cloroformo (Tabla 8). En este procedimiento se obtuvo un rendimiento de 76,18%, debido a este resultado aunado al hecho de que no se logró una buena separación de los constituyentes ya que se observaron varios componentes en cada subfracción, según la CCF, se decidió no analizar estas subfracciones.

Tabla 8. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción EP<sub>3</sub> del EEP.

<b>Subfracción</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>Masa (mg)</b>
EP <sub>3,1</sub>	0,784	15,3
EP <sub>3,2</sub>	0,882	21,8

Durante el proceso de elución de los compuestos en la columna cromatográfica del extracto soluble en éter de petróleo, se recolectó una fracción denominada EP<sub>4</sub>, constituida por un sólido blanco amorfo, relativamente gomoso, que presentó un CL<sub>50</sub> de 784,62  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , el cual resultó de interés y al realizarle la respectiva cromatografía en capa fina se observaron muy pocas manchas, por lo tanto se procedió a buscar la forma de purificar este sólido. Para ello se sometió a un proceso de recristalización para separar la fase sólida de la fracción, designándose la muestra como fracción Y.

El espectro de infrarrojo de la fracción EP<sub>4</sub> (Figura 11), presenta una banda de absorción centrada en 3 377  $\text{cm}^{-1}$ , característica de un estiramiento del enlace oxígeno-

hidrógeno del grupo hidroxilo (-O-H), otra absorción a  $3\ 000\text{ cm}^{-1}$  producto del estiramiento del enlace carbono- hidrógeno, así como una señal de  $1\ 211\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento asimétrico del enlace carbono-oxígeno (C-O). La banda observada a  $790\text{ cm}^{-1}$ , puede ser atribuida a las frecuencias de deformación o "rocking" de los enlaces C-H de grupos metilenos continuos,  $(\text{CH}_2)_n$  ( $n>4$ ).

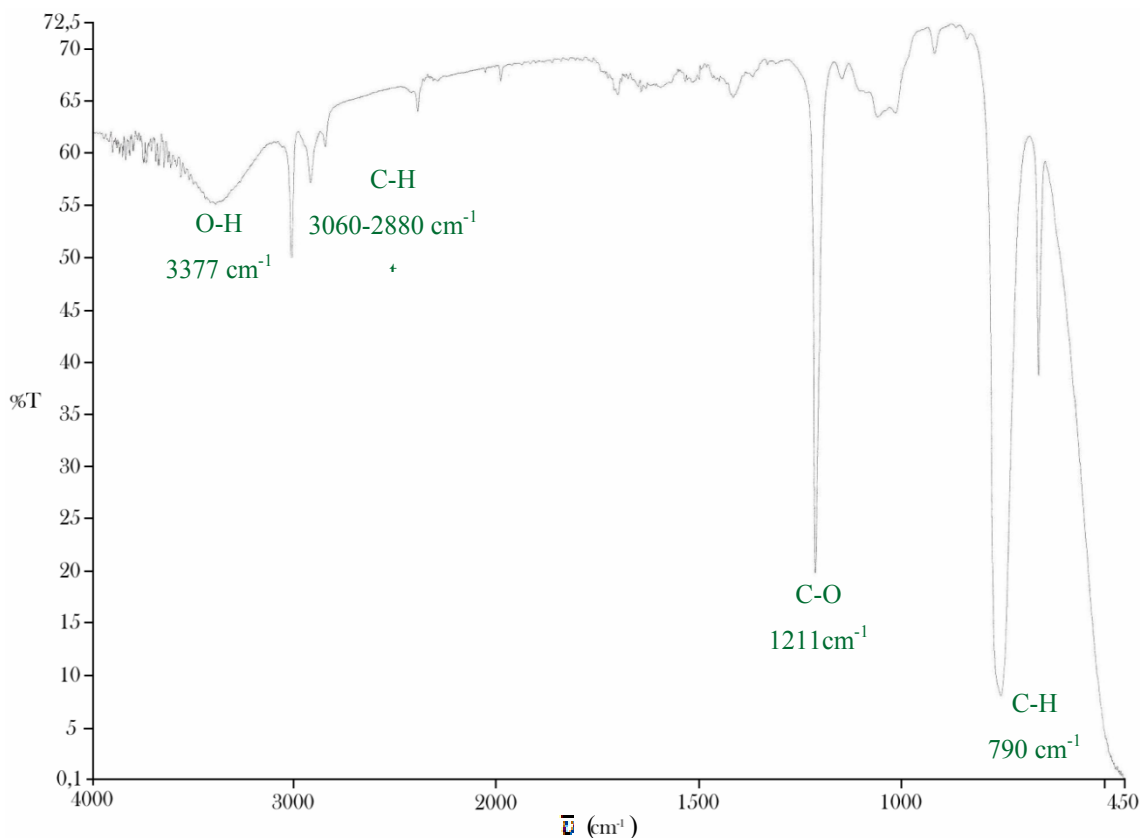


Figura 11. Espectro IR-TF de la fracción Y indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes.

En la recristalización se utilizó como solvente una mezcla de éter de petróleo-acetato de etilo 4:1 V/V, por no presentar solubilidad aparente a temperatura ambiente, pero sí en caliente, siguiendo el proceso normal de recristalización presentado en la Figura 12. Se recuperó una masa de 8,6 mg del sólido en cuestión y se identificó como  $Y_2$ , mientras que la matriz remanente (solución madre) fue nombrada  $Y_1$ , la cual tuvo una masa de 53,8 mg (Tabla 9). Asimismo, se analizaron ambas subfracciones mediante

CCF, observándose al revelar con MAH, una mezcla de componentes de fácil separación para  $Y_2$ , mientras que  $Y_1$  mostró una mancha difusa a lo largo de la placa. A pesar del buen rendimiento que presentó la subfracción  $Y_1$ , el análisis por CCF sugirió una mezcla compleja, por lo que se decidió descartarla. En tal sentido, se decidió analizar la subfracción  $Y_2$  mediante CG-EM. Esta muestra aún está en el IVIC para ser analizada.

Tabla 9. Subfracciones obtenidas en la recristalización de la fracción Y del EEP.

Subfracción	Solvente	Masa (mg)
$Y_1$	Éter de petróleo- AcOEt	53,8
$Y_2$	4:1	8,6

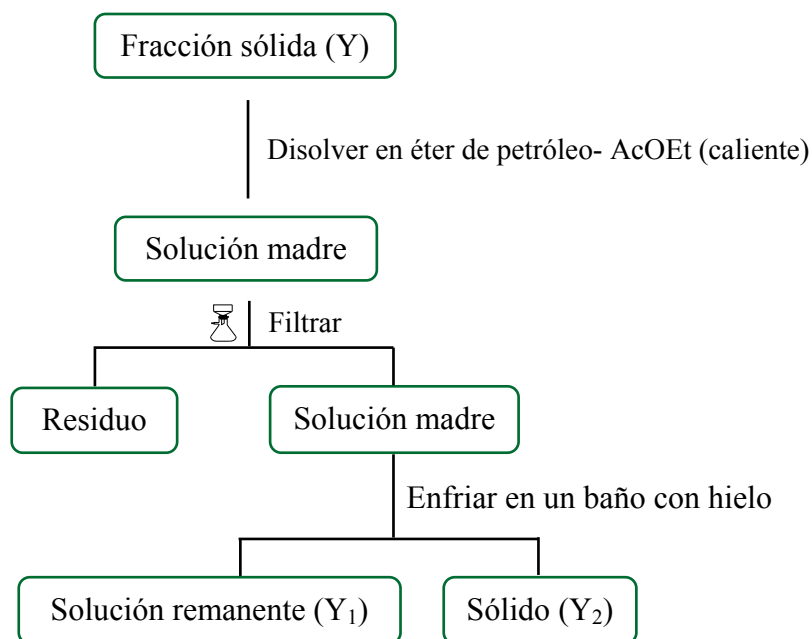


Figura 12. Esquema de recristalización de la fracción Y.

La CCF de la fracción  $EP_{11}$  indicó la posible presencia de pocos compuestos; además, la misma estaba constituida por una solución verdosa, con la presencia de un sólido suspendido, resultando necesaria la separación del sólido de la solución, para poder llevar a cabo los análisis de identificación estructural. Esta fracción se renombró como Z y se le realizó un análisis espectroscópico para establecer los grupos funcionales mayoritario en la fracción.

De acuerdo a la información espectroscópica obtenida para esta fracción, se presume la presencia de posibles compuestos carbonílicos e hidroxílicos insaturados de cadena carbonada larga, cuyos grupos funcionales fueron confirmados mediante espectroscopia IR, observándose en el espectro correspondiente (Figura 13), las tensiones características debidas a enlaces O-H a  $3640\text{ cm}^{-1}$ , C-H alrededor de  $3020\text{ cm}^{-1}$ , C=O a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , C-O a  $1220\text{ cm}^{-1}$  y C-H olefínicos a  $792\text{ cm}^{-1}$ , entre otras.

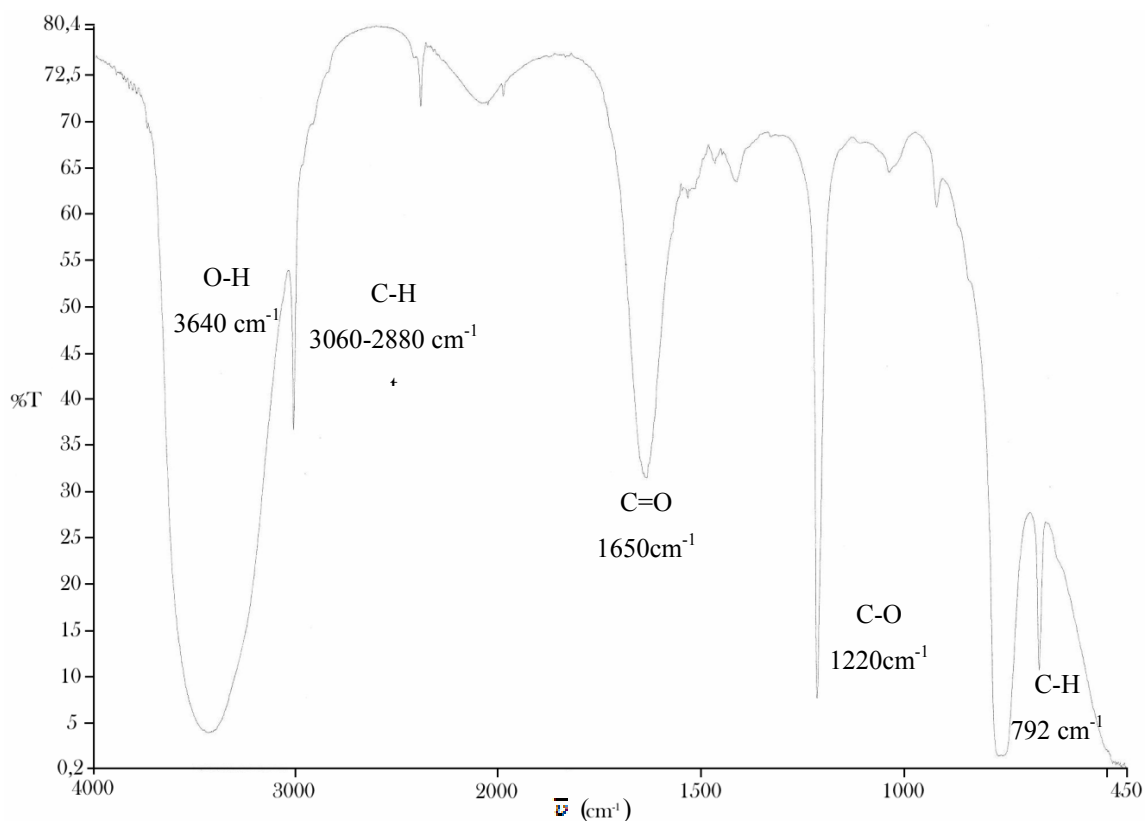


Figura 13. Espectro IR-TF de la fracción EP11 indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes.

Posteriormente, se decidió centrifugarla, para lograr la separación de la fase sólida de la líquida. La fracción Z se centrifuga por espacio de 10 min en una centrifugadora (IEC-500 rpm), hasta lograr concentrar el sólido en el fondo; después se procedió a separar por decantación, obteniéndose dos subfracciones: Z<sub>1</sub> de masa 76,8 mg, correspondiente a la solución madre, y Z<sub>2</sub> de masa 13,5 mg, el sólido que se encontraba

suspendido. La CCF realizada a las dos subfracciones, después de haber sido reveladas con molibdato de amonio ácido, reveló  $R_f$  demasiado cercanos, razón por la cual no se siguieron analizando, descartándose como objetos de estudio.

### **Fraccionamiento del extracto crudo en cloroformo de *K. alvarezii***

El extracto soluble en  $\text{CHCl}_3$  (EC) de *K. alvarezii* se fraccionó por cromatografía de columna (CC) con sílica-gel 35-70 mesh, en una columna de aproximadamente 50,0 cm de largo x 1,5 cm de diámetro. Se utilizaron 1,40 g de extracto y 70 g de sílica-gel en una relación entre sí de 1:50 m/m. Se utilizó éter de petróleo como solvente de empaquetamiento de la columna cromatográfica y mezclas en polaridades ascendentes de éter de petróleo-cloroformo, acetona, acetona- metanol, MeOH y solución de ácido acético al 1%, como solventes de elución de los compuestos químicos. De esta cromatografía se obtuvieron 10 eluatos contentivos de 25 ml cada uno, como se muestra en la Tabla 10. En la Figura 14, se muestra el diagrama de fraccionamiento de EC.

A los eluatos obtenidos del fraccionamiento del extracto soluble en cloroformo, se les realizó cromatografía en capa fina (CCF), empleando como fase móvil una mezcla de éter de petróleo-acetona, en las proporciones 3:2, 2:3, 1:4 y 1:9 V/V, obteniéndose 10 fracciones (Tabla 11) por comparación de sus  $R_f$ , utilizando como agentes reveladores luz ultravioleta (UV) y una solución ácida de molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\text{H}_2\text{O}$ ). Se recuperó un total de 1 101 mg, lo que representa un 78,64% del material cromatografiado.

La cromatografía de capa fina (CCF) de cada una de estas fracciones mostró mediante la utilización de los agentes reveladores antes mencionados, que las fracciones B, E, F, I y K resultaron mezclas de muchos compuestos con  $R_f$  muy cercanos y de difícil separación. Debido a estos resultados se decidió trabajar con las fracciones restantes: C, D, G, H y J, los cuales mostraron manchas definidas al ser corridas en diferentes solventes y mezclas de los mismos, y con  $R_f$  no muy cercanos al momento de su revelado.

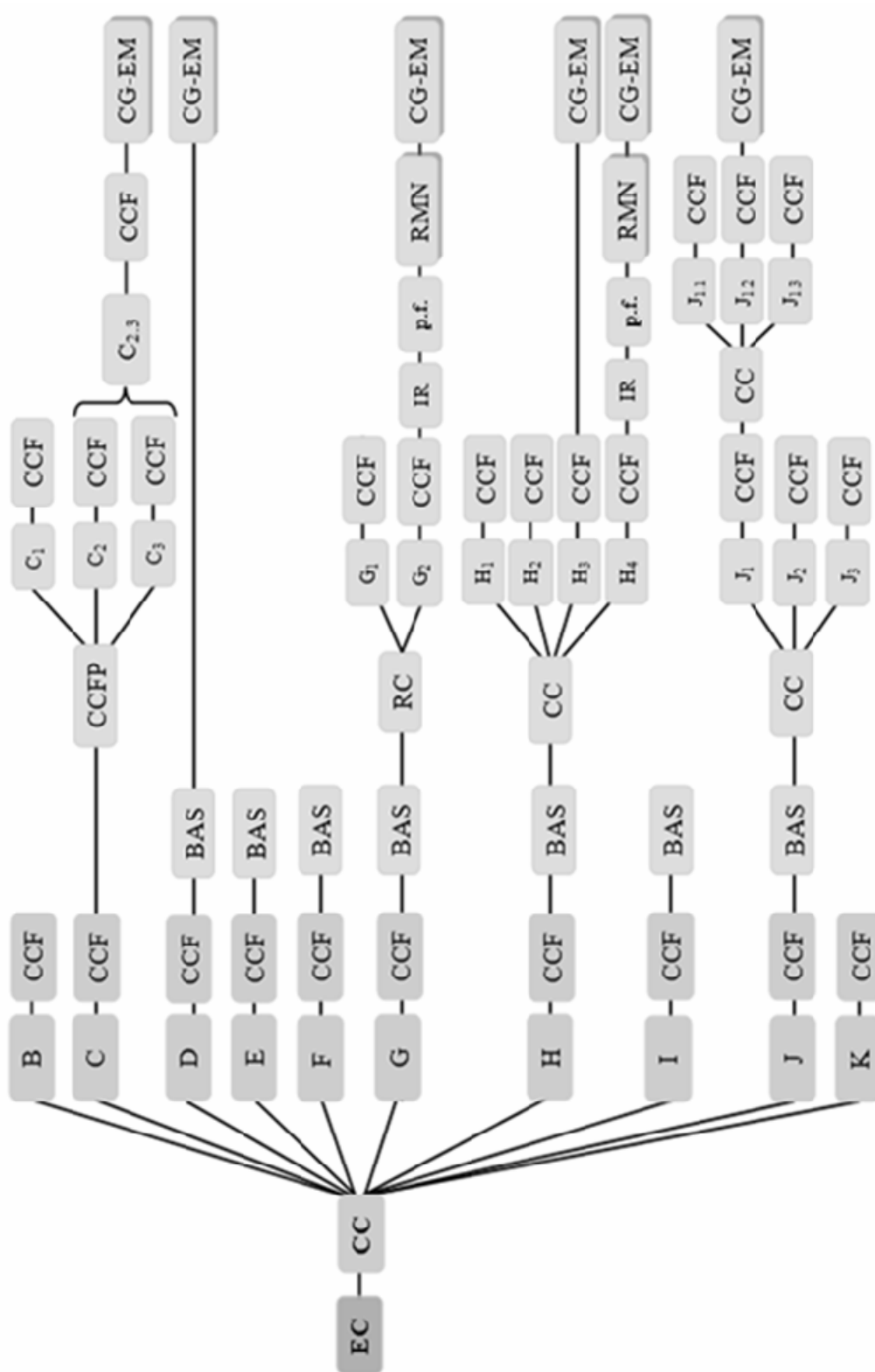


Figura 14. Diagrama de fraccionamiento del extracto soluble en cloroformo del alga *K. alvarezii*. (BAS: Bioensayo en *A. salina*; CTG: Centrifugación; p.f.: Punto de fusión; \*: Análisis en proceso)

Tabla 10. Solventes utilizados en la CC de la fracción soluble en cloroformo (EC) de *K. alvarezii* y número de eluatos obtenidos.

<b>Eluatos</b>	<b>Eluyentes</b>	<b>Porcentaje (%) V/V</b>
1 – 6	éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	80-20
7 – 11	éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	60-40
12 – 14	éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	40-60
15 – 18	CHCl <sub>3</sub>	100
19 – 28	CHCl <sub>3</sub> – AcOEt	60-40
29 – 32	CHCl <sub>3</sub> – AcOEt	40-60
33 – 42	AcOEt	100
43 – 50	AcOEt – MeOH	50-50
51– 55	MeOH	100
56 – 59	CH <sub>3</sub> COOH	100

Tabla 11. Fracciones obtenidas del extracto soluble en CHCl<sub>3</sub> y sus respectivas masas.

<b>Fracción</b>	<b>Eluatos</b>	<b>Características</b>	<b>Masa (mg)</b>
B	1-16	Sólido amarillo	149,6
C	17-19	Sólido blanco	130,4
D	20	Aceite verde oscuro	42,8
E	21	Aceite verde claro	48,1
F	22-26	Aceite amarillo (gomoso)	127,5
G	27-28	Sólido blanco en suspensión	25,0
H	29-32	Sólido grisáceo	50,5
I	33-42	Aceite amarillo oscuro	150,1
J	43-55	Aceite amarillo oscuro	136,7
K	56-59	Verde claro (gomoso)	240,3

Debido a lo observado en CCF, se decidió realizarle cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) a la fracción C, con la finalidad de lograr separar al componente mayoritario de dicha fracción. Para la CCFP de la misma, se utilizó una placa de vidrio 20 x 20 cm<sup>2</sup> recubierta de sílica gel 60 mesh de 1 mm de espesor, se colocó 53,42 mg de la muestra en la placa y como sistema de solvente se empleó una mezcla de cloroformo - acetato de etilo, en una proporción 3:2 V/V y se reveló con una solución ácida de molibdato de amonio. Se evidenció la presencia de tres posibles compuestos o subfracciones en la placa (Tabla 12).

Se recuperó una masa total de 39,6 mg, lo que representó el 55,85% del material cromatografiado. A cada una de las subfracciones resultantes de la CCFP de la fracción C, se les realizó CCF para comprobar el estado de cada una, empleando una mezcla de cloroformo- acetato de etilo 4:1 V/V.

Tabla 12. Subfracciones obtenidas de la CCFP de la fracción C del EEP.

<b>Subfracción</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>Característica</b>	<b>Masa (mg)</b>
C <sub>1</sub>	0,567	Aceite verde	35,2
C <sub>2</sub>	0,750	Sólido blanco amorfo	2,8
C <sub>3</sub>	0,878	Sólido blanco amorfo	1,6

Por CCF, las subfracciones C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> mostraron estar conformadas por posiblemente tres compuestos y considerando las masas de las fracciones se decidió juntarlas en una sola subfracción denotada como C<sub>2,3</sub>, la cual presentó R<sub>f</sub> bien definidos al momento de ser revelada, por lo que dicha subfracción se decidió analizar por CG-EM. La subfracción restante C<sub>1</sub>, resultó ser una mezcla muy compleja de compuestos con R<sub>f</sub> muy cercanos de difícil separación.

El cromatograma de gases (Figura 15) de la subfracción C<sub>2,3</sub> evidenció que se trataba de una mezcla de compuestos, de la cual se logró identificar dos de algunos de los que se encontraban en mayor proporción. El cromatograma exhibió la presencia, en mayor proporción, del 5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil2(4H) benzofuranona (I), el cual apareció a un tiempo de retención de 11,75 minutos. El segundo pico (II) que se identificó a un tiempo de retención de 19,37 minutos, correspondiente al estigmasterol. Estos resultados se resumen en la Tabla 13; sin embargo, no se cuenta con el porcentaje de área de los picos, pues la línea base de este cromatograma no permite este tipo de cálculos.

Tabla 13. Compuestos identificados en la subfracción C<sub>2,3</sub> mediante CG-EM.

<b>Pico</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>M<sup>+</sup></b>	<b>Compuesto</b>	<b>Grupo Químico</b>	<b>Fórmula molecular</b>
I	11,75	180	5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona	Terpenoide	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
II	19,37	412	Estigmasterol	Esterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O



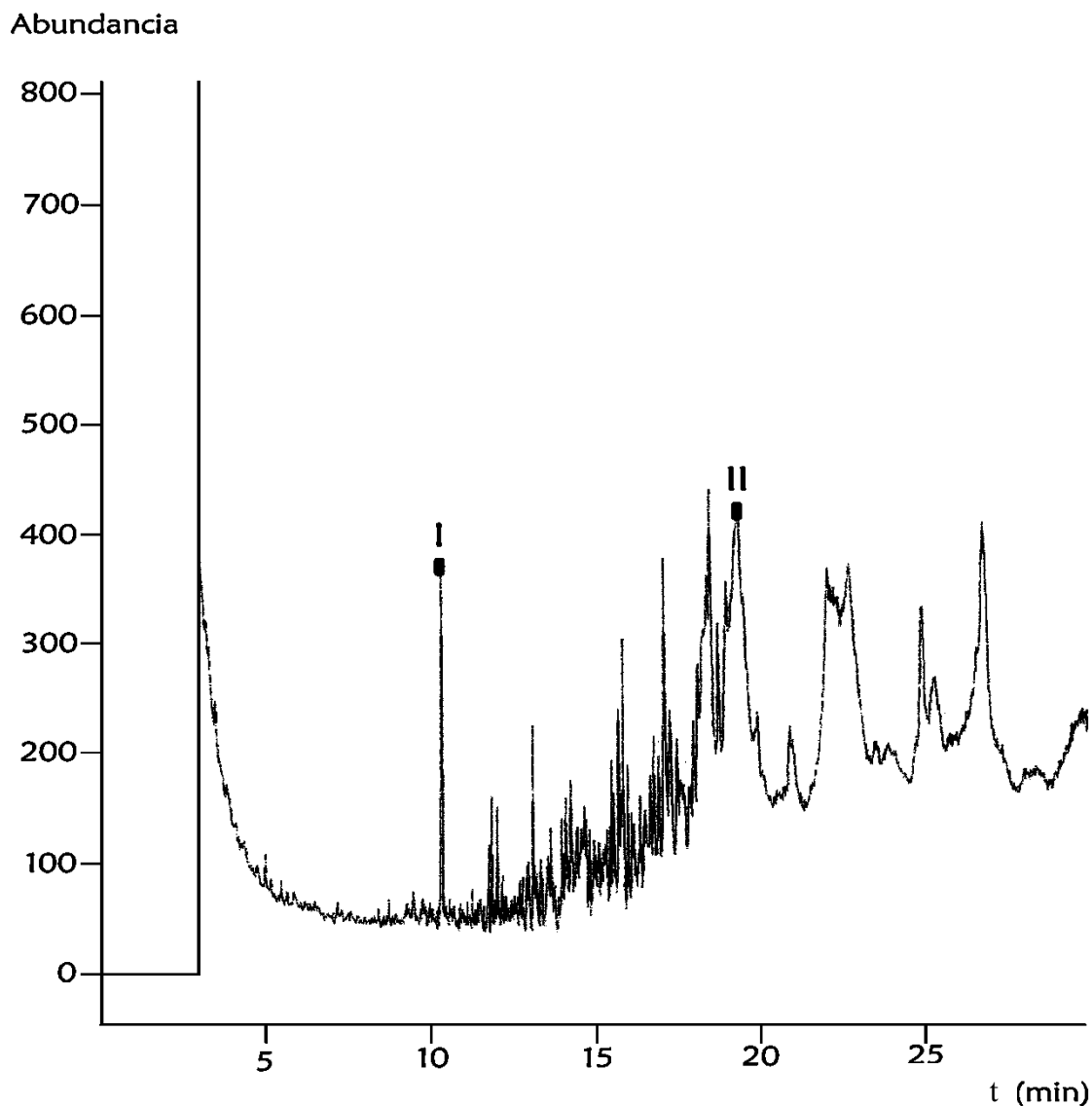


Figura 15. Cromatograma de gases de la subfracción C<sub>2.3</sub>.

El espectro de masas del compuesto (I) de la subfracción C<sub>2.3</sub> (Tr = 11,75 minutos), mostró las señales de los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  180, 111 (pico bases) y 43. El ión molecular correspondiente a  $m/z$  180 [ $M^+$ ] se logró observar en el espectro (Figura 16). En la Figura 17 se muestra el patrón de fragmentación correspondiente para este compuesto. Es importante referir el hecho de que la 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona ha sido identificada por medio

de CG-EM en la microalga *Dunaliella salina*, perteneciente al *Phylum* clorofita (microalga verde), la cual es conocida por sus propiedades antioxidantes (89).

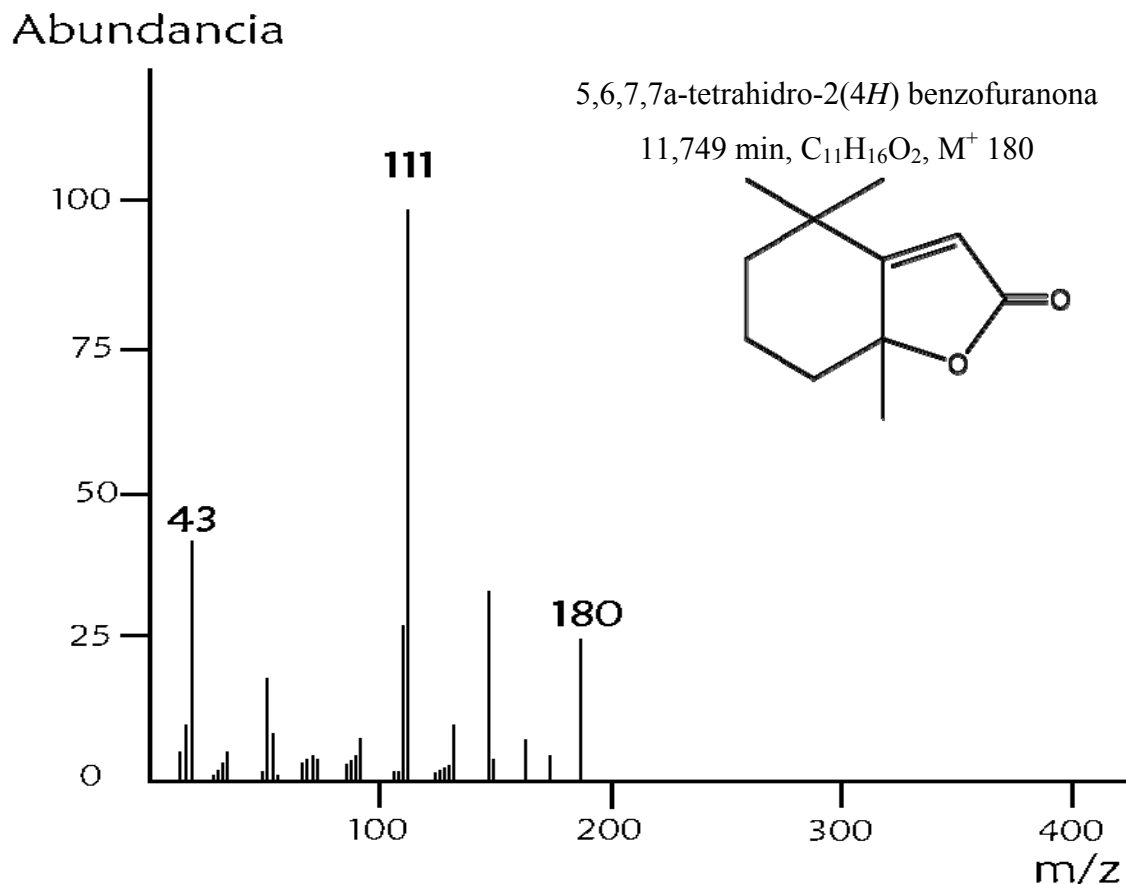


Figura 16. Espectro de masas del 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona.

La 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona (o dihidroactinidiolido) es un terpeno volátil, con un dulce olor a té y es utilizado como fragancia; normalmente se encuentra en el tabaco, mangos y té negro. También se conoce como una feromona para una variedad de insectos; por ejemplo es uno de los tres componentes de la feromona para el reconocimiento de la reina de los trabajadores de la hormiga roja (90).

En contraste con lo que sucede en los ambientes terrestres, la distribución de los productos terpénicos no es muy amplia entre los organismos marinos. Hasta hoy se han encontrado terpenos en los celentéreos, moluscos, esponjas y en las algas pardas y rojas. Esta distribución puede incluso ser más pequeña, si se tienen en cuenta las evidencias

existentes, que demuestran que son las algas simbióticas las verdaderas fuentes de los terpenos aislados en celentereos, y que los terpenos encontrados en moluscos son el resultado de la acumulación de productos procedentes de las algas ingeridas. Sin embargo, la gran variedad de estructuras encontradas indican claramente que todos los tipos de sesquiterpenos aislados de plantas terrestres pueden eventualmente encontrarse en los organismos marinos.

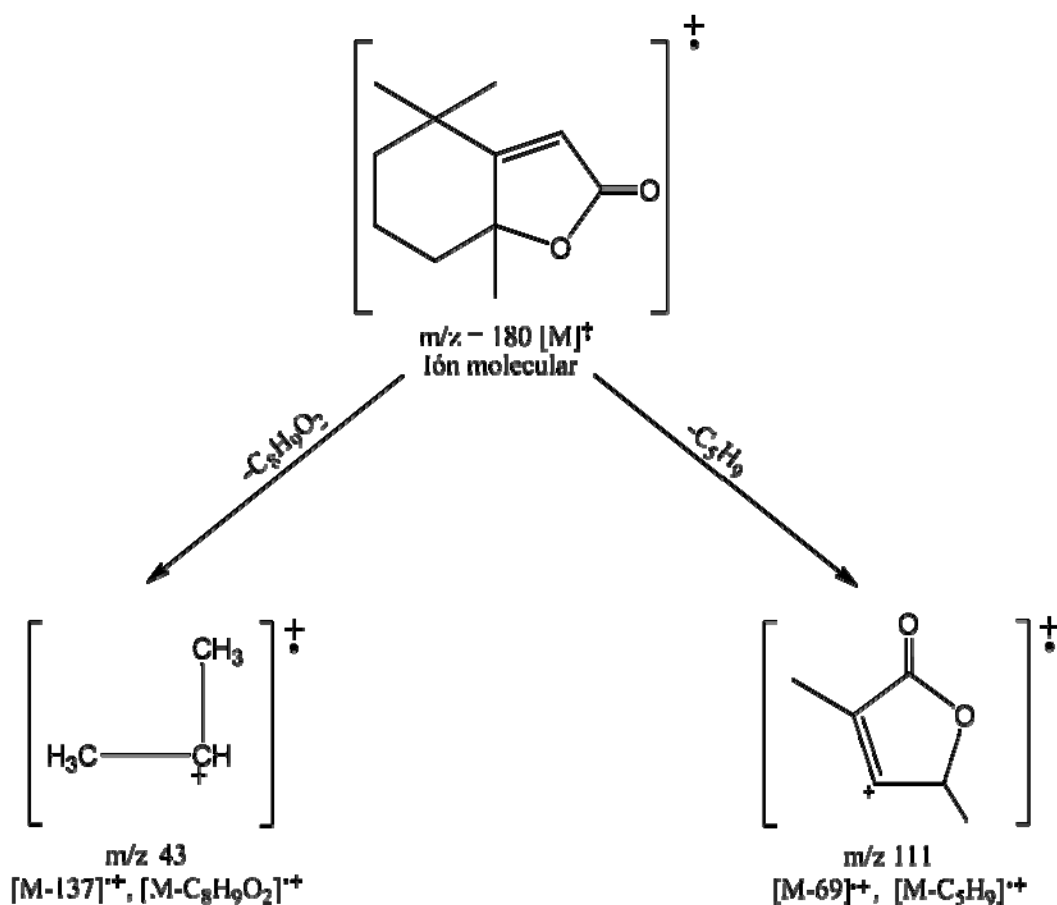


Figura 17. Patrón de fragmentación del 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona.

El espectro de masas del fitoesterol conocido como estigmasterol, de la fracción C<sub>2.3</sub> (Tr = 19,37), desplegó las señales de los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  394, 351, 300, 255, 213, 159, 133, 83 y 55, los cuales

son mostrados en la Figura 18, donde se refleja la estructura de cada uno de ellos. El ión molecular a  $m/z$  412 no se observó en el espectro de masas, debido quizás a la alta reactividad de la estructura. En la Figura 19 se muestra el patrón de fragmentación correspondiente para este compuesto esteroidal, donde se exponen las estructuras de estos fragmentos.

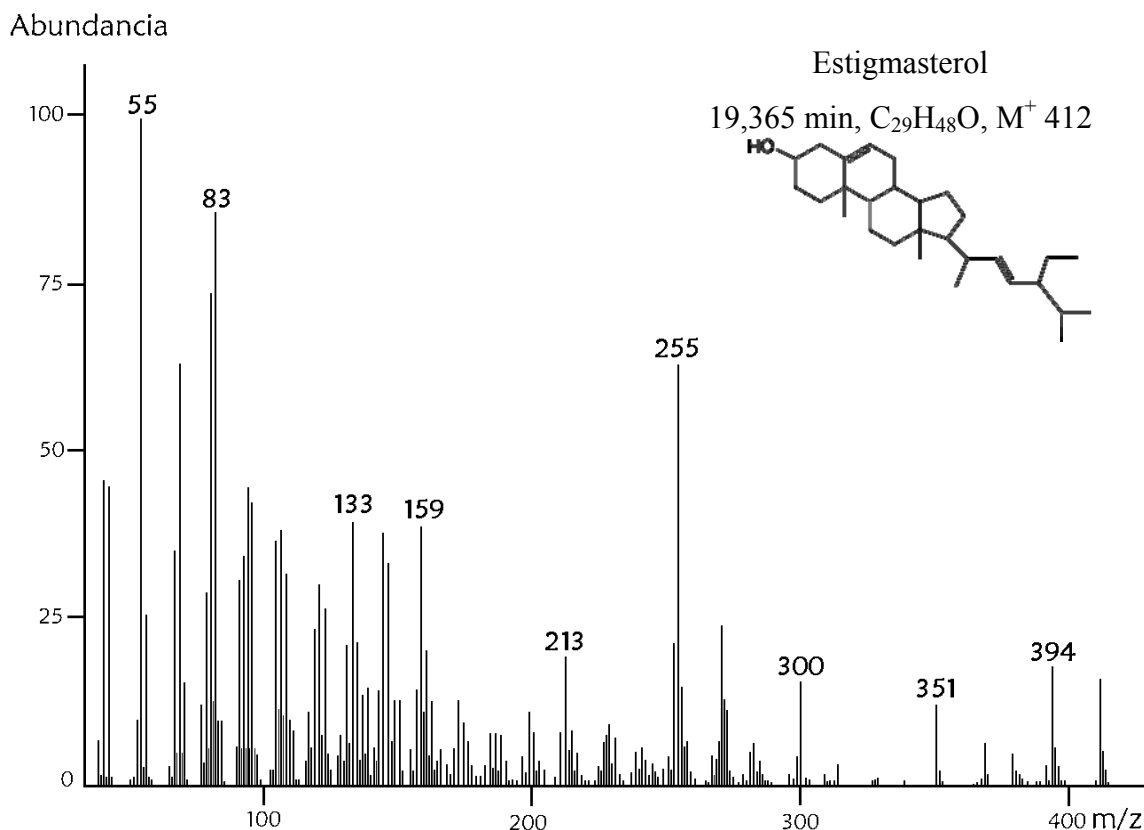


Figura 18. Espectro de masas del estigmasterol.

Los estudios clínicos han demostrado que la ingesta alimentaria de los esteroides vegetales (como parte de la dieta normal o como complemento) puede ayudar a reducir los niveles de colesterol en la sangre. En la India, se analizó el alga *Kappaphycus* sp. y se encontró que el contenido de estigmasterol estaba en menor proporción en relación a los esteroides identificados en el alga. La contendiente variación en la composición de esteroides entre las diferentes algas, se debe posiblemente a diferencias fisiológicas o por

influencias ambientales. Las algas marinas tienen demostrado ser buena fuente de esteroides insaponificables, no tóxicos, que tienen valor medicinal (91).

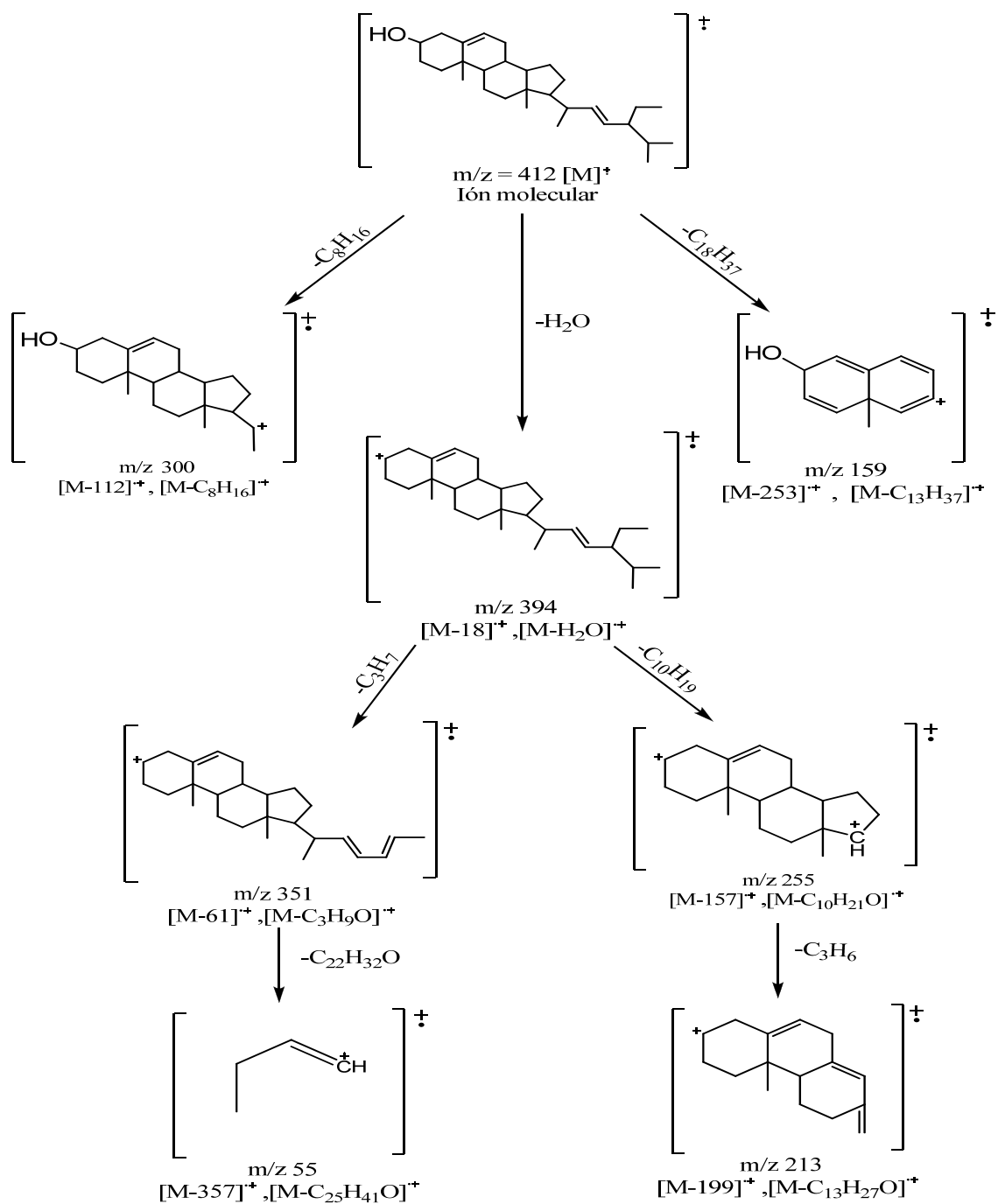


Figura 19. Patrón de fragmentación del estigmasterol.

La fracción D, reveló una concentración letal media, considerablemente alta, en el bioensayo de toxicidad realizado, con un  $CL_{50}$  de  $24,91 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , después de 24 horas de exponer las larvas de *A. salina* ante esta fracción ( $CL_{50}$  de  $4,38 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a las 48 horas). Resultando satisfactoria la realización de un análisis más detallado de esta fracción. Además, la CCF mostró dos manchas con  $R_f$  definidos, por lo cual en vista de los resultados químicos y de letalidad, la FD fue seleccionada para ser analizada por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM).

El cromatograma (Figura 20) de la fracción D evidenció que se trataba mayormente de una mezcla de seis compuestos, entre los cuales se logró identificar los que estaban presentes en mayor abundancia, siendo éstos: 3-etil-4-metil-1*H*-pirrole-2,5-diona (I) y los ácidos tetradecanoico (II), hexadecanoico (III) y octadecanoico (IV), a los tiempos de retención que se muestran en la Tabla 14.

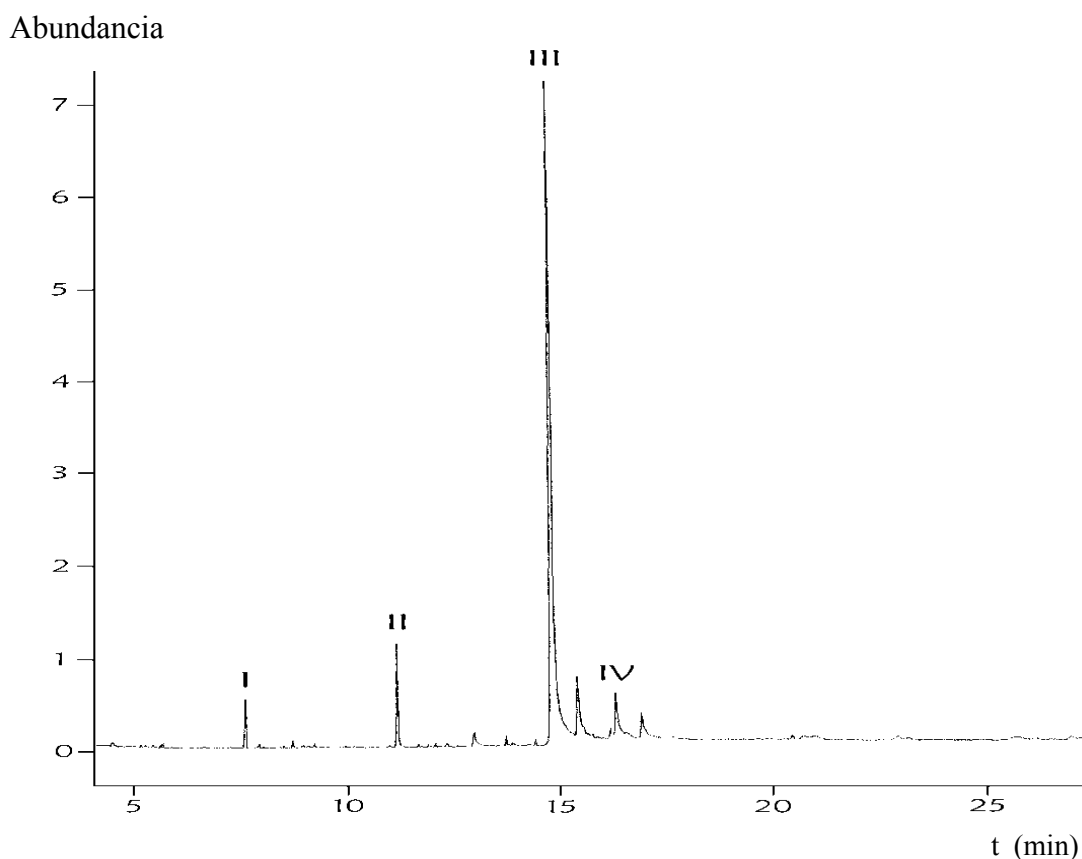
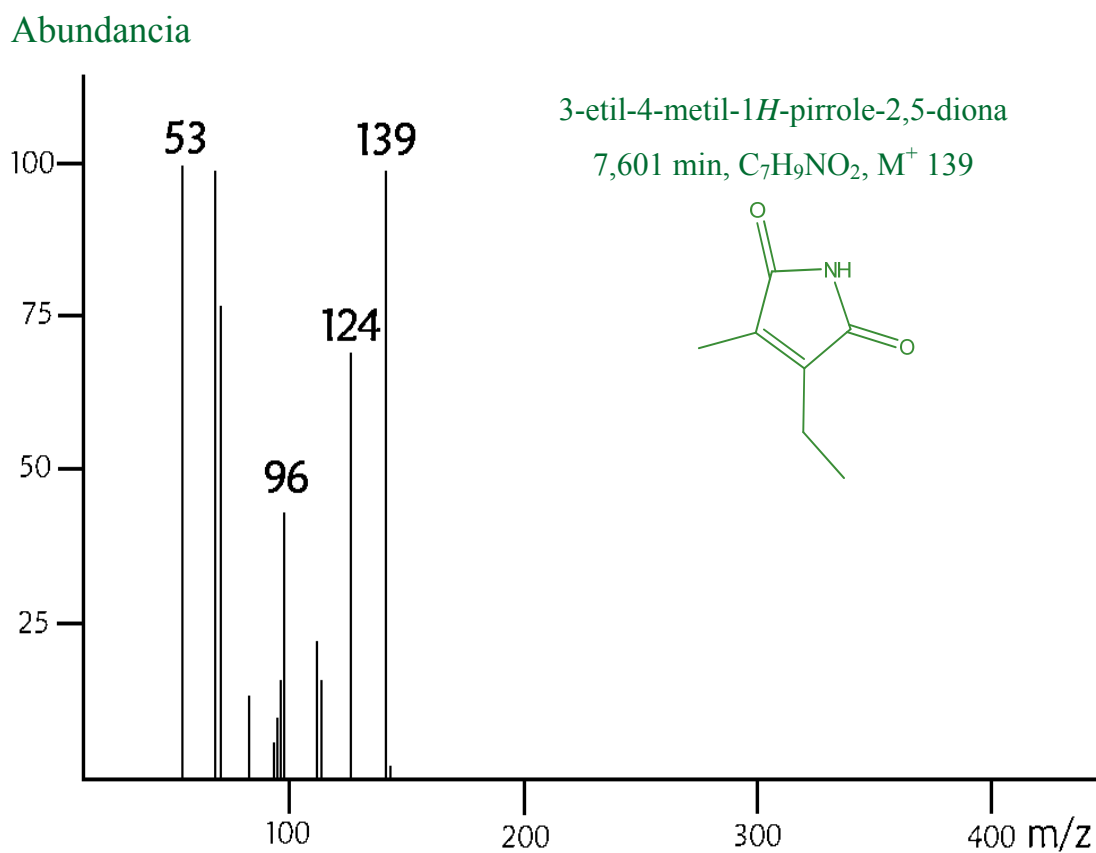


Figura 20. Cromatograma de gases de la fracción D.

Tabla 14. Compuestos identificados en la fracción D mediante CG-EM.

Pico	Tr (min)	M <sup>+</sup>	Compuesto	Grupo Químico	Fórmula molecular
I	7,60	139	3-etil-4-metil-1 <i>H</i> -pirrole-2,5-diona	Cetona	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
II	12,99	228	Ácido tetradecanoico	Ácido graso	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
III	15,12	256	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
IV	16,39	284	Ácido octadecanoico	Ácido graso	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>

El espectro de masas del metabolito, 3-etil-4-metil-1*H*-pirrole-2,5-diona, de la fracción D (Tr =7,60 minutos), desplegó un ión molecular a m/z 139 [M<sup>+</sup>], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 124 y 53 (Figura 21). En la Figura 22, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente para este compuesto.

Figura 21. Espectro de masas del 3-etil-4-metil-1*H*-pirrole-2,5-diona.

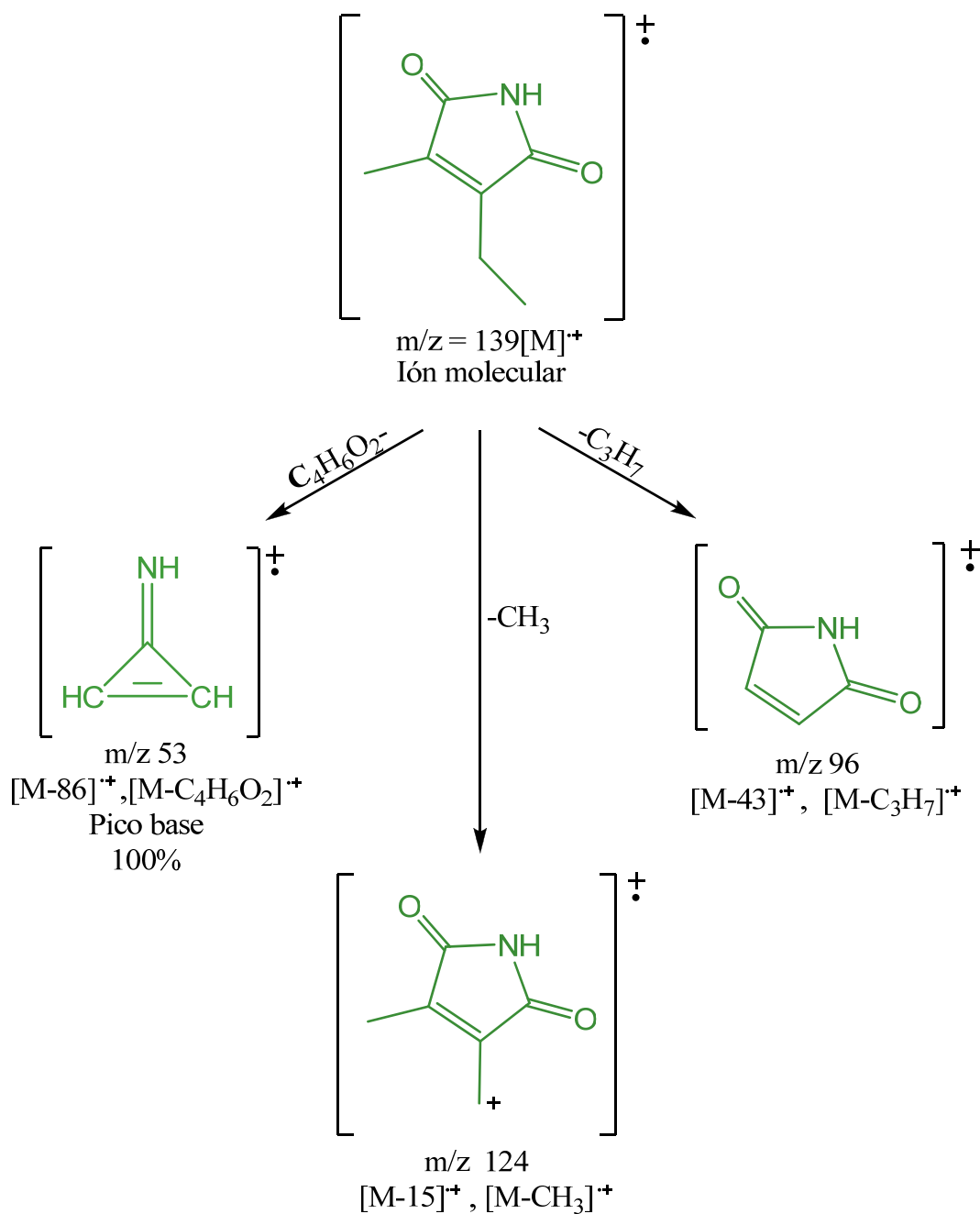


Figura 22. Patrón de fragmentación del 3-etil-4-metil-1*H*-pirrole-2,5-diona.

El espectro de masas del ácido tetradecanoico (Figura 23), de la fracción D (Tr = 12,986), exhibió un ión molecular a  $m/z 228 [M]^+$ , y los fragmentos correspondientes



a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  185, 129, y 73 (pico base). En la Figura 24, se muestra el patrón de fragmentación correspondiente para este ácido graso.

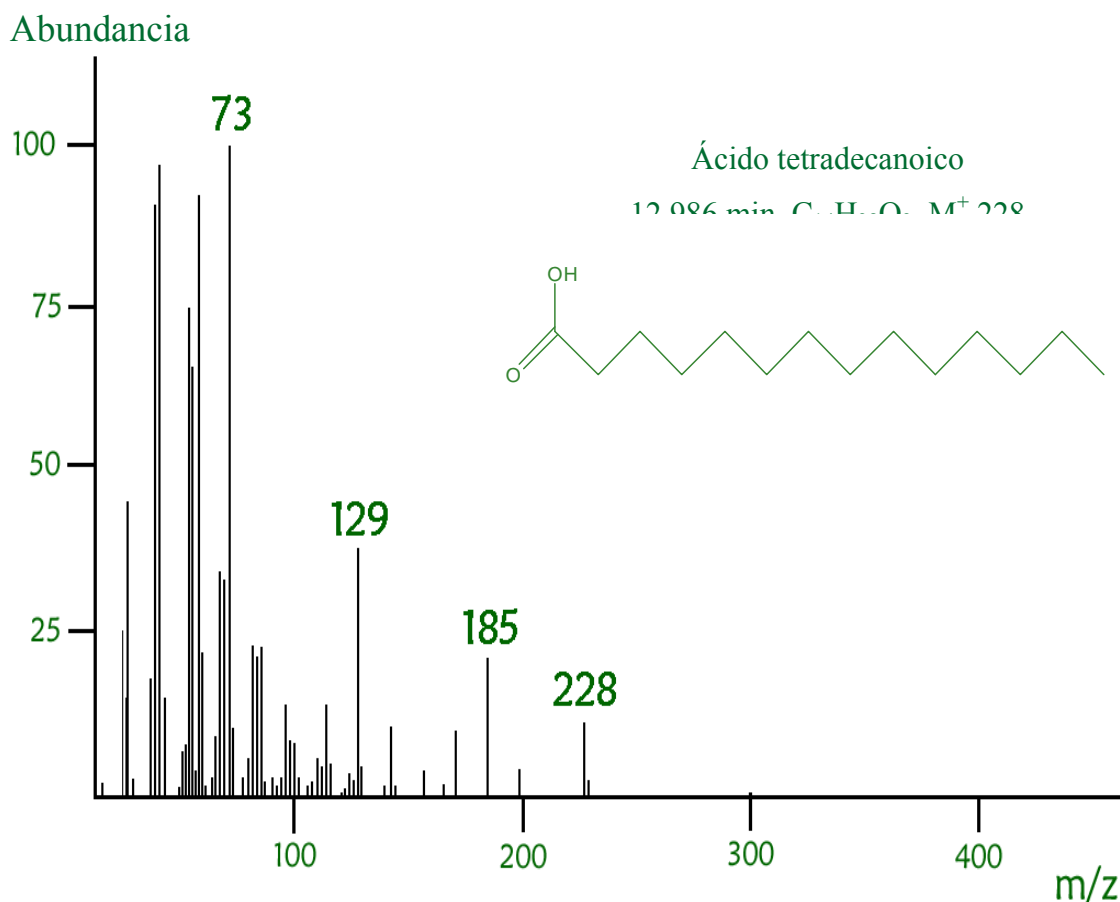


Figura 23. Espectro de masas del ácido tetradecanoico.

En fracciones obtenidas a partir de extractos crudos de algunas Rhodophyta, se han detectado fenoles, proteínas, ácidos grasos y lípidos insaponificables de significativa actividad antibacteriana tanto contra las bacterias Grampositivas como las Gramnegativas. Igualmente, se han detectado y aislado en algunas fracciones de algas verdes, pero no tan activas como las algas rojas. Los ácidos grasos y su ésteres son reportados como precursores o motivadores de actividades o efectos antimicrobianos.

La relevancia del hecho de ser las algas rojas la principal fuente de una mayor diversidad de compuestos bioactivos, se puede ver reflejado en los resultados de



El tercer pico observado en el cromatograma, que aparece en mayor abundancia respecto a todos los compuestos identificados en la fracción D, a un tiempo de retención de 15,12 minutos, corresponde al ácido hexadecanoico (III). El espectro de masas de este compuesto (Figura 25) mostró un ión molecular a  $m/z$  256 [ $M^+$ ], el cual corresponde a la fórmula molecular  $C_{16}H_{32}O_2$  y los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a  $m/z$  227 [ $M^+ - C_2H_5$ ], 213 [ $M^+ - C_3H_7$ ], 199 [ $M^+ - C_4H_9$ ], 185 [ $M^+ - C_5H_{11}$ ], 71 [ $M^+ - C_6H_{13}$ ], 157 [ $M^+ - C_7H_{15}$ ], 143 [ $M^+ - C_8H_{17}$ ], 129 [ $M^+ - C_9H_{19}$ ], 115 [ $M^+ - C_{10}H_{21}$ ], 97 [ $M^+ - C_{10}H_{23}O$ ], 83 [ $M^+ - C_{11}H_{25}O$ ], 73 [ $M^+ - C_{13}H_{27}$ ] (pico base), 57 [ $M^+ - C_{12}H_{23}O_2$ ] y 43 [ $M^+ C_{13}H_{25}O_2$ ]. En la Figura 26 se observan los fragmentos correspondientes al patrón de fragmentación de este ácido graso.

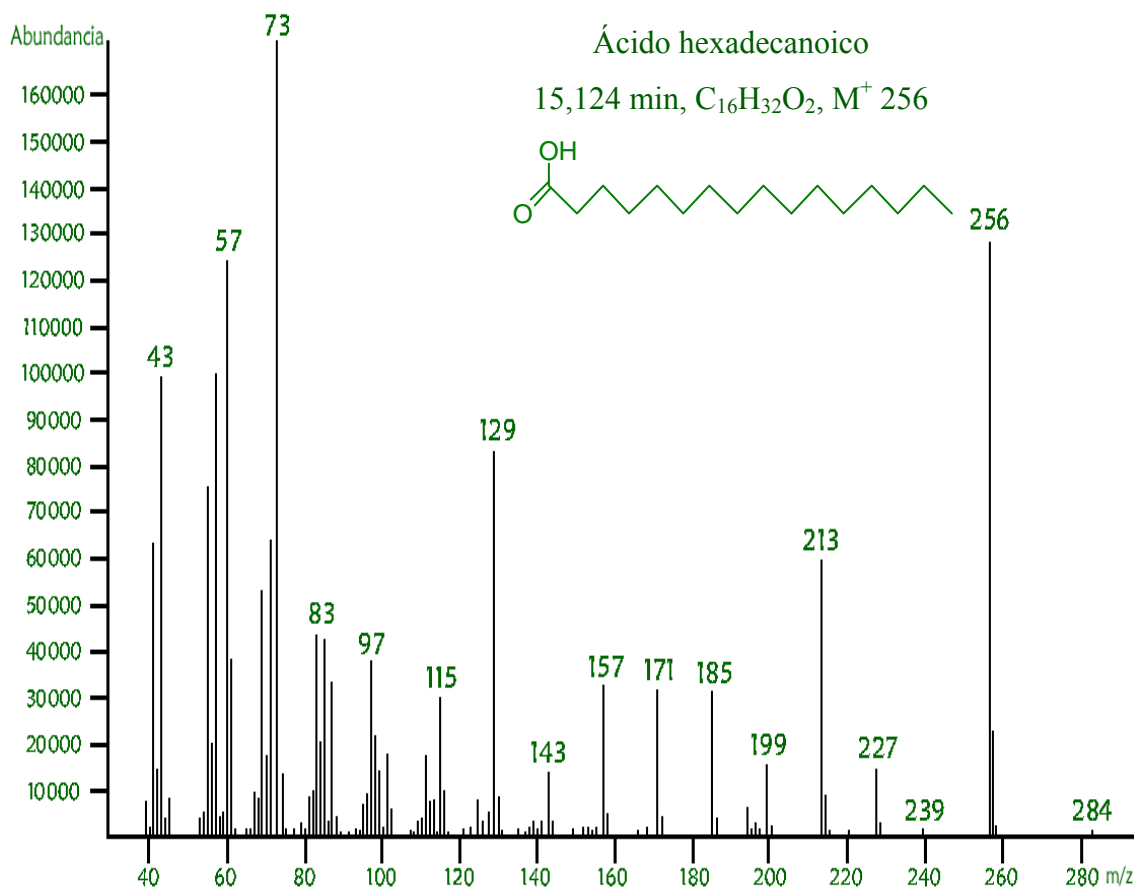


Figura 25. Espectro de masas del ácido hexadecanoico.

En varios reportes, se sustenta la actividad antibacteriana de algunos ácidos grasos y su ésteres. Incluyendo también propiedades antimicóticas y reportándose a los ácidos mirístico y palmítico como inhibidores del crecimiento de bacterias. Se ha llegado a constatar que los ácidos grasos causan una disminución en la capacitación de oxígeno por parte de las células bacterianas.

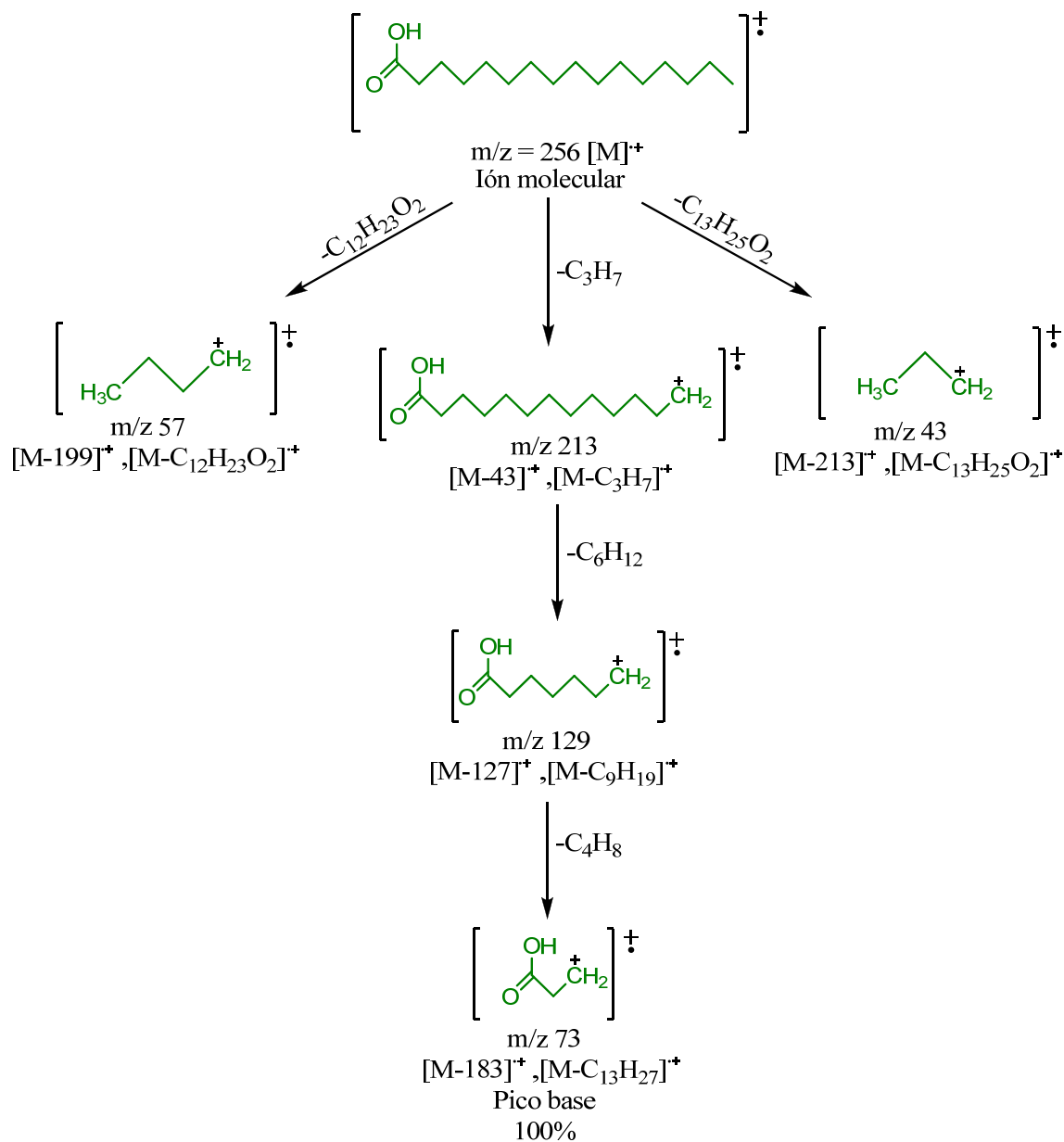


Figura 26. Patrón de fragmentación de ácido hexadecanoico.

Otro compuesto, de la fracción D es, el ácido octadecanoico, el cual se observó a un tiempo de retención de 16,39 min, mostrando en su espectro de masas fragmentos a  $m/z$  284 [ $M^+$ ], 241 [ $M^+ - C_3H_7$ ], 227 [ $M^+ - C_4H_9$ ], 213 [ $M^+ - C_5H_{11}$ ], 199 [ $M^+ - C_6H_{13}$ ], 185 [ $M^+ - C_7H_{15}$ ], 171 [ $M^+ - C_8H_{17}$ ], 157 [ $M^+ - C_9H_{19}$ ], 143 [ $M^+ - C_{10}H_{21}$ ], 129 [ $M^+ - C_{11}H_{23}$ ], 115 [ $M^+ - C_{12}H_{25}$ ], 97 [ $M^+ - C_{12}H_{27}O$ ], 73 [ $M^+ - C_{15}H_{31}$ ] (pico base), 57 [ $M^+ - C_{14}H_{27}O_2$ ] y 43 [ $M^+ - C_{15}H_{29}O_2$ ], siendo estos los picos correspondientes a los iones más abundantes, los cuales son mostrados en la Figura 27. El respectivo patrón de fragmentación, se muestra en la Figura 28.

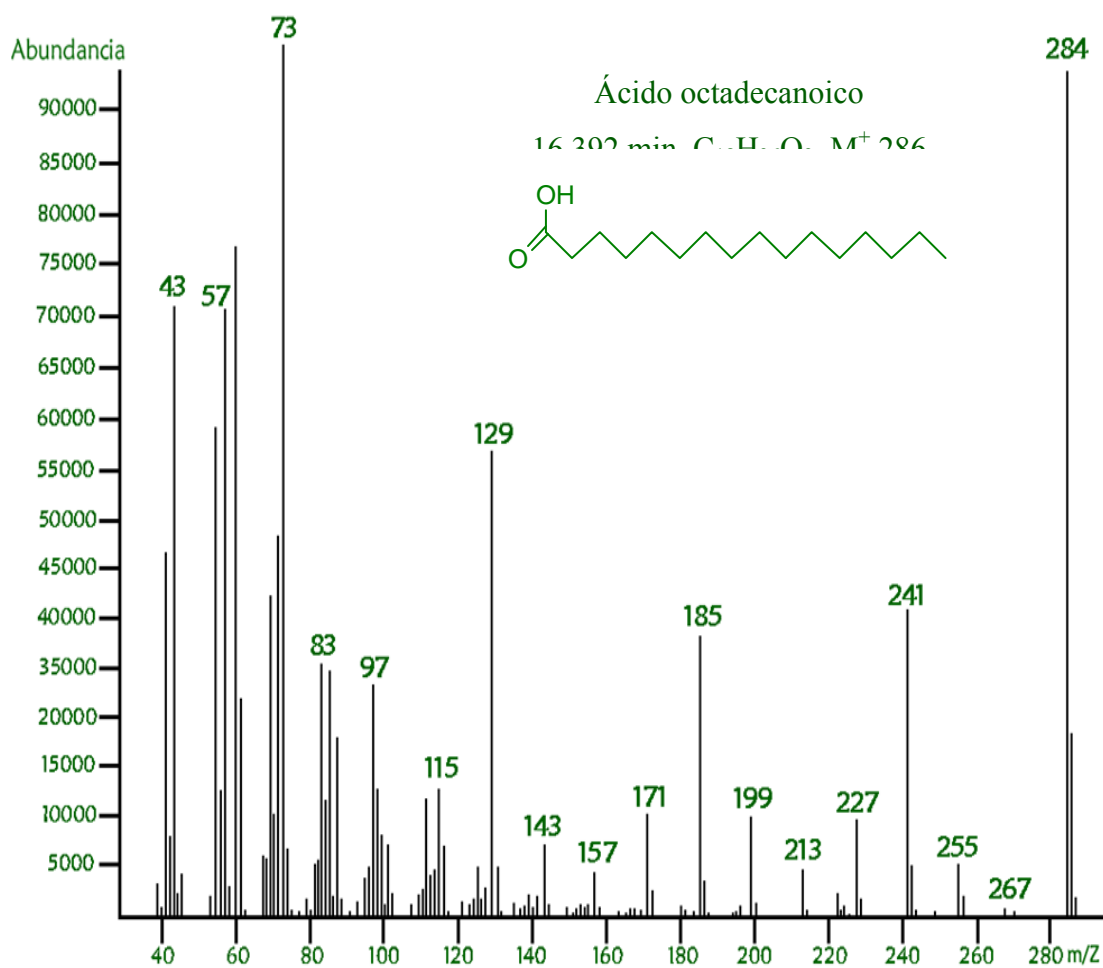


Figura 27. Espectro de masas del ácido octadecanoico.

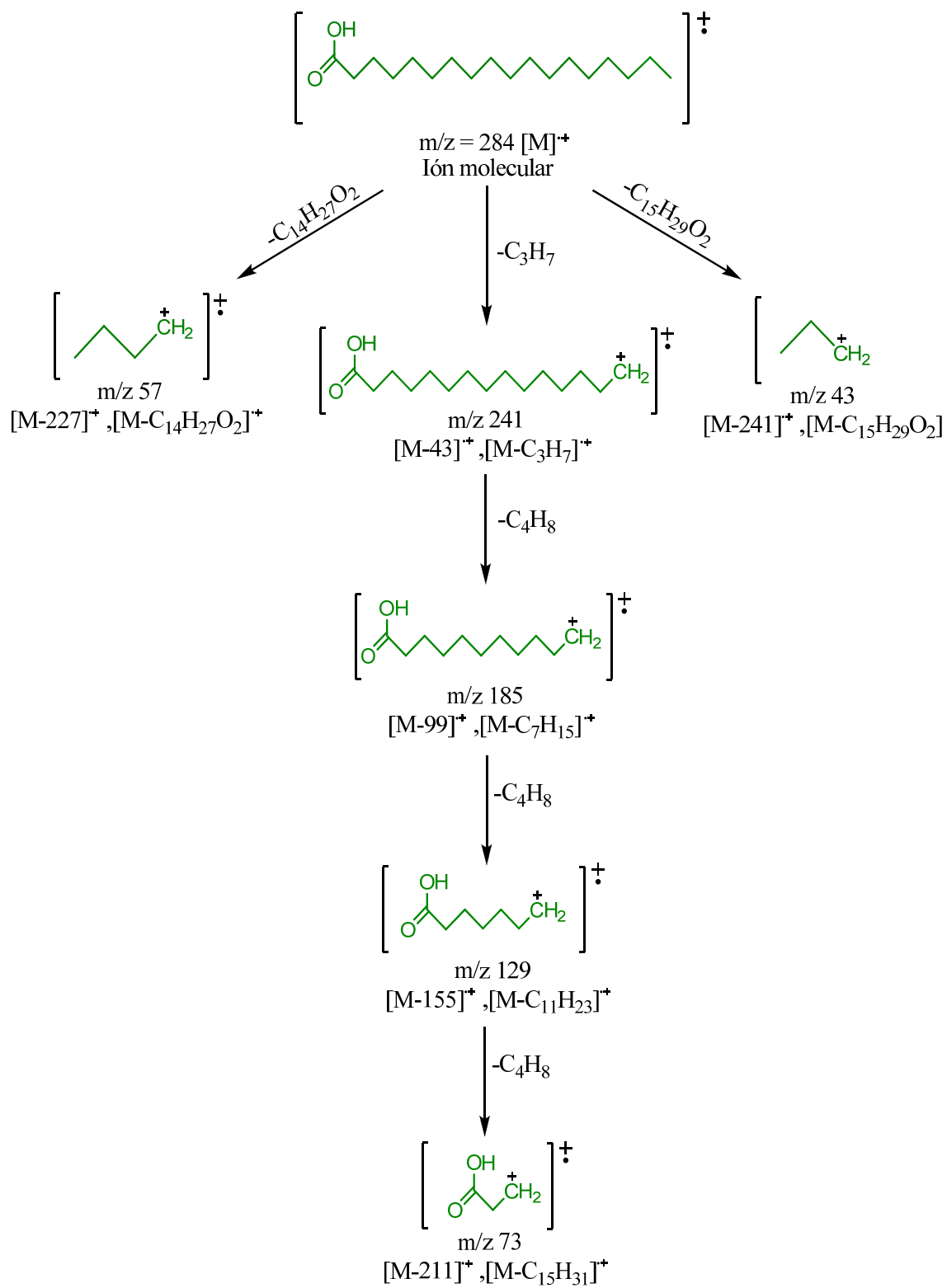


Figura 28. Patrón de fragmentación de ácido octadecanoico.

Hasta ahora, son muy limitadas las investigaciones respecto a la composición de ácidos grasos en algas. Un estudio realizado a tres algas rojas, de diferentes órdenes, determinó que las especies de distintos órdenes presentaban patrones similares de ácidos grasos, con cuatro ácidos grasos dominantes: palmítico, oleico, araquidónico y eicosapentanoico (8). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este estudio, debido a que entre los ácidos grasos identificados en *K. alvarezii*, perteneciente al orden Gigartinales, se identificaron por medio de CG-EM, la presencia de los ácidos palmítico, mirístico y esteárico, resultando los dos primeros los más abundantes.

La fracción G (sólido blanco en suspensión) de masa 25 mg, mostró actividad tóxica frente al crustáceo *A. salina*, con un  $CL_{50}$  de  $173,43 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; esta concentración letal media significativa, sugirió la realización de un análisis más profundo; considerándose como primer paso la recristalización de la fracción G, ya que la CCF reveló la presencia de dos compuestos posiblemente con  $R_F$  definidos. Mediante la purificación por recristalización del sólido blanco, se logró aislar el compuesto sólido denominado  $G_2$ , hecho demostrado mediante la CCF realizada a esta subfracción, la cual mostró una sola mancha al ser revelada con molibdato de amonio ácido. Mientras que la subfracción  $G_1$ , denotó la presencia de varios compuestos a través de la CCF, por lo que se descartó.

La subfracción  $G_2$  (sólido blanco) fue analizada por espectroscopia infrarroja, con la finalidad de observar los grupos funcionales presentes en la muestra, así como también por la técnica espectroscópica de identificación unidimensional de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ . Su espectro IR (Figura 29) presentó las siguientes bandas de absorción:  $3\ 410 \text{ cm}^{-1}$  (tensión -O-H),  $3\ 010 - 2\ 820 \text{ cm}^{-1}$  (tensión =C-H, aromáticos),  $1\ 755 - 1\ 380 \text{ cm}^{-1}$  (sobretonos),  $1\ 211 \text{ cm}^{-1}$  (-C-O, éter aromático) y  $690 \text{ cm}^{-1}$  (C-H, enlace aromático fuera del plano y monosustituido por la presencia de dos bandas). Además, se realizó la medida del punto de fusión (p.f.) de este sólido  $G_2$ , igual a y presentó un p.f de  $88,5 - 90^\circ\text{C}$ .

En el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (Figura 30), a campo alto se observan cinco señales, la primera a  $\delta_{\text{H}}$  0,86 ppm, la cual integra para tres protones, visualizándose como un triplete, correspondiente a un metilo terminal, que probablemente se encuentra enlazado a un metileno, el segundo desplazamiento químico

se encuentra en  $\delta_H$  1,24 ppm, la cual integra para dos protones, asignables a un metileno; la tercera señal aparece a  $\delta_H$  1,53 ppm, integrando para dos protones asignables a un metileno unido a un C-H (metínico), como cuarta señal se observó a  $\delta_H$  3,84 ppm un singlete correspondiente a un protón unido a un carbón oxigenado, a  $\delta_H$  4,42 ppm está presente la señal de un protón anomérico, correspondiente al carbono unido al grupo hidroxilo. La señal de los protones aromáticos se considera que esta superpuesta con la señal del solvente (cloroformo deuterado) a campo bajo de ( $\delta_H$  7,15-  $\delta_H$  7,30) ppm. En la Tabla 15 se detallan cada una de las señales del espectro de RMN- $^1H$ .

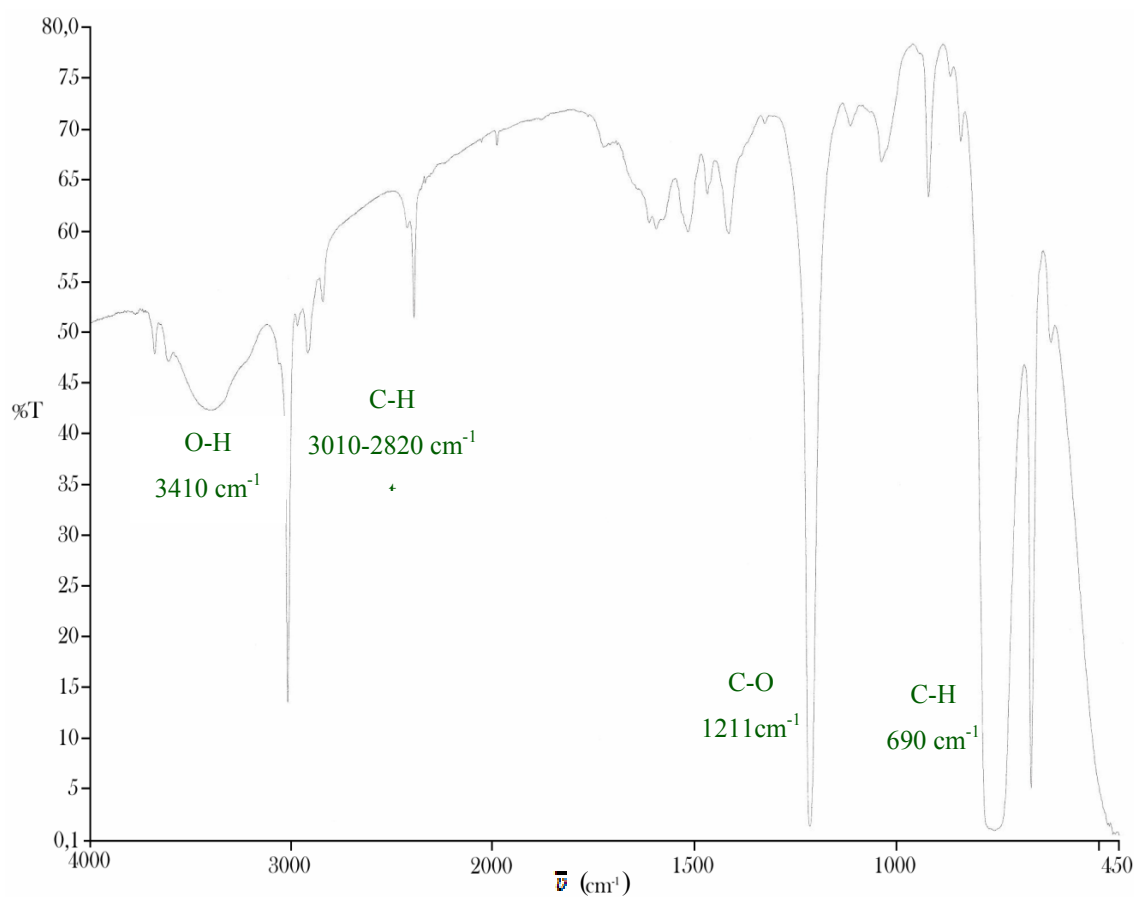


Figura 29. Espectro IR-TF de la subfracción G<sub>2</sub> indicando absorciones características de los grupos funcionales presentes.



Tabla 15. Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción G2 y sus respectivas señales.

Asignación	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
H <sub>11</sub>	Triplete (t)	0,86	-CH <sub>3</sub>
H <sub>10</sub>	Multiplete (m)	1,24	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -
H <sub>9</sub>	Cuarteto (q)	1,53	CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
H <sub>8</sub>	Singulete (s)	3,84	-OH
H <sub>7</sub>	Triplete (t)	4,42	$\begin{array}{l} \diagup \\ \text{CH} \\ \diagdown \end{array}$ -OH
H <sub>1</sub> -H <sub>6</sub>	Singulete (s)	7,15 - 7,30	Ar-H

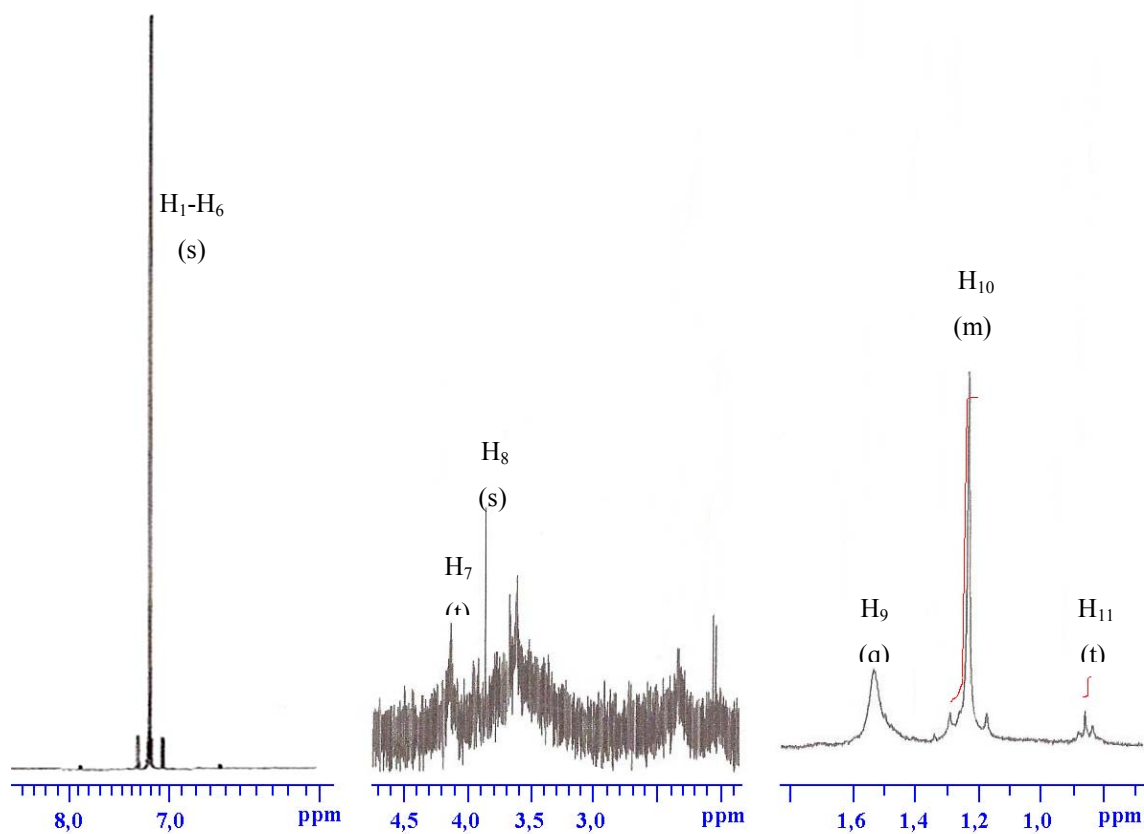


Figura 30. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la subfracción G<sub>2</sub>, ampliado en la región de las señales con su respectiva asignación.

A través de este otro análisis espectroscópico como lo es el DEPT-135° (Figura 31), se pudo establecer una posible estructura para el compuesto presente en esta subfracción G<sub>2</sub>, ayudando a identificar los tipos de carbonos presentes en la estructura propuesta. Se pudo constatar la presencia del grupo metilo terminal, de los carbonos metilénicos y de los carbonos del anillo aromático (Figura 32).

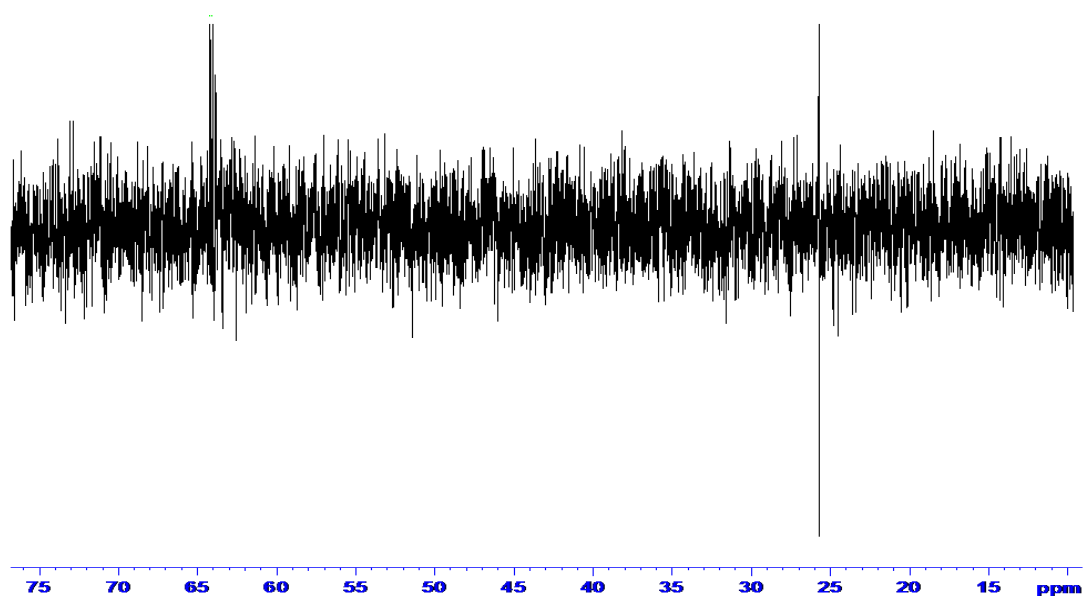


Figura 31. Espectro DEPT-135 de la subfracción G<sub>2</sub>.

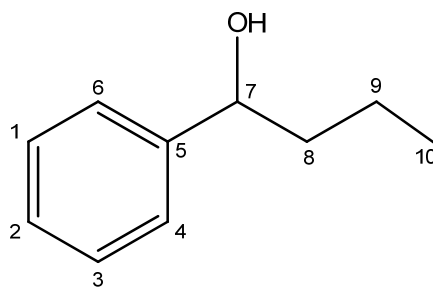


Figura 32. Posible estructura propuesta para G<sub>2</sub>.

En la Figura 33 se muestran los diferentes desplazamientos químicos  $\delta_H$  teóricos para una estructura similar, según el programa predictor del ChemBioDraw, los cuales fueron comparados con los datos experimentales del RMN- $^1H$  de la subfracción G<sub>2</sub>. Resultando varias señales con  $\delta_H$  muy parecidos, reiterando la estructura propuesta anteriormente para dicha subfracción.

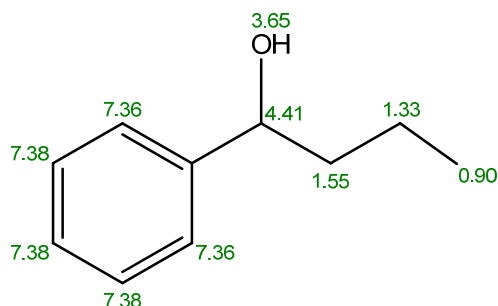


Figura 33. Posible estructura propuesta para G<sub>2</sub>, indicando  $\delta_H$  teóricos.

La cromatografía en capa fina realizada a la fracción H (sólido grisáceo), reveló la presencia de algunos compuestos con  $R_f$  bien definidos y considerando también su  $CL_{50}$  261,70  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , se decidió separar en lo posible los constituyentes de la fracción. Para tal finalidad, se le realizó una cromatografía de columna a esta, utilizándose éter de petróleo para el empaquetamiento de la columna; los solventes eluyentes fueron mezclas de éter de petróleo- cloroformo y cloroformo- AcOEt. Los eluatos recolectados fueron contentivos de 25 ml; se obtuvieron 23 eluatos (Tabla 16), los cuales al realizar la CCF se juntaron, mediante la comparación de sus respectivos  $R_f$ , conformando finalmente cuatro subfracciones (Tabla 17).

Del material cromatografiado se recuperó una masa total de 44,90 mg, lo cual representó el 88,9% de rendimiento. De las subfracciones obtenidas, FH<sub>3</sub> presentó en la CCF realizada tres manchas, indicando la posible presencia de más de un compuesto, por lo que se tomó la decisión de realizarle un análisis por CG-EM, pudiéndose así identificar esos compuestos presentes en esta subfracción; sin embargo, el mismo aún no ha podido realizarse en el IVIC.

Tabla 16. Fraccionamiento por CC de la fracción H del extracto en cloroformo del alga *K. alvarezii*.

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) V/V
1 – 5	Éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	60-40
6 – 10	Éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	40-60
11 – 15	CHCl <sub>3</sub>	100
16 – 19	CHCl <sub>3</sub> – AcOEt	50-50
20 – 23	AcOEt	100

Tabla 17. Subfracciones obtenidas de la CC de la fracción H del extracto en cloroformo.

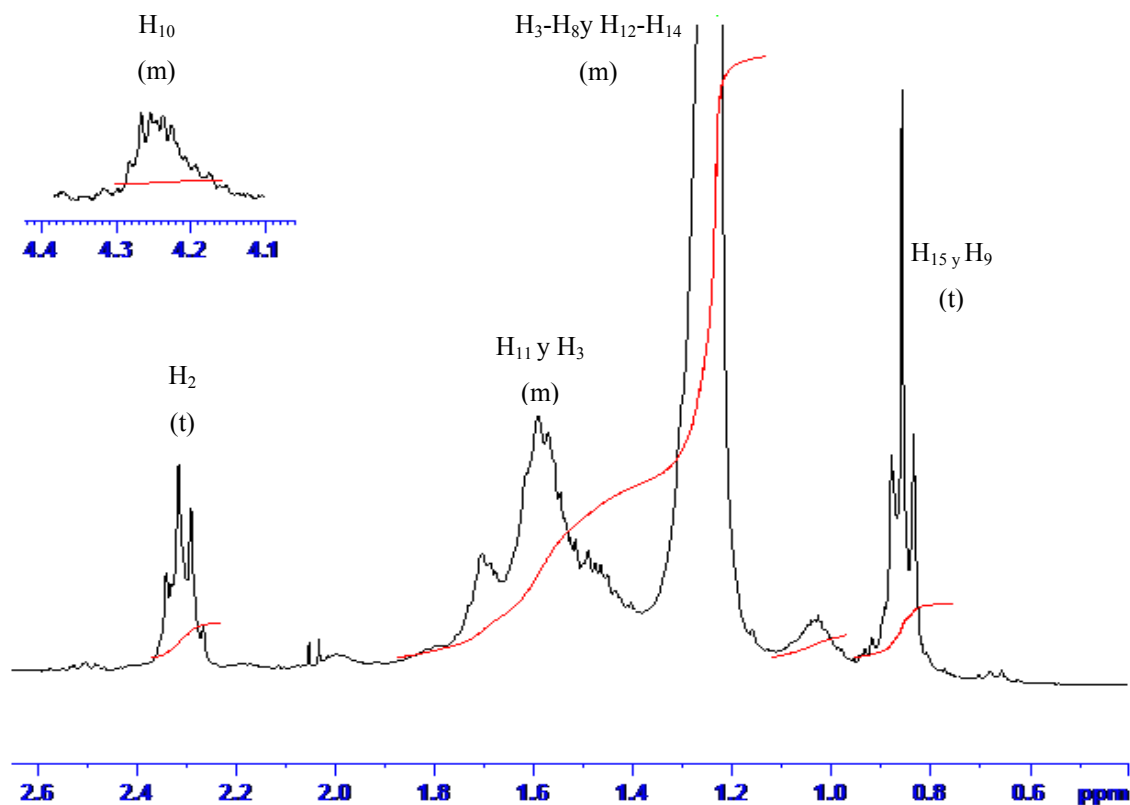
Subfracción	Eluatos	Característica	Masa (mg)
H <sub>1</sub>	1-13	Aceite verde	21,3
H <sub>2</sub>	14-18	Sólido blanco amorfo	7,8
H <sub>3</sub>	19-21	Sólido blanco amorfo	5,6
H <sub>4</sub>	22-23	Sólido grisáceo amorfo	10,2

En la CCF que se realizó a la fracción FH<sub>4</sub>, se denotó la existencia de un solo compuesto, observándose al revelar la placa con molibdato de amonio una sola mancha sin trazas con un R<sub>f</sub> definido, por lo cual se decidió analizarla mediante RMN. Además, se le midió al sólido su punto de fusión, el cual fue de 138,5 - 140°C.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 34) de la subfracción H<sub>4</sub>, mostró la presencia a campo bajo de un triplete con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  4,23 ppm (H<sub>11</sub>), correspondiente a protones metilénicos, que integra para dos hidrógenos. A campo más alto, específicamente a un desplazamiento químico de  $\delta_H$  2,32 ppm, se evidenció la presencia de un multiplete, asignado a protones metilénicos cercanos a un carbono enlazado a oxígeno, que integra para dos hidrógenos (H<sub>2</sub>). También apareció un multiplete (H<sub>3</sub>), asignado a protones de metilenos con un desplazamiento de  $\delta_H$  1,57 ppm. En la zona alifática, a  $\delta_H$  1,23-1,31 ppm, se observó un multiplete de metilenos (H<sub>9</sub>-H<sub>4</sub>) bastante intenso, en el mismo rango de estos metilenos, se considera que se encuentra superpuesta la señal del H<sub>12</sub>, que sale a 1,29 ppm, debido a que se encuentra menos apantallado por la cercanía al oxígeno. Finalmente, a un campo más alto a  $\delta_H$  0,86 ppm, el espectro mostró la presencia de un triplete correspondiente al metilo terminal que se encuentra unido a un átomo de carbono metilénico (H<sub>10</sub>) (Tabla 18).

Tabla 18. Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción FH<sub>4</sub> y sus respectivas señales.

Posición	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
H <sub>15</sub> y H <sub>9</sub>	Triplete (t)	0,88	-CH <sub>3</sub>
H <sub>8</sub> - H <sub>3</sub> y H <sub>12</sub> - H <sub>14</sub>	Multiplete (m)	1,26-1,39	-CH <sub>2</sub> -
H <sub>11</sub> y H <sub>3</sub>	Multiplete (m)	1,64	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-
H <sub>2</sub>	Triplete (t)	2,37	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-
H <sub>10</sub>	Multiplete (m)	4,23	-COO- CH <sub>2</sub>

Figura 34. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la subfracción H<sub>4</sub>, ampliado en la región de las señales con su respectiva asignación.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 35) de este compuesto, evidenció señales indicativas de un C<sub>13</sub>. A desplazamientos químicos comprendidos entre  $\delta_C$  32,74 ppm y 14,13 ppm, aparecen varias señales correspondientes a carbonos metilénicos; a  $\delta_C$  14,10 ppm, están presentes carbonos metílicos (CH<sub>3</sub>-R); (Tabla 19).

Tabla 19. Algunos desplazamientos químicos obtenidos del espectro de RMN<sup>13</sup>C de la subfracción H<sub>4</sub> y sus respectivas señales.

$\delta_C$ (ppm)	Tipo de carbono
32, 74 – 28,80	R-CH <sub>2</sub> -R
25, 20 – 14,13	R-CH <sub>2</sub> -R
14,15	-CH <sub>3</sub> -

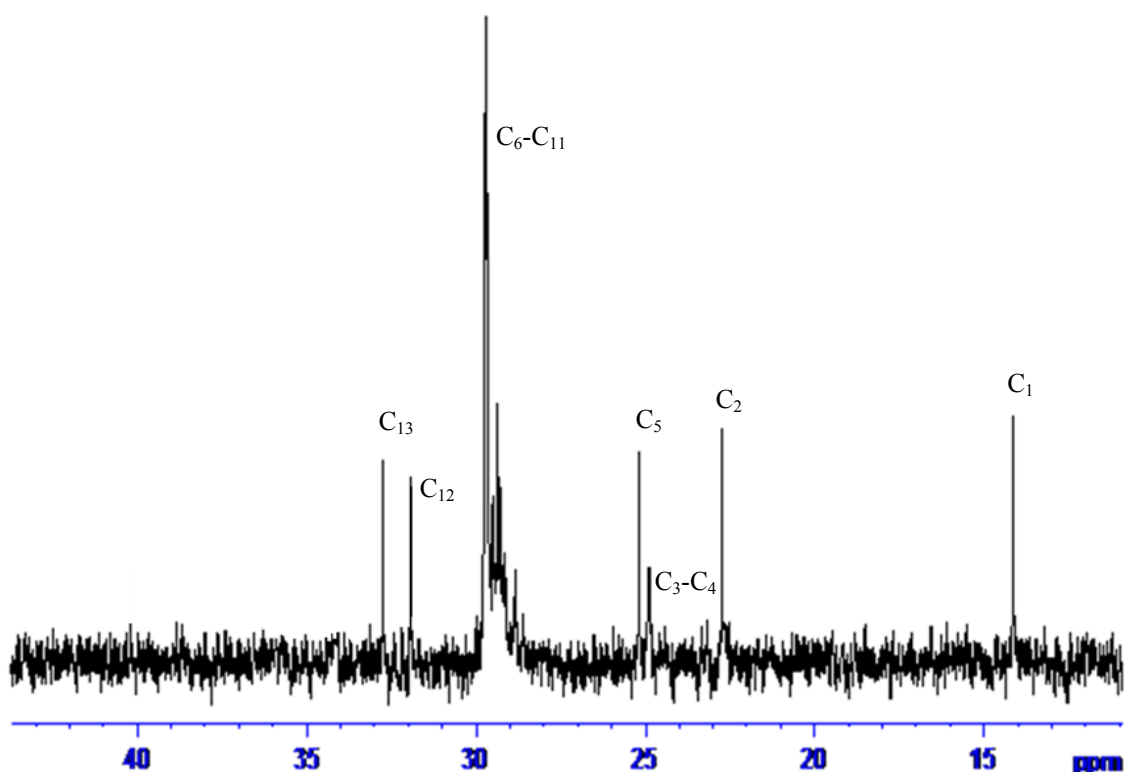


Figura 35. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de la subfracción H<sub>4</sub>.

El análisis de COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H permitió asignar la correlación existente entre los átomos de hidrógenos presentes en la molécula, lográndose, de esta manera, proponer una estructura que se acopla con toda y cada una de las señales. El espectro de COSY-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Figura B1-Apéndice B) reveló una señal que correlaciona a los protones asumidos como H<sub>2</sub> con el protón vecino asignado como H<sub>3</sub> (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-); así como

una señal de correlación entre  $H_{11}$  con el protón vecino asignado como  $H_{14}$ ; y ora conectividad vecinal que relaciona al protón  $H_{11}$  con el protón  $H_{15}$  del metil terminal.

Los análisis de HMQC, HMBC, RMN- $^1H$  y RMN- $^{13}C$  permitieron asignar la correlación existente entre los átomos de carbonos e hidrógenos presentes en la molécula lográndose, de esta manera, proponer una estructura acorde con todas y cada una de estas señales (Figura 36). Estos datos se comprobaron con los desplazamientos químicos obtenidos para el compuesto haciendo uso del programa RMN predictor del Skecht 3.5. El espectro de HMBC (Figura B4), presentó una señal que correlaciona a los protones asumidos como  $H_2$  con el carbono del grupo carbonilo designado como  $C_1$  (R-CH<sub>2</sub>-CO-O). El carbono identificado como  $C_{10}$ , que se encuentra enlazado al oxígeno del grupo carbonilo, apareció a un desplazamiento químico de  $\delta_C$  65,22 ppm y mostró correlación directa, de acuerdo al HMQC (Figura B2- Figura B3), con los protones asignados como  $H_{10}$ . El carbono  $C_2$ , el cual se observó a un  $\delta_C$  34,12ppm y se encuentra vecino al  $C_1$ , presentó conectividad directa, según el HMQC, con los hidrógenos asignado como  $H_2$ , los cuales aparecen en forma de triplete de acuerdo al RMN  $^1H$ . Según el HMBC, el carbono tres ( $C_3$ ) está correlacionado con los protones metilénicos enlazados al carbono  $C_2$ , vecino al carbono del grupo carbonilo ( $C_1$ ); éste también muestra correlación directa con los protones metilénicos ( $H_5$ - $H_7$  y  $H_{10}$ - $H_{14}$ ), asignados a la cadena alifática del compuesto. Los carbonos identificados como  $C_7$  y  $C_{13}$ , con desplazamiento químico de  $\delta_C$  31,58 y 31,92 ppm, mostraron correlación HMQC y HMBC con los protones metilénicos ( $H_5$ - $H_7$  y  $H_{10}$ - $H_{14}$ ) que aparecieron a  $\delta_H$  1,23 ppm. Estos carbonos también interaccionaron, según el HMBC, con los hidrógenos pertenecientes a grupos metilos terminales ( $C_9$  y  $C_{15}$ ).

Los carbonos identificados como  $C_4$ - $C_5$  y  $C_{11}$ -  $C_{13}$ , corresponden a un grupo de metilenos que forma parte de la cadena alifática del compuesto y mostraron correlación, de acuerdo el HMQC y HMBC, con los hidrógenos que aparecen a un desplazamiento químico de  $\delta_H$  1,26 ppm, señalados como  $H_5$ - $H_7$  y  $H_{10}$ - $H_{14}$ . De acuerdo con el HMQC, los protones metilénicos  $H_{10}$ , que aparecen como un multiplete muestran conectividad directa con el carbono  $C_{10}$ ; además, éste también mostró conectividades, según el HMBC, con los protones metilénicos  $H_{11}$  y  $H_9$  que aparecen a  $\delta_H$  1,64 ppm y  $\delta_H$  4,23

ppm, respectivamente. Según el HMQC y HMBC, los carbonos C<sub>8</sub> y C<sub>14</sub> están relacionados con los carbonos metilénicos de la parte alifática del éster; además, por HMBC mostraron conectividades con los hidrógenos metílicos terminales identificados como H<sub>9</sub> y H<sub>15</sub>, los cuales a su vez están relacionados directamente, de acuerdo el HMQC, con los carbonos C<sub>9</sub> y C<sub>15</sub>. Estos resultados se resumen en la Tabla 20. Según el análisis combinado de RMN de 1D y 2D, posiblemente, el compuesto FH<sub>4</sub> elucidado sea un éster alifático (Figura 37).

Tabla 20. Correlación entre los desplazamientos químicos de RMN<sup>13</sup>C, HMQC y HMBC

$\delta_C$ (ppm)	HMQC ( $\delta_H$ )	HMBC ( $\delta_H$ )
173,94 C <sub>1</sub>	-	2,37 H <sub>2</sub>
34,12 C <sub>2</sub>	2,37 H <sub>2</sub>	-
25,37 C <sub>3</sub>	1,64 H <sub>3</sub>	-
29,34 -29,05 C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> y C <sub>11</sub> -C <sub>13</sub>	1,26 H <sub>4</sub> -H <sub>8</sub> y H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub>	1,26 H <sub>4</sub> -H <sub>8</sub> y H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub>
31,91-31,58 C <sub>7</sub> ,C <sub>13</sub>	1,26 H <sub>4</sub> -H <sub>8</sub> y H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub>	1,26 H <sub>4</sub> -H <sub>8</sub> y H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub> 0,86 H <sub>8</sub> , H <sub>15</sub>
65, 22 C <sub>10</sub>	4,23 H <sub>10</sub>	-
28,93 C <sub>9</sub>	1,64 H <sub>11</sub>	4,23 H <sub>10</sub> 1,26 H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub>
25,02 C <sub>7</sub> - C <sub>14</sub>	1,64 H <sub>4</sub> -H <sub>8</sub> y H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub>	1,64 H <sub>4</sub> -H <sub>8</sub> y H <sub>11</sub> -H <sub>14</sub> 0,88 H <sub>9</sub> , H <sub>15</sub>
14,15 C <sub>9</sub> , C <sub>15</sub>	0,88 H <sub>9</sub> , H <sub>15</sub>	-

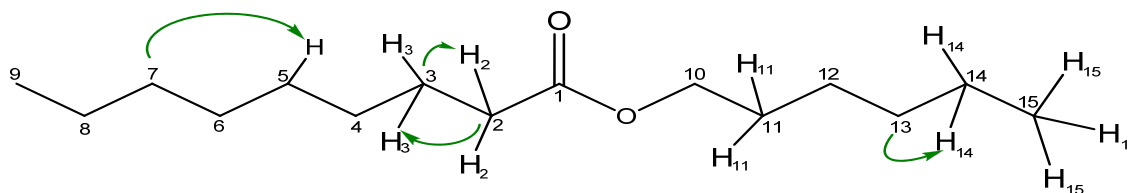


Figura 36. Estructura propuesta indicando para la subfracción FH<sub>4</sub>, algunas interacciones HMBC.



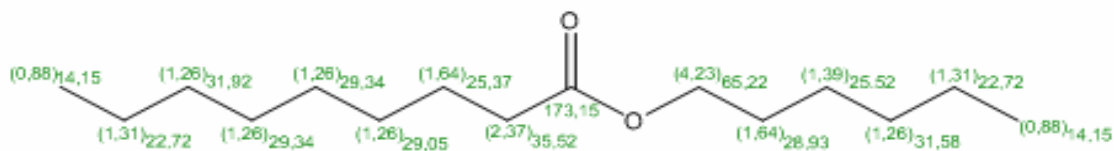


Figura 37. Estructura del compuesto H4, indicando los  $\delta H$  y  $\delta C$  respectivos.

### Fraccionamiento del extracto crudo en acetato de etilo de *K. alvarezii*

Al extracto soluble en AcOEt (EAE) de *K. alvarezii*, se le realizó varias capa fina (CCF) con diferentes mezclas de éter petróleo-AcOEt (3:2; 2:3; 1:4; 1:1 V/V) y se revelaron usando una solución de molibdato de amonio ácido. Las CCF reflejaron la presencia de poca cantidad de compuestos, con  $R_f$  no muy cercanos entre sí y de fácil separación. Considerando la cantidad de extracto crudo (810 mg) y la posible presencia de pocos compuestos con  $R_f$  bien separado, se decidió separar los mismos del extracto mediante la realización de una cromatografía de capa fina preparativa (CCFP); para tal fin, se utilizaron 110 mg de muestra y dos placas de vidrio de (20 x 20) cm<sup>2</sup>, recubiertas con sílica-gel 60 mesh de 0,5 mm de espesor (esto debido a la cantidad de mg de muestra a utilizar) una mezcla 2:3 V/V de éter de petróleo-AcOEt como eluyente; el revelado evidenció la presencia de 4 fracciones (Tabla 21). En la Figura 38 se muestra el diagrama de separación.

Tabla 21. Fracciones obtenidas de la CCFP del extracto en acetato de etilo (EAE) proveniente de *K. alvarezii*.

Fracción	$R_f$	Masa (mg)
A <sub>1</sub>	0,13	48,3
A <sub>2</sub>	0,28	6,0
A <sub>3</sub>	0,45	10,7
A <sub>4</sub>	0,87	24,6

De la CCFP realizada al EAE se recuperaron 89,6 mg, lo cual representó el 81,45% del material cromatografiado. A cada fracción obtenida se les realizó CCF en distintas mezclas de solventes, observándose tres bandas, en A<sub>2</sub> (combinación de aceite amarillo y sólido amorfo blanquecino), lo cual sugirió debido a su característica y a la

masa obtenida, un análisis de la misma por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), con el objeto de identificar en lo posible la mayoría de los metabolitos presentes en dicha fracción.

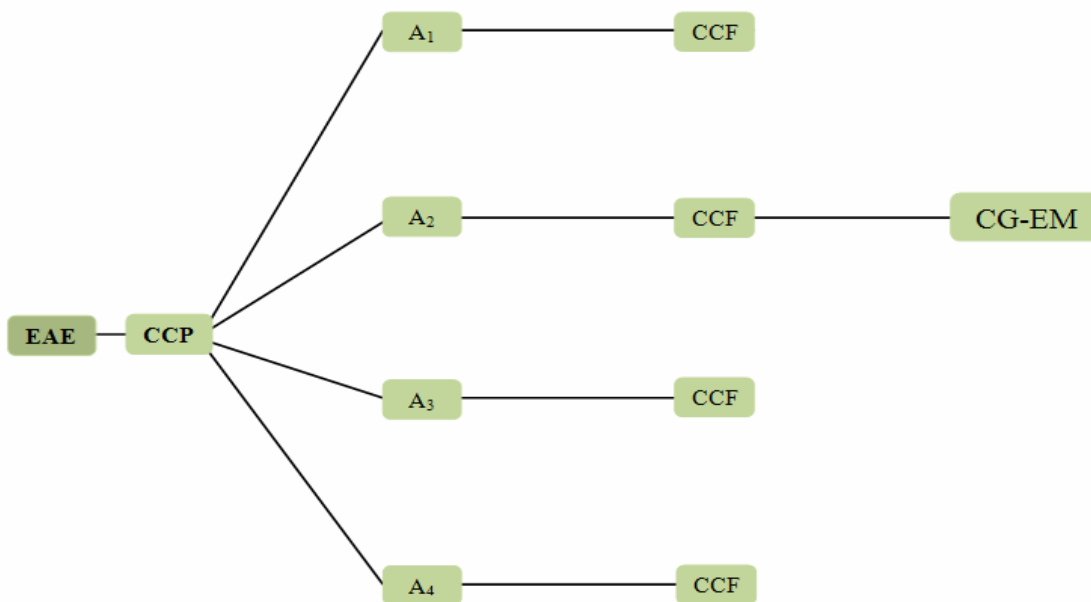


Figura 38. Diagrama de fraccionamiento del extracto soluble en acetato de etilo del alga *K. alvarezii*.

El cromatograma de gases (Figura 39) de la fracción  $A_2$  presentó cuatro constituyentes en mayor proporción: el dibutilftalato (VI), el ácido hexadecanoico (V), el 1-(1-propoxietoxi)propano (II) y el colestano (VII), los cuales fueron observados a tiempos de retención de 19,10; 14,90; 9,34 y 22,92 min, respectivamente (Tabla 22).

El espectro de masas del compuesto I (Figura 40) mostró un ión molecular a  $m/z$  136  $[M^+]$ , el cual corresponde a la fórmula molecular  $C_8H_8O_2$ . Los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a  $m/z$  91 (pico base), 65 y 39. En la Figura 41, se observa el patrón de fragmentación correspondiente a este compuesto, donde se muestra la estructura de estos fragmentos.

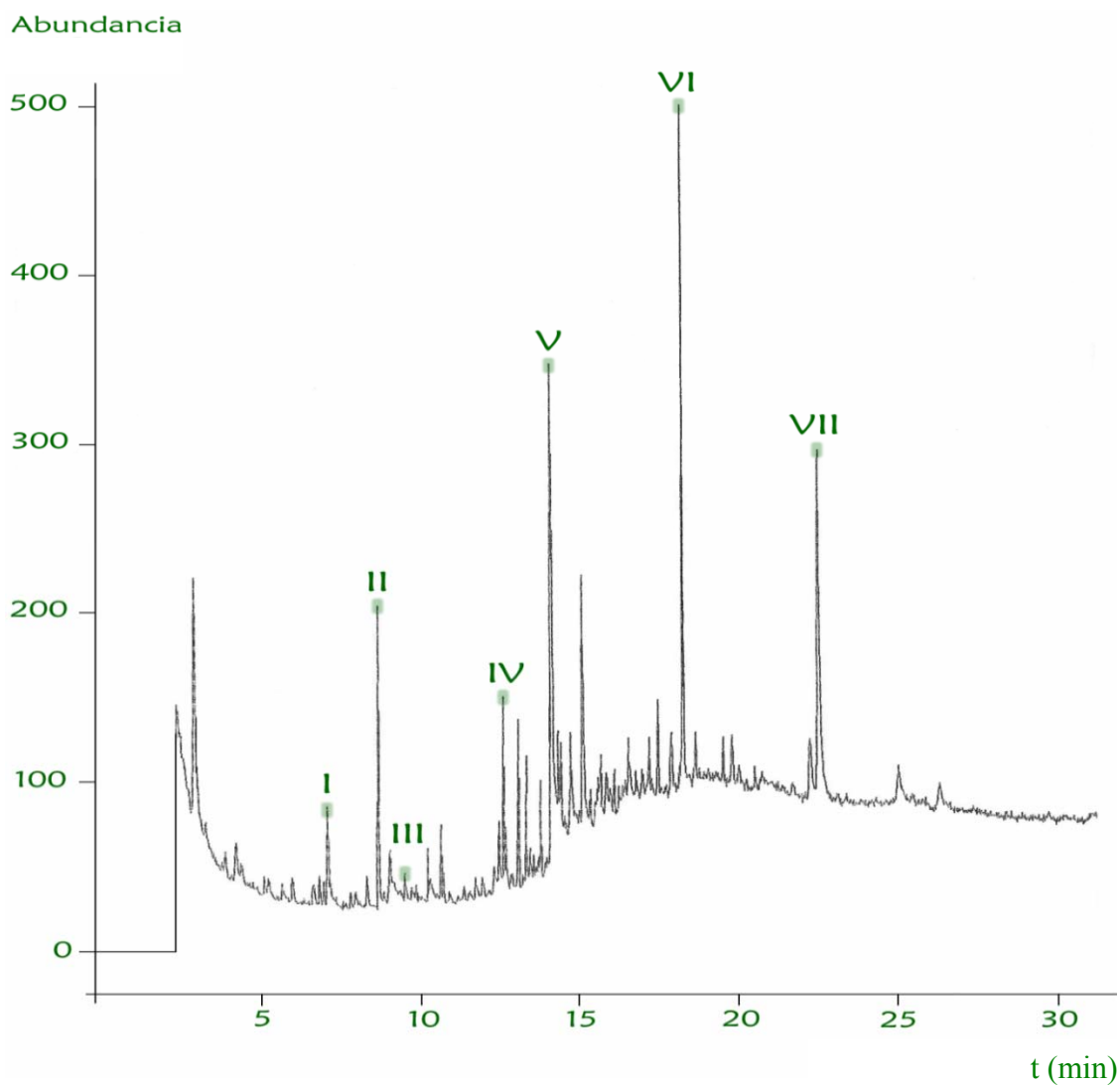


Figura 39. Cromatograma de gases de la fracción A<sub>2</sub>.

Tabla 22. Compuestos identificados en la fracción A<sub>2</sub> mediante CG-EM.

Pico	Tr (min)	M <sup>+</sup>	Compuesto	Grupo Químico	Fórmula molecular
I	7,74	136	Ácido 2-fenilacético	Ácido carboxílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
II	9,34	146	1-(1-propoxietoxi)propano	Alcano	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
III	10,19	220	2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	Cetona aromática	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
IV	13,75	268	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	Cetona alifática	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O
V	14,90	256	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
VI	19,10	278	Dibutilftalato	Éster aromático	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
VII	22,92	372	Colestano	Esterol	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub>

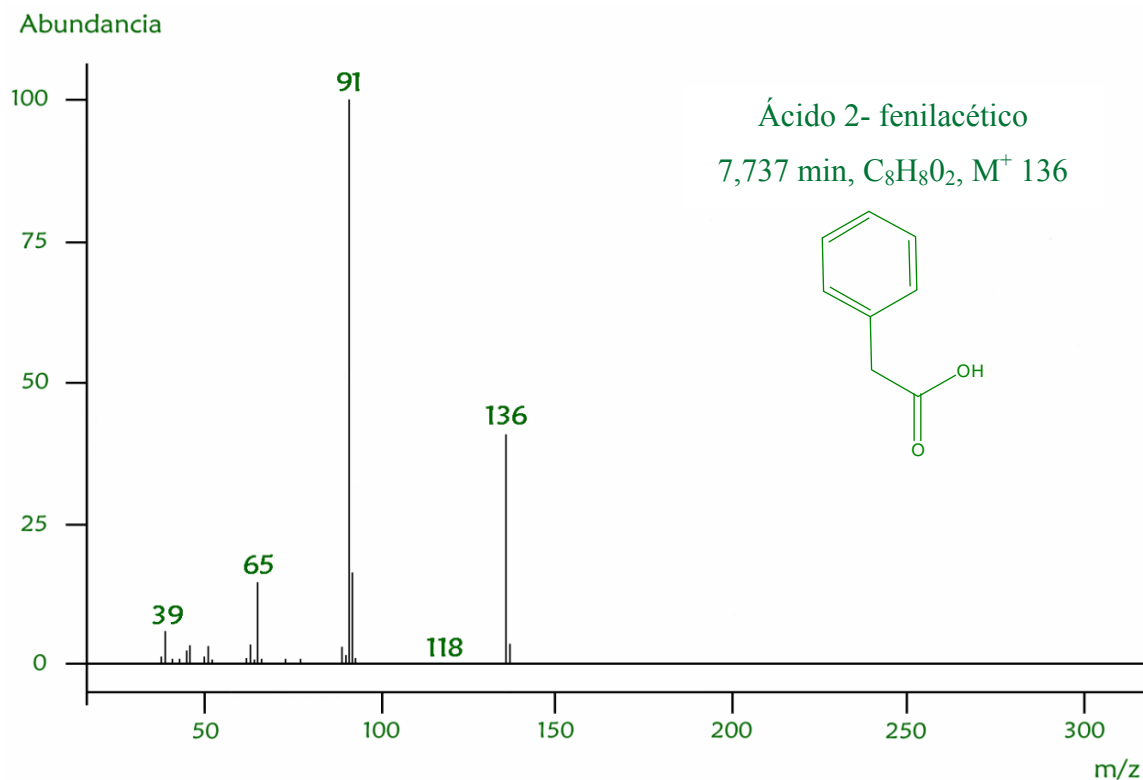


Figura 40. Espectro de masas del ácido 2- fenilacético.

Dado que el grupo carbonilo (C=O) presente en la molécula propuesta para este espectro, presenta cierta estabilidad ante la fragmentación, el ión molecular se presenta en el espectro (m/z 136). Como se muestra en la Figura 41, los valores de m/z inferiores a éste, se pueden explicar por la escisión del enlace siguiente a C=O, generando las especies correspondientes a valores de m/z de 118, 91 (pico base), 65 y 39, respectivamente. En el primer caso, se propone en el patrón de fragmentación, que el compuesto ácido se deshidrata durante la fragmentación generando la especie iónica a un m/z de 118, con la posterior escisión del sistema carbonilo.

El compuesto identificado con el número dos (II) fue uno de los que se encontraba en mayor proporción en la fracción A<sub>2</sub> y por consiguiente uno de los más abundantes en la mezcla, y tuvo relación con el 1-(1-propoxietoxi)propano, el cual se detectó con un tiempo de retención de 9,34 min y no evidenció el ión molecular correspondiente a m/z 146[M<sup>+</sup>], en el respectivo espectro de masas (Figura 42).

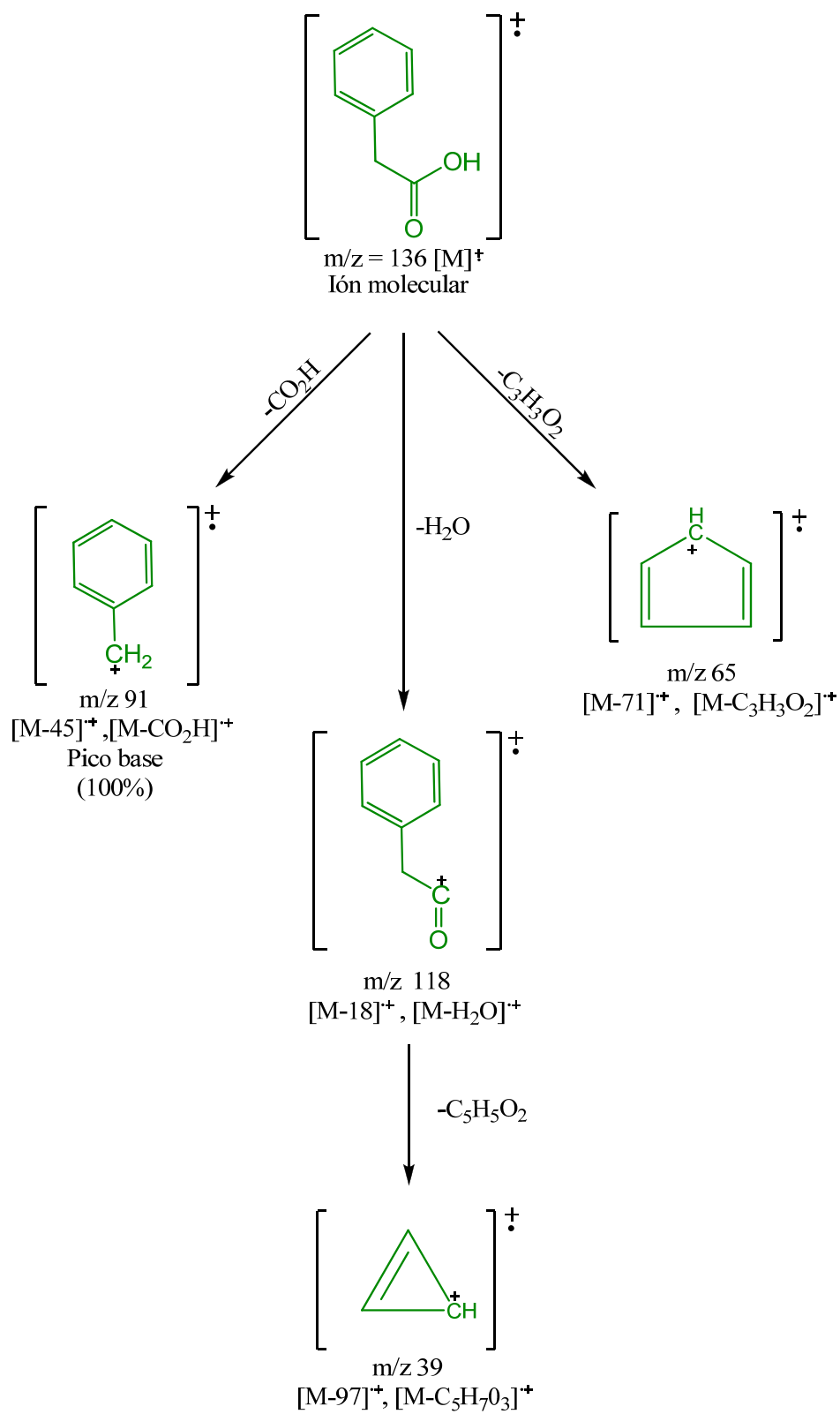


Figura 41. Patrón de fragmentación del ácido 2- fenilacético.

El compuesto (II) sufrió una fragmentación rápida perdiendo un  $-\text{CH}_3$ ,  $m/z$  concerniente  $131[\text{M}^+]$ , los otros picos; más abundantes aparecieron a  $m/z$  87, 58, 45 y 31, cuyo patrón de fragmentación muestra la estructura de cada uno de ellos (Figura 43). La mayoría de los fragmentos correspondientes a cada una de las señales, mostradas en el espectro de masas, se obtuvieron mediante pérdidas graduales de grupos metilos y metilénicos de las cadenas laterales, con la formación de iones-radicales.

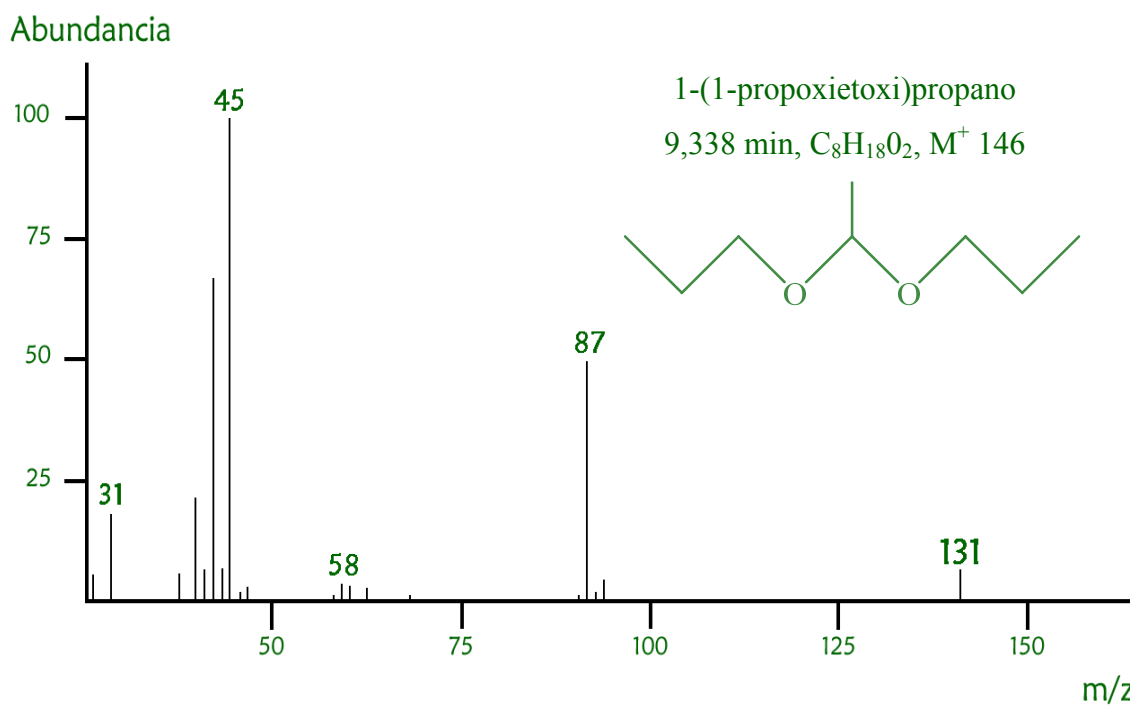


Figura 42. Espectro de masas del 1-(1-propoxietoxi) propano.

El compuesto identificado con el número tres (III), fue el que se encontraba en menor proporción en la fracción  $\text{A}_2$  y tuvo relación con el 2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona, el cual se detectó a un tiempo de retención de 10,19 min y evidenció el ión molecular correspondiente a  $m/z$  220  $[\text{M}^+]$ , en el respectivo espectro de masas (Figura 44). Los picos más abundantes aparecieron a  $m/z$  177 (pico base), 135 y 41, cuyo patrón de fragmentación muestra la estructura de cada uno de ellos (Figura 45).

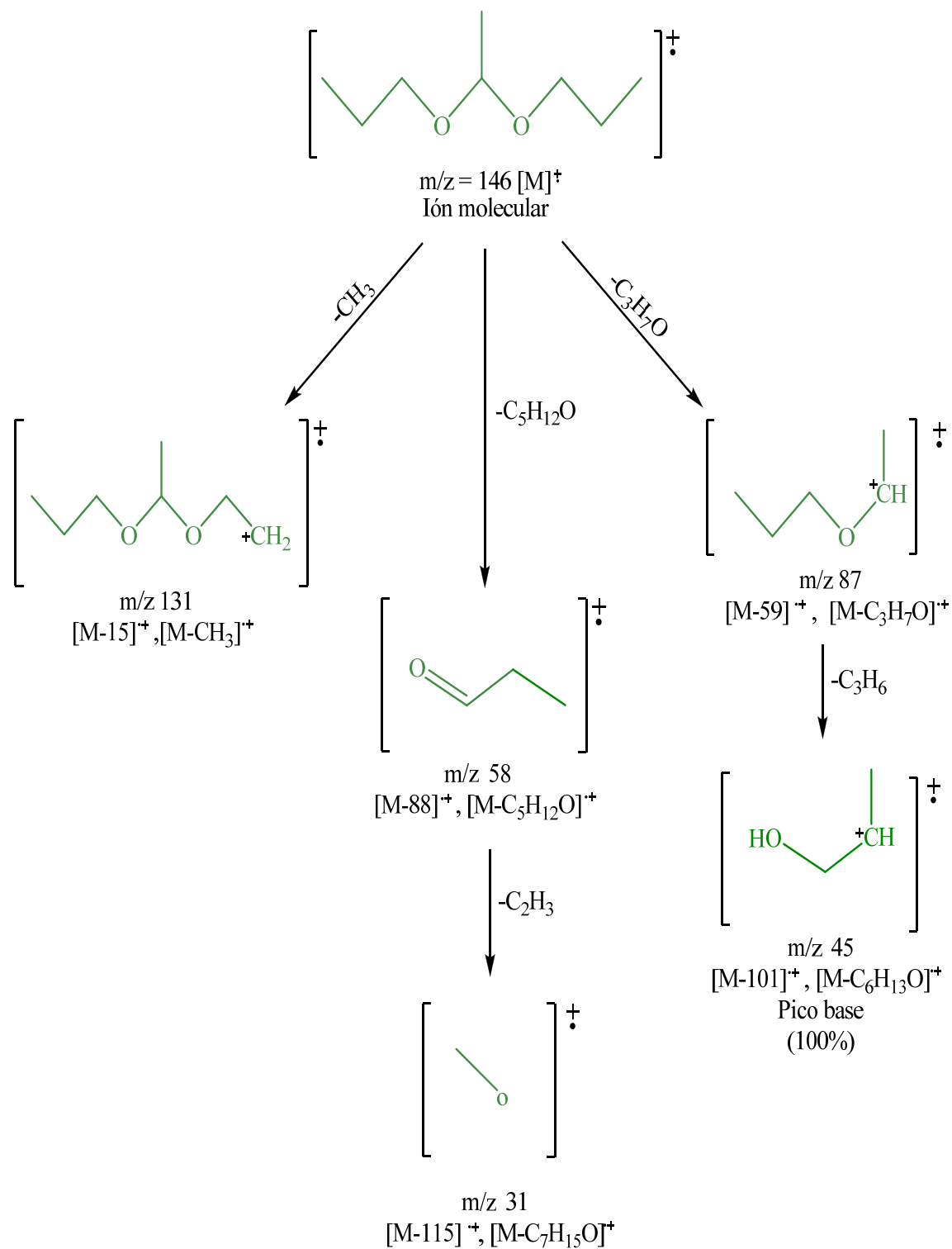


Figura 43. Patrón de fragmentación del ácido 1-(1-propoxietoxi) propano.

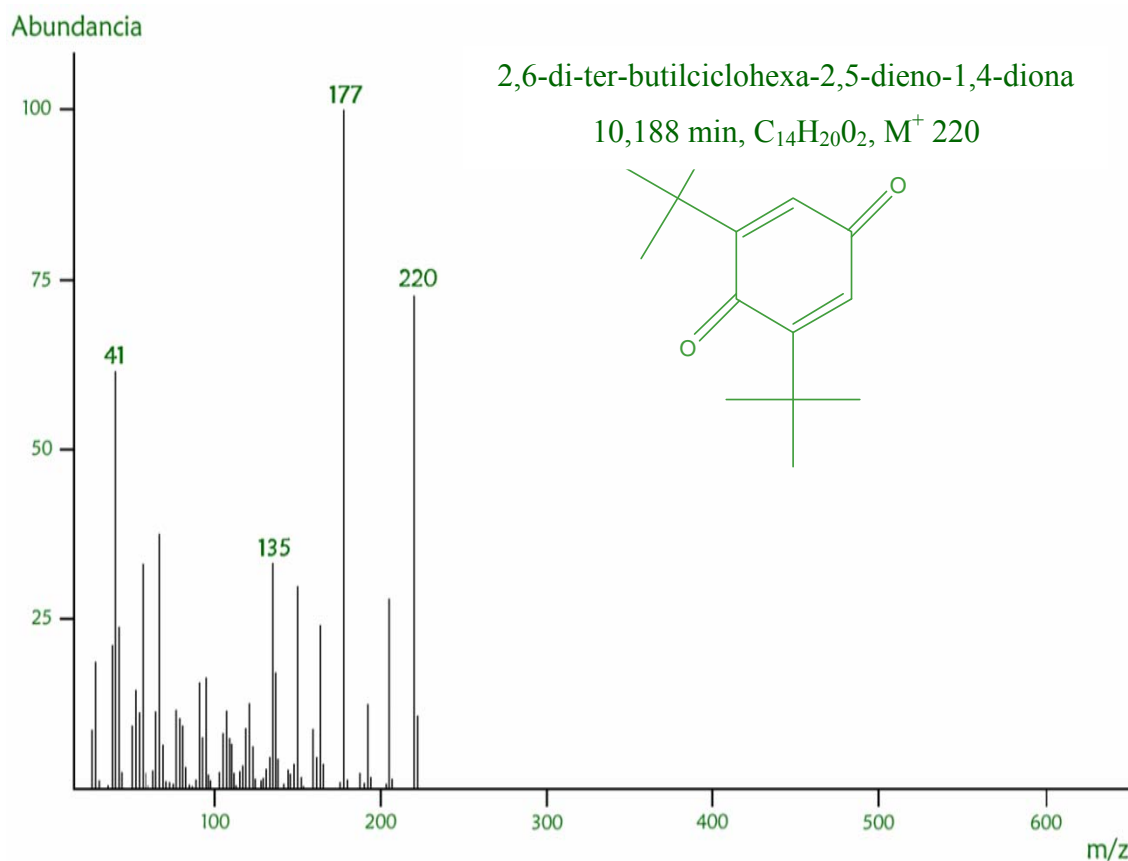


Figura 44. Espectro de masas de la 2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona.

A un tiempo de retención de 13,76 minutos, apareció la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, encontrada en mayor proporción en la fracción A<sub>2</sub>. El espectro de masas de este compuesto (Figura 46), desplegó un ión molecular a m/z 250 [M<sup>+</sup>], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 210, 165 y 43 (pico base). El patrón de fragmentación para este compuesto es mostrado en la Figura 47.

Este metabolito, también conocido como hexahidrofarnesil acetona, ha sido reportado en diversas especies de plantas tales como: la fracción hexánica de las hojas de *Ludwigia octovalvis*, la cual presenta actividad tóxica contra *Artemia salina*, antibacteriana contra *S. aureus* y citotóxica en huevos de erizo de mar *Lytechinus variegatus* (100).



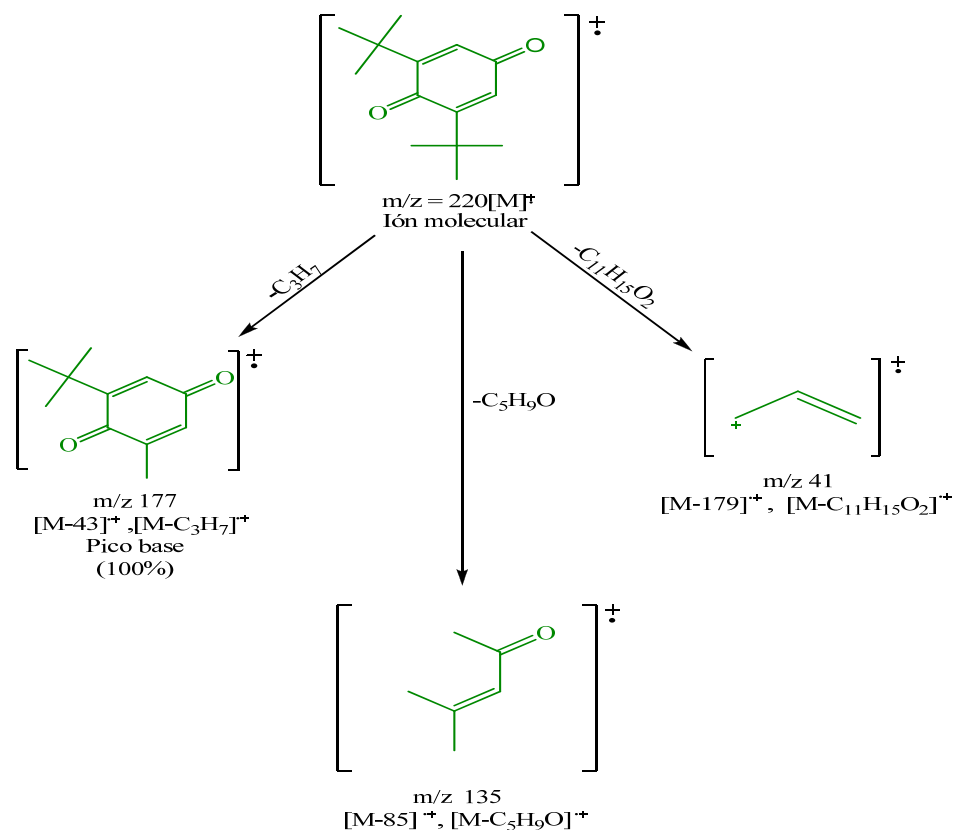


Figura 45. Patrón de fragmentación de la 2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona.

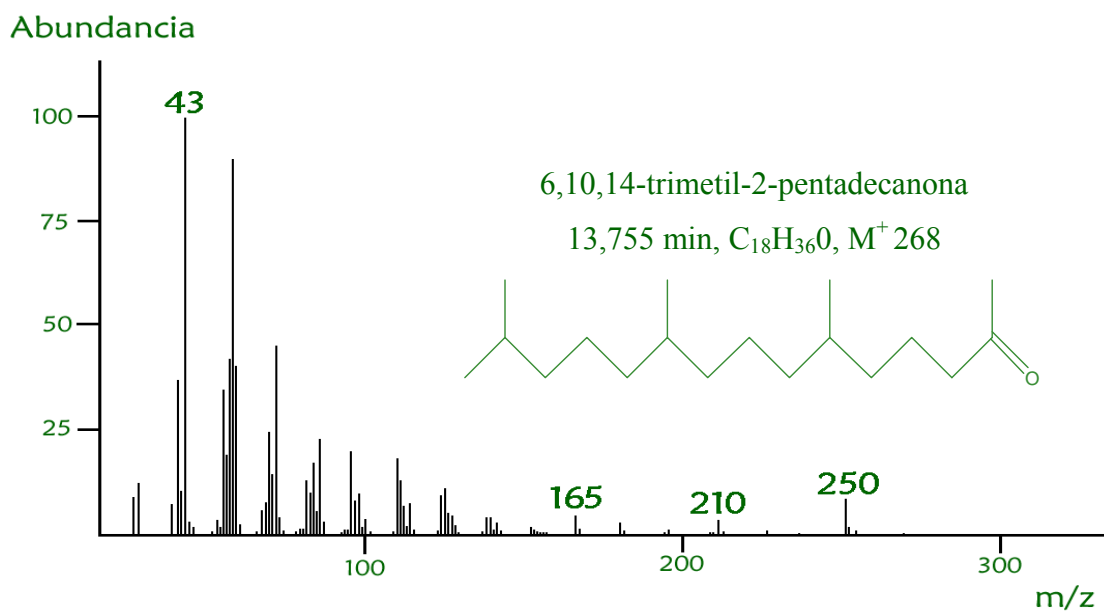


Figura 46. Espectro de masas de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

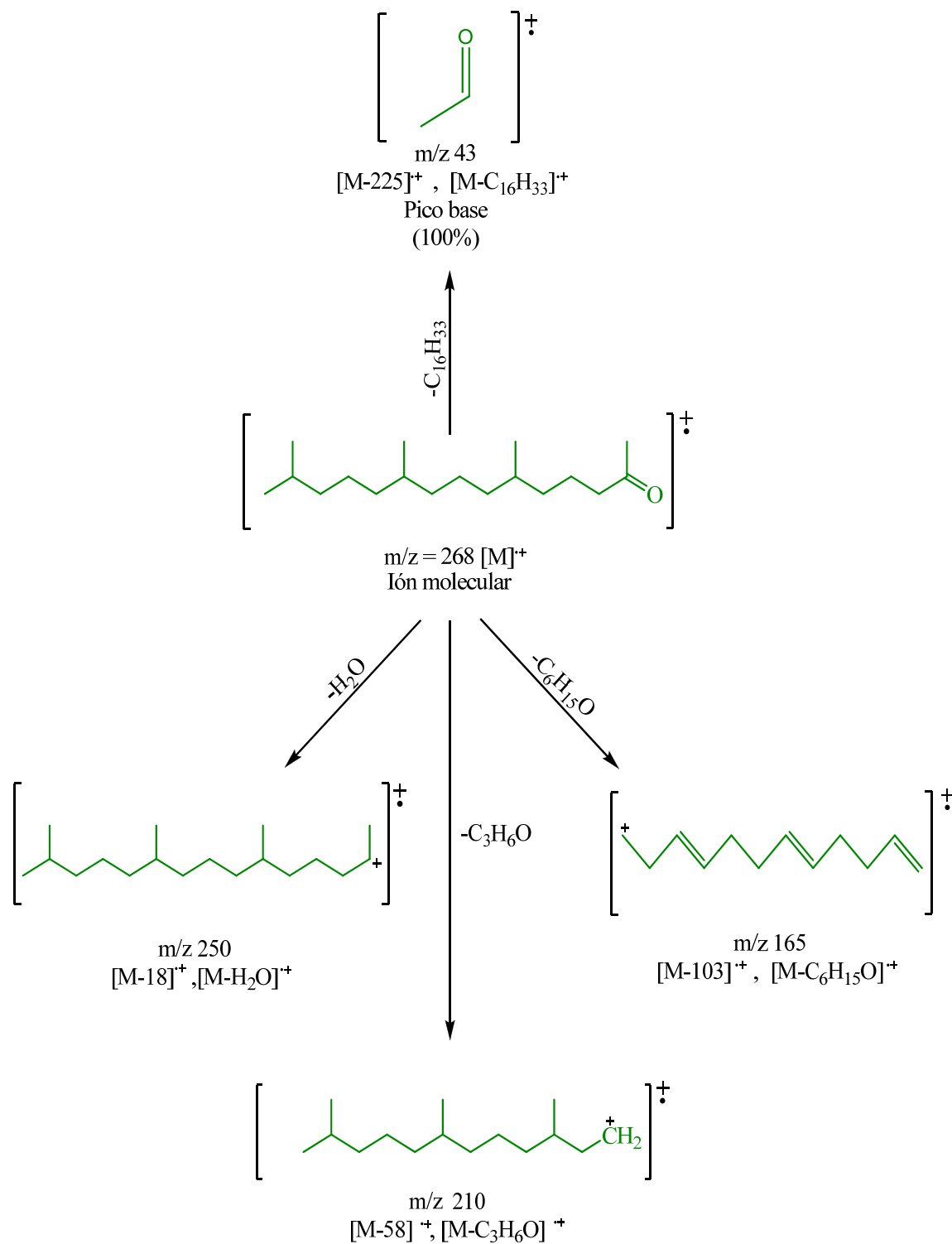


Figura 47. Patrón de fragmentación de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

En el espectro de masas de VI (Tr = 19,11 min), se observó un ión molecular a  $m/z$  278, el cual corresponde a la fórmula molecular  $C_{16}H_{22}O_4$  (calculado 278,34  $g \cdot mol^{-1}$ ). Los picos significativos se observaron a  $m/z$  223  $[M-C_4H_7]^+$ , 205  $[M-C_4H_9O]$ , 149  $[M-C_8H_{17}O]$  y 57  $[M-C_{12}H_{13}O_4]$ , ver Figura 48. Estos fragmentos indicaron la presencia de un sistema aromático diéster, identificado como dibutilftalato (DBP), como compuesto mayoritario (Figura 49).

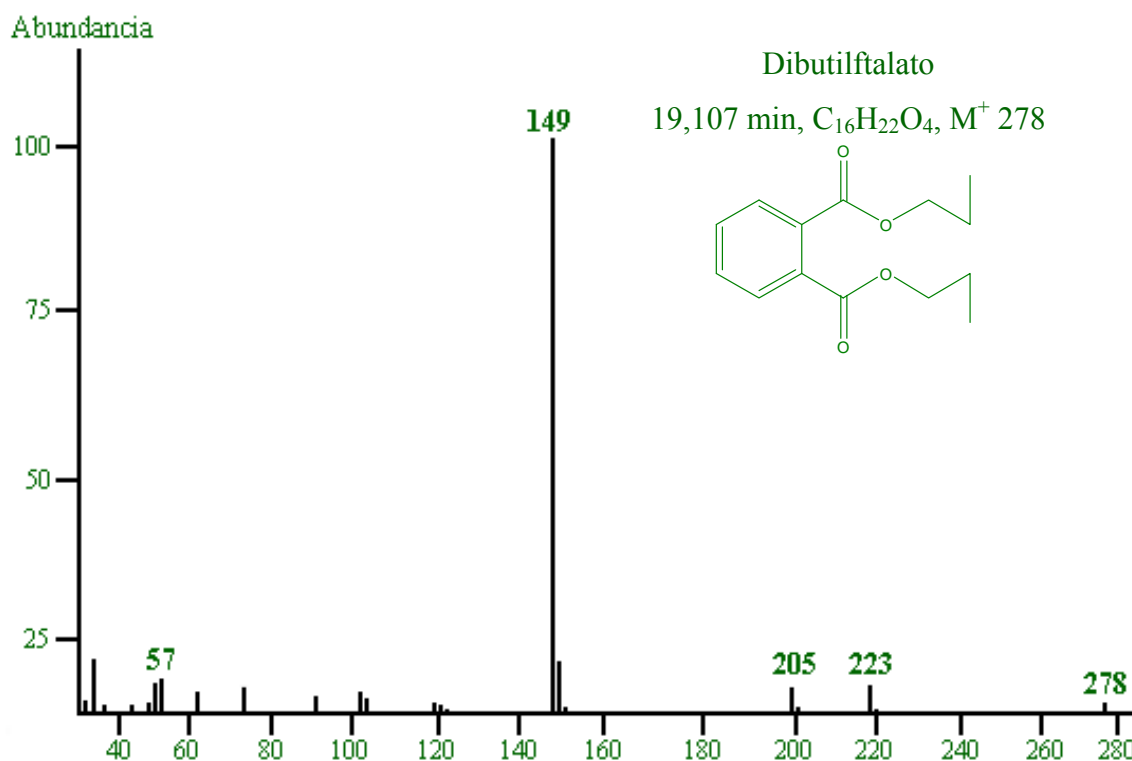


Figura 48. Espectro de masas de la dibutilftalato.

Los dialquilftalatos, tales como el DBP, son productos petroquímicos que se consideran como agentes contaminadores del ambiente y se han detectado en suelos, sedimentos, aguas terrestres y marinas, y también en organismos vivos. Sin embargo, se ha demostrado que este tipo de compuestos pueden estar presentes de forma natural y no por contaminación, tal como lo refieren investigaciones realizadas sobre la abundancia natural del contenido de  $^{14}C$  de DBP en tres especies de algas marinas (101).

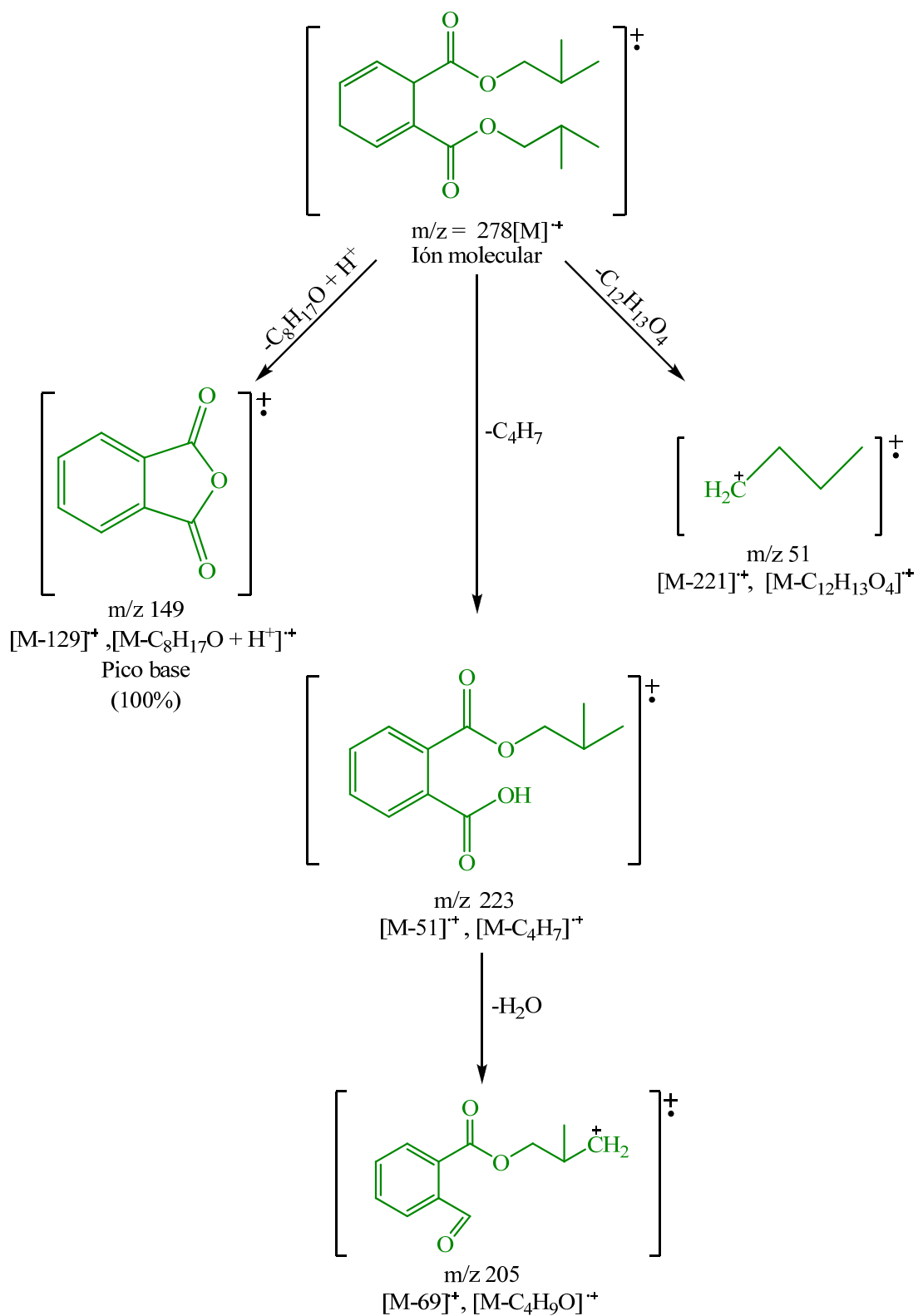


Figura 49. Patrón de fragmentación del dibutilfthalato.

A un tiempo de retención de 22,93 minutos, apareció el esteroide colestano, uno de los compuestos mayoritarios de la fracción A<sub>2</sub>. Pudiendo observarse el pico característico del ión molecular en el correspondiente espectro de masas (Figura 50). Los otros fragmentos significativos se observaron a  $m/z$  357 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 315 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 217 [M-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>]<sup>+</sup>, 149 [M-C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>]<sup>+</sup>, 109 [M-C<sub>19</sub>H<sub>35</sub>]<sup>+</sup> y 43 [M-C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>]<sup>+</sup>, los mismos indicaron la presencia de un sistema esteroide, grupo químico detectado en el análisis químico preliminar del EAE (prueba positiva para esteroides). Su respectivo patrón de fragmentación, se encuentra en la Figura 51.

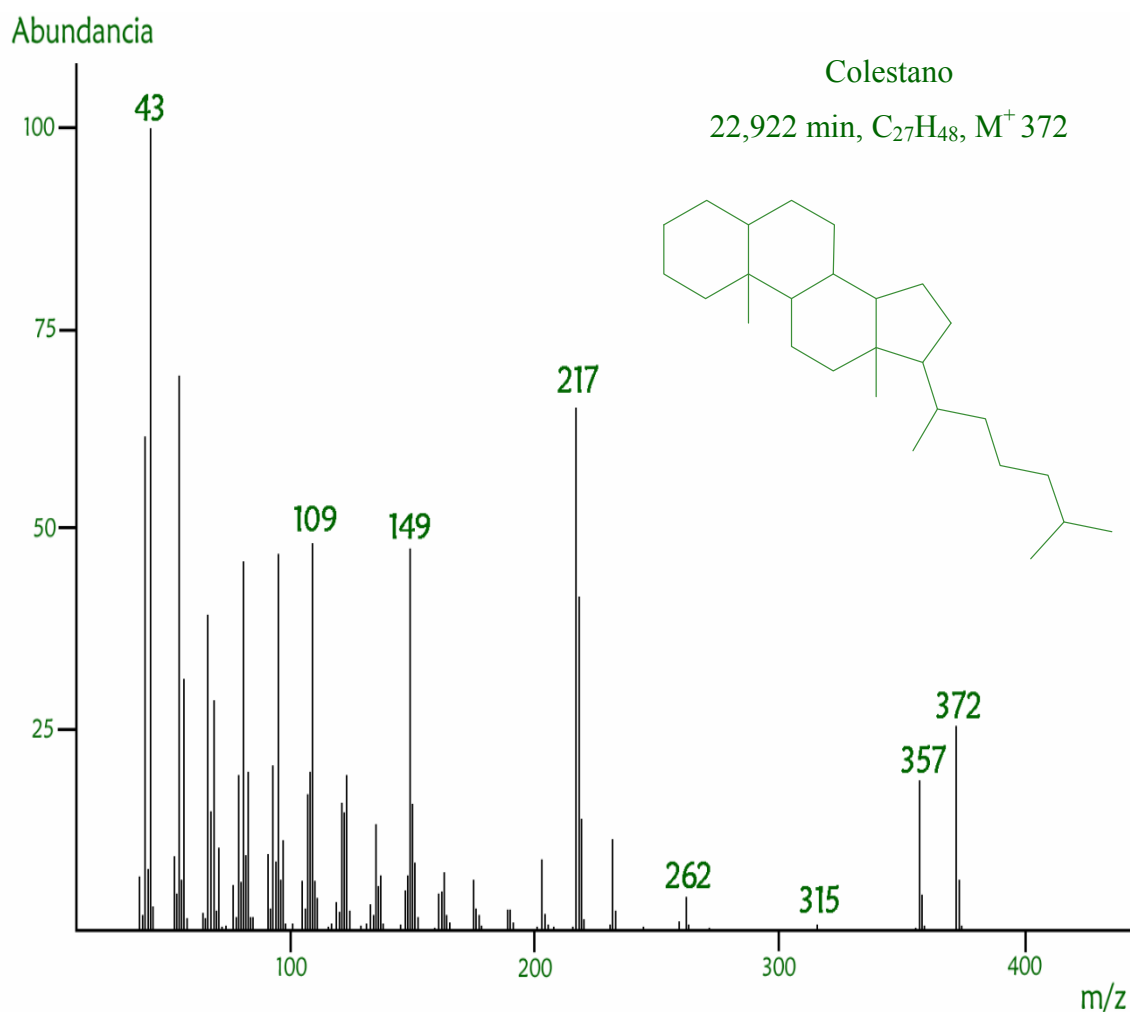


Figura 50. Espectro de masas del colestano.

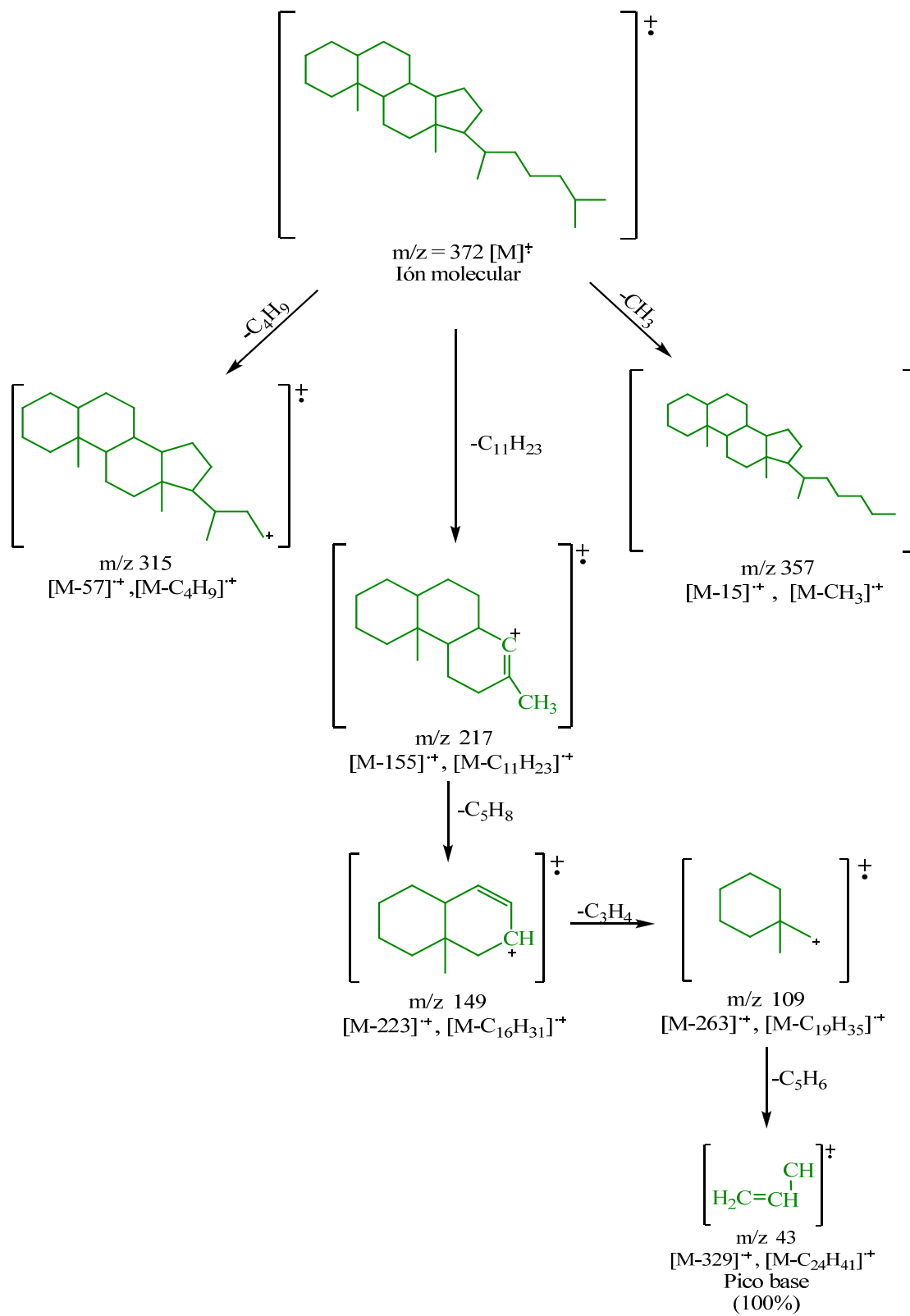


Figura 51. Patrón de fragmentación del colestano.

### Fraccionamiento del extracto crudo en metanol de *K. alvarezii*

El extracto soluble en metanol (EM), proveniente del alga *K. alvarezii*, se fraccionó por cromatografía de columna (CC) con sílica gel 35-70 mesh, en una columna de 2,5 cm de diámetro y 50 cm de largo. Se utilizaron 2,7632 g del extracto y 82,896 g de sílica en una relación 1:30 m/m. El solvente de empaquetamiento de la columna, fue éter de petróleo y se usaron mezclas en polaridad creciente de éter de petróleo-cloroformo, cloroformo-acetato de etilo y acetato de etilo-metanol, como eluyentes. Se recolectaron 43 eluatos contentivos de 50 ml cada uno (Tabla 23). En la Figura 52 se puede observar el diagrama respectivo de fraccionamiento del EM.

Tabla 23. Fraccionamiento del extracto soluble en metanol del alga *K. alvarezii*.

Eluatos	Eluyentes	Porcentaje (%) v/v
1 – 5	éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	80-20
6 – 10	éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	60-40
11 – 15	éter de petróleo – CHCl <sub>3</sub>	40-60
16 – 20	CHCl <sub>3</sub>	100
21 – 26	CHCl <sub>3</sub> – AcOEt	60-40
27 – 31	CHCl <sub>3</sub> – AcOEt	40-60
32 – 36	AcOEt	100
37 – 40	AcOEt – MeOH	50-50
41– 43	MeOH	100

A cada uno de los eluatos obtenidos de la CC del EM, se les realizó cromatografía de capa fina (CCF), empleándose mezclas de cloroformo-acetato de etilo en proporciones de 2:3 y 1:1 V/V, obteniéndose 19 fracciones (Tabla 24), por comparación de sus R<sub>f</sub>, para lo cual se emplearon como agentes reveladores luz ultravioleta y una solución ácida de molibdato de amonio.

Las CCF mostraron que las fracciones EM<sub>3</sub> y EM<sub>7</sub> fueron las que presentaron una mancha con R<sub>f</sub> bien definido. Las fracciones restantes resultaron ser mezclas más complejas de compuestos con R<sub>f</sub> muy cercanos de difícil separación. Se logró recuperar de la cromatografía de columna una masa total de 2,5565 g, lo que representó el 92,52% del material cromatografiado.

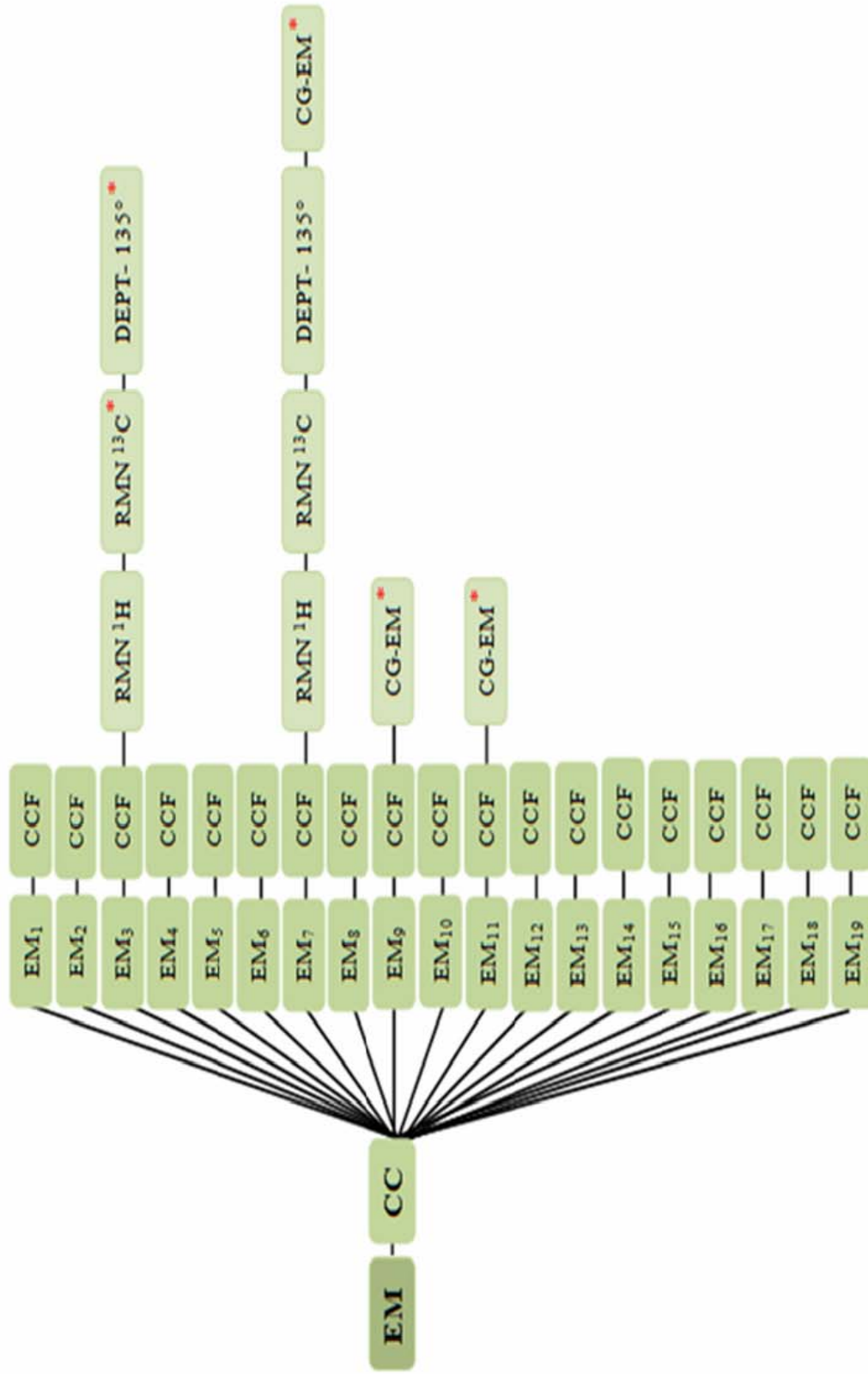


Figura 52. Diagrama de fraccionamiento del extracto soluble en metanol del alga *K. alvarezii*. (\* : Análisis en proceso)



Tabla 24. Fracciones resultantes de la CC del extracto soluble en metanol del alga *K. alvarezii*.

Fracción	Eluatos	Masa (mg)
EM <sub>1</sub>	1-2	33,72
EM <sub>2</sub>	3	16,53
EM <sub>3</sub>	4	41,32
EM <sub>4</sub>	5-7	88,19
EM <sub>5</sub>	8	27,83
EM <sub>6</sub>	9	35,42
EM <sub>7</sub>	10	19,37
EM <sub>8</sub>	11-12	69,15
EM <sub>9</sub>	13-15	143,74
EM <sub>10</sub>	16-17	112,35
EM <sub>11</sub>	18	42,37
EM <sub>12</sub>	19-21	213,95
EM <sub>13</sub>	22	20,95
EM <sub>14</sub>	23	10,86
EM <sub>15</sub>	24-30	322,15
EM <sub>16</sub>	31-34	265,33
EM <sub>17</sub>	35-37	372,18
EM <sub>18</sub>	38	172,84
EM <sub>19</sub>	39-42	548,27

Posteriormente, se decidió analizar ambas fracciones (EM<sub>3</sub> y EM<sub>7</sub>), por medio de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de EM<sub>3</sub> (Figura 53) del extracto metanólico, mostró la presencia a campo alto de un triplete con un desplazamiento químico de  $\delta_H$  0,89 ppm, correspondiente a protones metilo (-CH<sub>3</sub>) terminal. A campo más alto, específicamente a un desplazamiento químico de  $\delta_H$  1,32 ppm, se evidenció la presencia de un multiplete, asignados a señales correspondientes a protones metilénicos (-CH<sub>2</sub>). Mientras que a los  $\delta_H$  1,88 y 2,65 ppm, se logró observar en la ampliación del espectro de RMN <sup>1</sup>H de la región a campo alto, la presencia de dos singletes bien definidos, posiblemente correspondientes a grupos metilos unidos a un carbono cuaternario (olefínico), por lo cual se observan dos singletes muy cercanos. En el rango  $\delta_H$  3,06-3,54 ppm, apareció un multiplete asignado a grupos metilénicos unidos a átomos de oxígeno (grupos metoxi) y a campo bajo una señal presente como singlete a  $\delta_H$  8,54 ppm, asignable a protones aromáticos (Ar-H) con el mismo ambiente químico. Tomando

en cuenta los desplazamientos químicos observados en el espectro se puede establecer la existencia en EM<sub>3</sub> de una mezcla de compuestos aromáticos con grupos metoxi y sustituyentes alquílicos, a pesar de que la CCF mostró un solo compuesto, se trató de 2 o más, con estructuras similares, toda vez que mostraron el mismo R<sub>f</sub>.

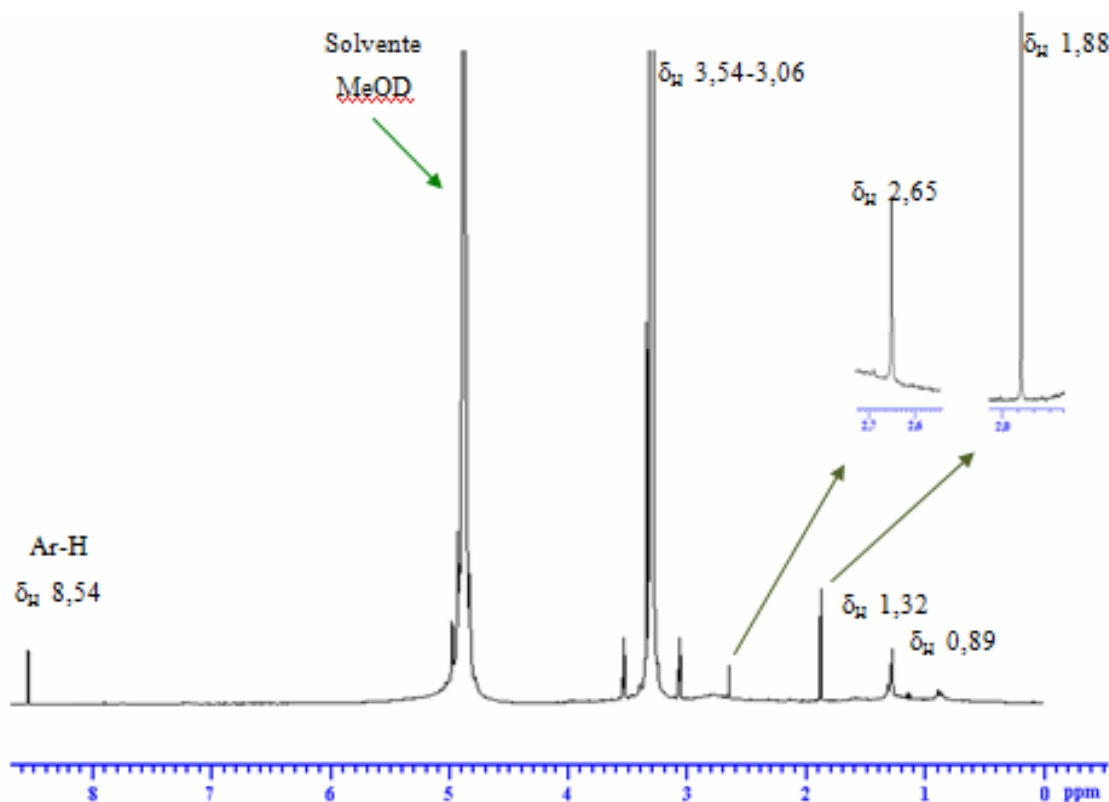


Figura 53. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción EM<sub>3</sub>.

La fracción EM<sub>7</sub>, analizada a través de resonancia magnética de protón (RMN-<sup>1</sup>H), del extracto metanólico (Figura 54), mostró la presencia a campo alto de un triplete con un desplazamiento químico de δ<sub>H</sub> 0,89 ppm, correspondiente a un (-CH<sub>3</sub>) terminal, unido a un metileno (H<sub>17</sub>) que integra para tres hidrógenos. A campo menos alto, apareció un multiplete (H<sub>3</sub>), asignado a protones de metilenos más desapantallados con un desplazamiento de δ<sub>H</sub> 1,59 ppm. Además, en la misma zona alifática, se evidenció a δ<sub>H</sub> 1,23-1,31 ppm, un multiplete (H<sub>9</sub>-H<sub>4</sub>) bastante intenso; en el mismo rango de estos metilenos, se considera que se encuentra superpuesta la señal del H<sub>12</sub>, que sale a 1,29

ppm, debido a que se encuentra menos apantallado por la cercanía al oxígeno (Figura 55). En la Tabla 25, se encuentran todos los desplazamientos químicos tabulados.

Tabla 25. Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción EM<sub>7</sub> y sus respectivas señales.

Posición	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
H <sub>18</sub>	Triplete (t)	0,86	-CH <sub>3</sub>
H <sub>4</sub> - H <sub>17</sub>	Multiplete (m)	1,23	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
H <sub>3</sub>	Multiplete (m)	1,59	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-
H <sub>2</sub>	Triplete (t)	2,33	-CH <sub>2</sub> -COO-

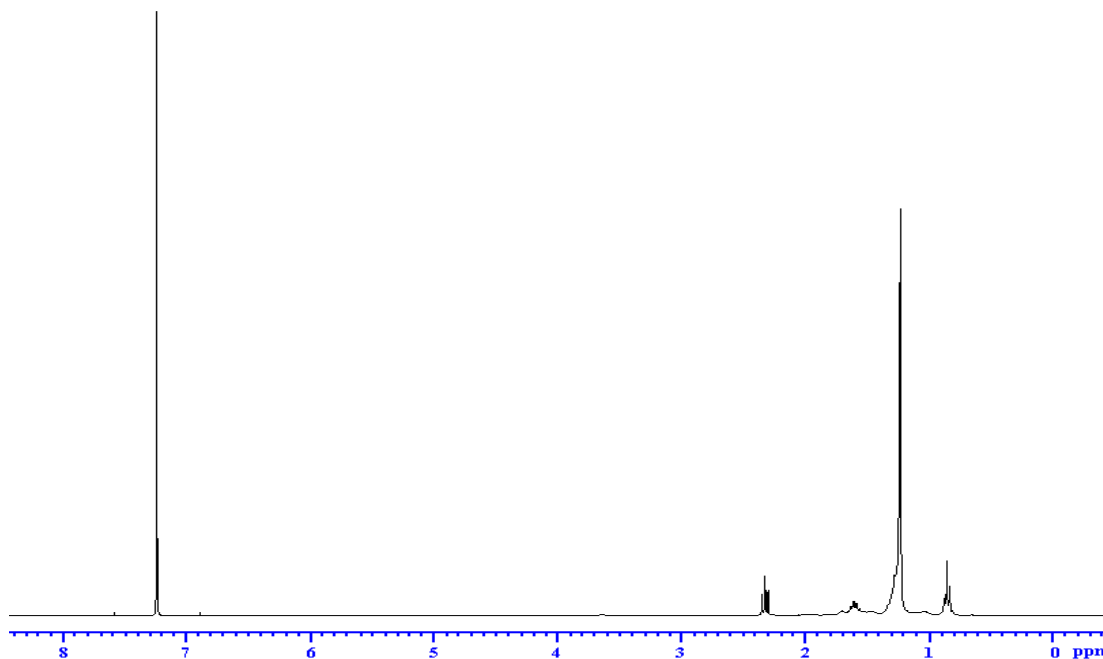


Figura 54. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción EM<sub>7</sub>.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 56) de este compuesto, evidenció señales indicativas de un C<sub>18</sub>. Entre todas las señales observadas, se puede resaltar la correspondiente a  $\delta_c$  179,20 ppm, la cual se encuentra a campo bajo, debido al desapantallamiento del átomo de carbono, ya que se encuentra unido a un átomo de oxígeno de un grupo carboxílico; además, a campo alto en la zona alifática, se encuentra una señal a  $\delta_c$  40,19 ppm, propia de un átomo de carbono enlazado a un carbono

oxigenado. A un desplazamiento químico entre  $\delta_C$  28,81 - 29,95 ppm, aparecen varias señales correspondientes a carbonos metilénicos y a  $\delta_C$  14,13 ppm, está presente un carbono metílico ( $\text{CH}_3\text{-R}$ ) (Figura 57). Mediante el experimento DEPT- 135° (Figura 58), se pudieron establecer los diferentes tipos de carbonos presentes en la estructura, resultando la existencia de un carbono metílico ( $\text{C}_{18}$ ) y un átomo de carbono cuaternario correspondiente al del grupo carboxilo ( $\text{C}_1$ ).

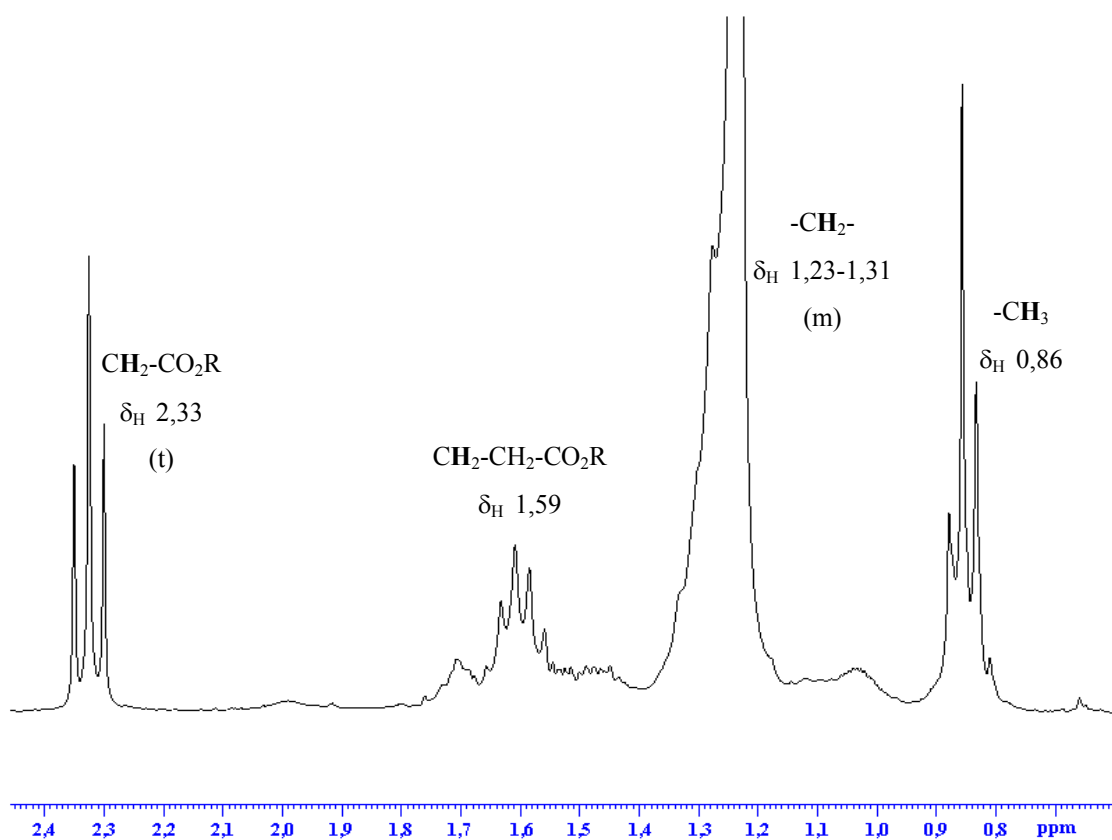


Figura 55. Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  de la fracción  $\text{EM}_7$ , ampliado en la zona a campo alto.

Según el análisis combinado de los espectros  $\text{RMN-}^1\text{H}$ ,  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  y DEPT 135°, concretamente, debido a los desplazamientos químicos y las multiplicidades en el caso de  $\text{RMN } ^1\text{H}$ , se pudo determinar que el compuesto que conforma la fracción  $\text{EM}_7$ , es el ácido octadecanoico (ver Figura 59), el cual ya fue identificado por CG-EM en la fracción D, perteneciente al extracto soluble en cloroformo, junto con otros metabolitos;

sin embargo, se logró aislar en el extracto metanólico y caracterizar estructuralmente. Este hecho evidencia nuevamente la abundancia de los ácidos grasos en las algas rojas.

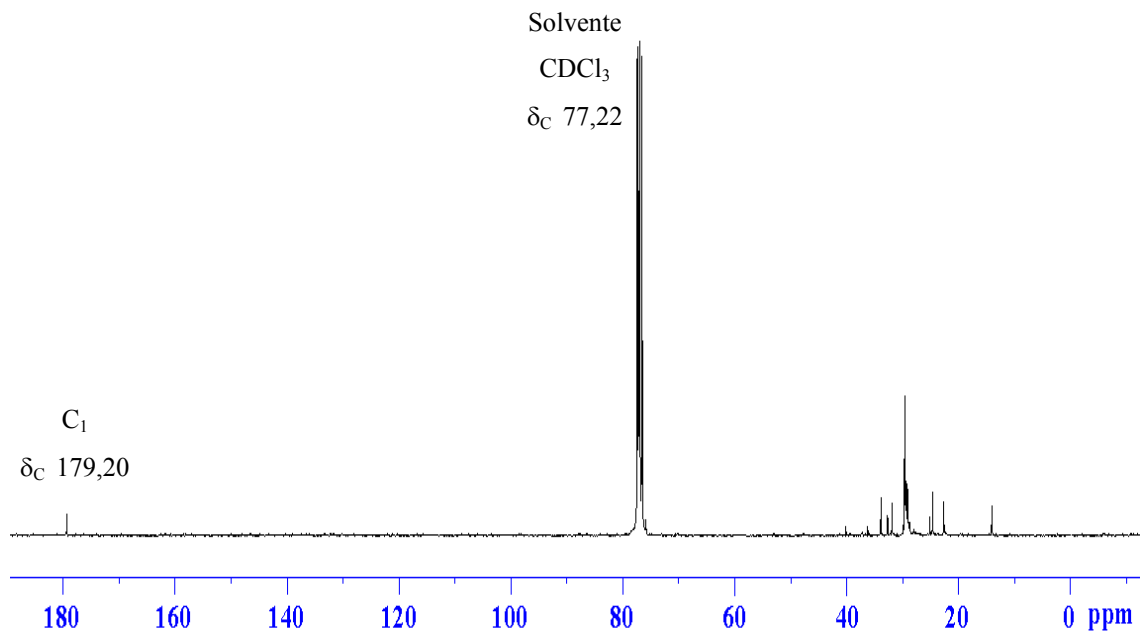


Figura 56. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la fracción EM<sub>7</sub>.

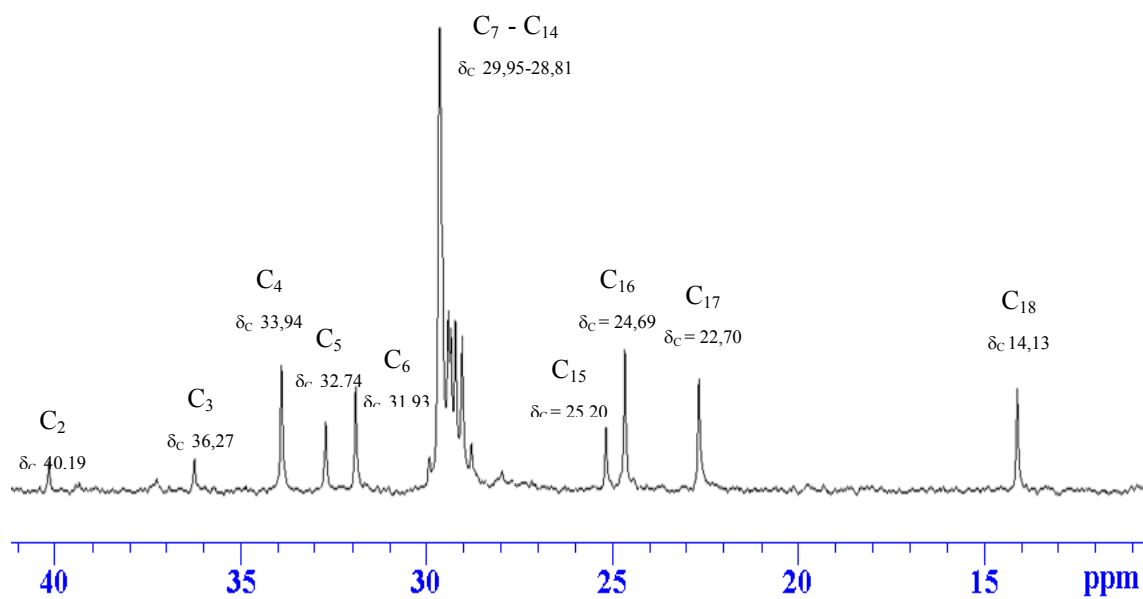


Figura 57. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la fracción EM<sub>7</sub>, ampliado a campo alto.

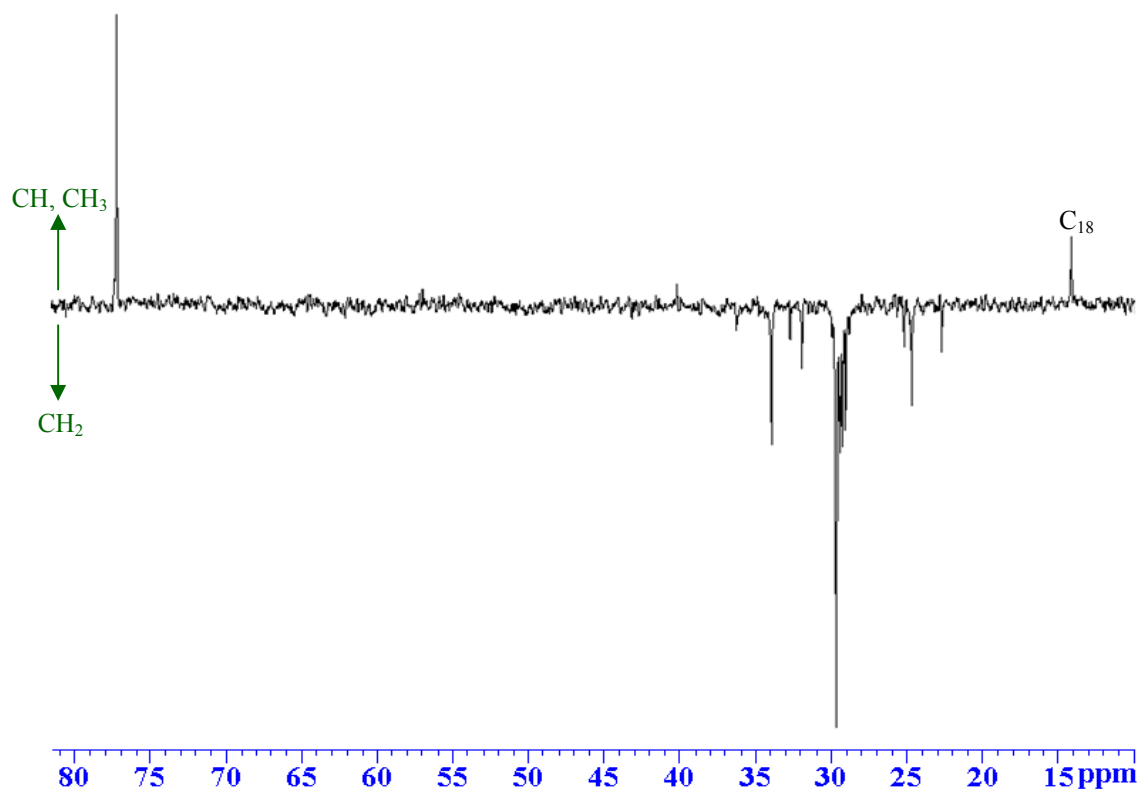


Figura 58. Espectro DEPT- 135° de la fracción EM<sub>7</sub>.

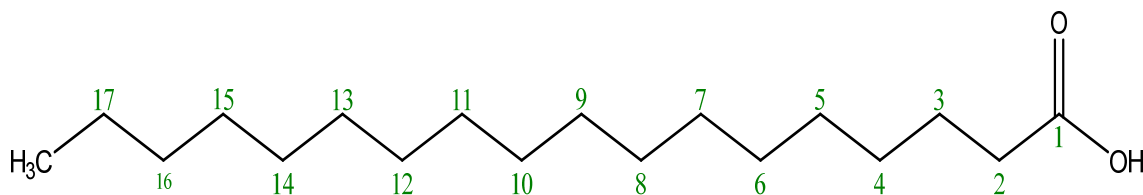


Figura 59. Estructura del compuesto (ácido octadecanoico) de la fracción EM<sub>7</sub>.

## CONCLUSIONES

Todos los extractos ensayados del alga *K. alvarezii*, evidenciaron la presencia de esteroides insaturados, mientras que EEP y EM dieron positiva la prueba para alcaloides, EC y EAE mostraron la posible presencia de triterpenos pentacíclicos.

El EEP y EM mostraron una letalidad muy significativa contra *L. vannamei*; sin embargo, EAE presentó el menor CL<sub>50</sub> en el bioensayo de *A. salina*, considerándose así el extracto más letal.

*K. alvarezii*, perteneciente a la familia Solieraceae mostró un efecto antimitótico durante el desarrollo embrionario del erizo de mar *E. lucunter*.

El extracto soluble en acetato de etilo, se particionó cromatográficamente obteniéndose la fracción A<sub>2</sub>, en la que se identificaron mediante CG-EM, el dibutil ftalato, ácido 2-fenilacético, 1-(1-propoxietoxi)propano, el 2,6-di-ter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona, la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, ácido hexadecanoico y el compuesto esteroideal colestano.

De acuerdo a los análisis de RMN en una y dos dimensiones, la fracción EM<sub>7</sub>, se corresponde con el ácido octadecanoico.

Mediante los análisis de RMN se pudo identificar al compuesto 1-fenilbutan-1-ol de la fracción G, la cual presentó una concentración letal media significativa, frente *Artemia salina* de 173, 43 µg/mL a 48h.

La subfracción C<sub>2,3</sub>, correspondiente al extracto soluble en cloroformo de *K. Alvarezii*, evidenció la presencia del 5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona y el estigmasterol.

El análisis combinado de los espectros de RMN del compuesto FH<sub>4</sub> y los datos teóricos obtenidos del programa RMN Predictor, confirmó la estructura probable del éster alifático (nonanoato de hexilo).

Los distintos metabolitos identificados posiblemente sean los responsables de la bioactividad *in vitro* observada, en los diferentes organismos ensayados.

Todos los componentes químicos identificados en los extractos del alga, constituyen el primer reporte de los mismos para *K. alvarezii*, tanto en Venezuela como en otras latitudes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Gemma, E. 1998. Estudios sobre la síntesis del diterpeno de origen marino helioparina B. Trabajo de Postgrado. Universidad Complutense de Madrid.
2. Riguera, R. 1997. Isolating bioactive compounds from marine organism. *Journal of Marine Biotechnology*, 5: 187-19.
3. Blunt, J.; Copp, B.; Munro, M.; Northcote, P. y Prinsep, M. 2006. Marine natural products. *Journal of Natural Products Report*, 23: 26-78.
4. Schmitz, F.; Bowden, J. y Tohl, B. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms in Marine Biotechnology. *Pharmaceutical and bioactive natural products*, 1: 197-308.
5. DiLorenzo, A.; Lustigman, B.; Correa, M. y Aglione, A. 1993. Effects of algae extracts from New York/New Jersey Coastline, USA on Cultured Mammalian Cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3): 367-373.
6. Puglisi, M.; Tan, L.; Jensen, P. y Fenical, W. 2004. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thallasiae*. *Tetrahedron*, 60: 7035-7039.
7. Barros, M.; Pinto, E.; Sigaud-Kutner T.; Cardozo, K. y Colepicolo, P. 2005. Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. *Biological rhythm research*, 36: 67-82.
8. Lenis, L.; Benítez, R.; Peña, E.; Trujillo, D. 2007. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia Et Technica*, 13: 97-102.
9. Valdés, O.; Díaz, N.; Cabranes, Y.; Acevedo, M.; Areces, A.; Graña, L. y Díaz, C. 2003. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*, 16: 36-45.
10. Bhakuni, D. y Silva, M. 1974. Biodynamic substances from marine flora. *Botanica Marina*, 27: 40-51.
11. Carvalho, L. y Roque, N. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Quimica Nova*, 23(6): 757-763.
12. Vlachos, V.; Critchley, A. y Holy, A. 1997. Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine algae. *South African Journal of Science*, 93: 328-332.



13. Fenical, W. 1975. Halogenation in the Rhodophyta: a review. *Journal of Phycology*, 11: 245-259.
14. Chapman, V. y Chapman, D. 1980. *Seaweed and Their Uses*. Chapman y Hall eds. Pág. 327.
15. Ruperez, P. y Saura, F. 2001. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweed. *European Journal of Food Research and Technology*, 212: 349-354.
16. Galland, I. y Fleurence, J. 1999. Nutritional value of protein from edible seaweed *Plamaria palmata*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 353-359.
17. Tringali, C. 1997. Bioactive metabolites from marine algae: recent results. *Current Organic Chemistry*, 1: 375-394.
18. Burja, A.; Banaigs, B.; Mansour, E.; Burguess, J. y Wright, P. 2001. Marine cyanobacteria a prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57: 9347-9377.
19. Mayer, A. y Hamann, M. 2004. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Journal of Marine Biotechnology*, 6: 37-52.
20. Mayer, A. y Hamann, M. 2005. Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 140: 265-286.
21. Singh, S.; Kate, B. y Banerjee, U. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 73-95.
22. Faulkner, D. 2002. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Natural Products Reports*, 19: 1-48.
23. Stein, J. y Borden, C. 1984. Causative and beneficial algae in human disease conditions: a review. *Phycologia*, 23: 485-501
24. Hay, M. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 103-134.

25. Carlucci, M.; Scolaro, L. y Damonte, E. 1999. Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes Simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. *Chemotherapy*, 45: 429-436.
26. Freile, Y. 2001. Algas en la "Botica". *Avance y Perspectiva*, 20: 283-293.
27. González, F. y Silva, M. 2001. Biodiversidad química de macroalgas marinas. En: *Sustentabilidad de la biodiversidad un problema actual*. Alveal, K. y Antezana T. (eds). Primera edición. Universidad de Concepción de Chile. Pág. 496.
28. Ríos, N.; Medina, G.; Jiménez, J.; Yáñez, C.; García, M.; Di Bernardo, M. y Gualtieri, M. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Revista Peruana de Biología*, 16 (1): 097-100.
29. Cordero, J. 2003. Actividad antimicrobiana, biotóxica y análisis químico de extractos de las algas rojas *Bryocladia thyrsgera* (Ceramiliales: Rhodomelaceae) e *Hydropuntia pauciramosa* (Gracilariales: Gracilariaceae) procedentes de "El Rincón de Araya", estado Sucre, Venezuela. Trabajo de Postgrado. Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. Pág. 56.
30. Charzeddine, L. 2004. *Aislamiento, caracterización parcial y actividad biológica de una lectina presente en el alga marina Halimeda opuntia (Linneaus) Lamouroux (Chlorophyta)*. Trab. Grad. M. Sc. Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 118 pp.
31. 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. Dr. Ciencias, Zoología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 133 pág.
32. Brito, L. y Crescente, O. 2009. Actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del Oriente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 48(1): 29-33.
33. Charzeddine, L. y Fariñas, M. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del Nororiente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 40(1-2): 49-54.
34. Dorta, E.; Darias, J.; San Martín, A. y Cueto, M. 2002. New prenylated bromoquinols from the green alga *Cymopolia barbata*. *Journal of Natural Products*, 65: 329-333.
35. TB, Ng.; Huang, B.; Fong, W. y Yeung, H. 1997. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences*, 61(10): 933-49.

36. Mazumder, S.; Ghosal, P.; Pujol, C.; Carlucci, M.; Damonte, E. y Ray, B. 2002. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1-3): 87-95.
37. Wiemer, D.; Idler, D. y Fenical, W. 1991. Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. *Experientia*, 47(8): 851-3.
38. Lim, S.; Cheung, P.; Ooi, V. y Ang, P. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13): 3862.
39. Martínez, I.; Periago, M. y Ros, G. 2000. Nutritional importance of phenolic compounds in the diet. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1): 5-18.
40. Langley, S. 2000. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(3): 181-188.
41. Tseng, C. 1987. Some remarks on the kelp cultivation industry in China. En: *Seaweed cultivation for renewable resources*. Bird, K. y Benson, P. (eds). Amsterdam: Elsevier Science Publishers. Págs. 148-158.
42. Noguchi, T.; Matsui, T.; Miyazawa, K.; Asakawa, M.; Iijima, N.; Shida, Y.; Fuse, M.; Hosaka, Y.; Kirigaya, C. y Watabe, K. 1994. Poisoning by the red alga 'ogonori' (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima Coast, Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan. *Toxicon*, 32(12): 1533-1538.
43. Nagai, H.; Yasumoto, T. y Hokama, Y. 1997. Manauealides, some of the causative agents of a red algae *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii. *Journal of Natural Products*, 37: 753-761.
44. Tseng, C. 1994. Utilization of seaweeds. *The Scientific Monthly*, 59(1): 37-46.
45. Russell, D. 1983. Ecology of the imported red seaweed *Eucheuma striatum* Schmitz on Coconut Island, Oahu, Hawaii. *Pacific Scientific*, 37: 87-107.
46. Ojasti, J. 2001. *Estudio sobre el estado actual de las especies exóticas*. Obra suministrada por la Secretaría General de la Comunidad Andina. Pág. 130.
47. Barrios, J. 1999. La introducción de *Eucheuma denticulatum* y *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) en Venezuela: una revisión crítica. *FONTUS*, 4: 135-153.

48. Barg, U. 1995. *Orientaciones para la promoción de la ordenación del desarrollo de la acuicultura costera*. FAO, Documento Técnico, 328: 1-138.
49. Barrios, J. 2007. Blanqueamiento de arrecifes coralinos por la invasión de *K. alvarezii* (rhodophyta) en isla Cubagua, estado Nueva Esparta, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 46 (2): 147-152.
50. Estevez, J.; Ciancia, M. y Cerezo, A. 2000. The system of low molecular weight carrageenan and agaroids from the room temperature extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Research*, 325: 287-299.
51. International migration review. IMR International. 1999. Carrageenan Profile. *Hydrocolloid Review*, 2: 15-62.
52. Dawes, C.; Luisma A. y Trono G. 1994. Laboratory and field growth of commercial strains of *Euचेuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines. *Journal of applied phycology*, 6(1): 21-24.
53. Rincones, R. y Rubio, J. 1999. Introduction and comercial cultivation of the red alga *Euचेuma* in Venezuela for the production of phycocolloids. *World Acuaculture*, 30: 57-61.
54. Barrios, J. 2005. Dispersión del alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) en la región nororiental de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 44: 29-34.
55. Rodgers, S. 1997. Oahu's invasive algae. *Aliens*, 6: 10.
56. Suresh, K.; Ganesan, K. y Subba, R. 2007. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – an edible seaweed. *Food Chemistry*, 107: 289-295.
57. Pereira, L.; Amado, A.; Critchley, A.; Velde, F. y Ribeiro, P. 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*, 23: 1903-1909.
58. Brito, L. y Crescente, O. 2009. Actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del oriente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 48(1): 29-33.
59. Brito L. 2009. Actividad biológica, identificación y caracterización de compuestos obtenidos de las algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Gracilariaceae), *Gelidium serrulatum* (Gelidiales, Gelidiaceae) y *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Solieriaceae) del Oriente de Venezuela. Tesis Doctoral. Universidad de

Oriente, Núcleo de Sucre, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Postgrado en ciencias marinas.

60. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. UCV. Litopar.
61. Domínguez, X. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México.
62. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putman, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D. y McLaughling, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(1): 31-34.
63. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC<sub>50</sub>. En: *American Society for Testing and Material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation*. Mayer, F. y Hamelink J. (eds). Philadelphia, Pennsylvania. Pág. 65.
64. Scheuer, P. 1995. Marine Natural Products research: A look into the div Bag. *Journal of Natural Products*, 58 (3): 335-343.
65. Mohamed, F.; Namitha, K.; Chidambara, M.; Mahadeva, S.; Sarada, S.; Subbarao, P. y Ravishankar, G. 2005. Chemical composition, Iron bioavailability and antioxidant activity of kappaphycus alvarezii(Doty). *J. Agric. Food Chemi.*, 53: 792-797.
66. McCormick, J.; McKee, T.; Cardellina, J.; Leid, M. & Boyd, M. 1996. Cytotoxic triterpenes from a marine sponge, *Stelletta sp.* *J. Nat. Prod.*, 59: 1047-1050.
67. Martínez, A. 2002. Esteroles. Universidad de antioquia Facultad de Química Farmacéutica.
68. Tasende, M. 2000. Fatty acid and sterol composition of gametophytes and saprophytes of Chondrus Crispus. *Scientia Marina* 64(4): 421-426.
69. Bruneton, J.1993. *Farmacognosia*. Fitoquímica. Plantas Medicinales. Segunda Edición. Editorial Acribia, S.A. España. Pág. 263.
70. McLaughlin, J. ; Lingling, L. y Anderson, J. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information J.*, 32:513-524.
71. Fatope, M. 1995. Phytocompounds: Their bioassay and diversity. *Discov Innov.*, 7(3):229-235.
72. Fatope, M.; Ibrahim, H. y Takeda, Y.1993. Screening of higher plants reputed as pesticides using Brine shrimp Lethality Assay. *Int J Pharmacog.*, 4:250-254.

73. Ojala, T.; Vuorela, P.; Kiviranta, J.; Vuorela, H. y Hiltunen, R. 1999 .A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumar ins. *Planta Med.*, 65: 715-718.
74. Amaro, M.; Monasterios, M.; Avendaño, M.; Charris, J. 2009. Prelimiar evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivates in two cell lines and artemia salina. *J Appl Toxicol*, 29 (1): 36-41.
75. Pérez, F.y Kensley, I. 1997. *Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world*. Editions du Muséum, París. Pág. 233.
76. Alcaraz, G.; Chiapa, X.; Espinosa, V. y Vanegas, C. 1999. Acute toxicity of ammonia and nitrite to white shrimp *Penaeus setiferus* postlarvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 90-97.
77. Alcaraz, G.; Espinosa, V. y Vanegas, C. 1999. Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* postlarvae under different oxygen levels. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 98-106.
78. Alcaraz, G., V. Espinoza, X. Chiapa y C. Vanegas. 1997. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* exposed to ammonia and nitrite. *Aquatic Toxicology* 39: 345-353.
79. Frias, E.; Voltolina, M. y Osuna, L. 2001. Acute toxicity of cadmium, mercury, and lead to whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67: 580-586.
80. Schmidt, R. 1985. Optical motility test for the detection of Trichothecenes using Brine shrimp. *Mycotoxin Res*, 1:25-29
81. Betancourt, L.; Baird, M.; Sangha, R. y González, F. 2006. Induction of morphological deformities and moulting alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles exposed to the triazole-derivative fungicide Tilt. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51: 69-78.
82. Stora, G. 1974. Computation of letal concentrations. *Mar. Biol. Bull.* 5 (5): 69-71.
83. Nishioka, D.; Marcell, V.; Cunningham, M.; Khan, M.; Von Hoff, D. y Izbicka, E. 2003. The use of early sea urchin embryos in anticancer drug testing. *Methods Mol. Med*, 85:265-276.
84. Días, P.; Siqueira, J.; Vendruscolo, L.; Neiva, T.; Gagliardi, A.; Maraschin, M. y Ribeiro, R. 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 56: 436-446.

85. Kwon, M. y Nam, T. 2007. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell Biol. Int.*, 31: 768-775.
86. Ellouali, M.; Boisson, C.; Durand, P. y Jozefonvicz, J. 1993. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Anticancer Res*, 13: 2011-2019.
87. Riou, D. ; Collic, S. ; Pinczon, D. ; Bosch, S. ; Siavoshian, S. ; De Bert, V. ; Tomasoni, C. ; Sinquin, C. ; Durand, P. y Roussakis, C. 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer Res*, 16: 1213-1218.
88. Sheu, J.; Huang, S. ; Wang, G. y Duh, C. 1997. Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. *J. Nat. Prod.*, 60: 900-903.
89. Huang, H.; Wu, S.; Liao, H.; Jiang, C.; Huang, R.; Chen, Y.; Yang, Y. y Chen, Y. 2005. Induction of apoptosis by three marine algae through generation of reactive oxygen species in human leukemic cell lines. *J Agric. Food Chem*, 53: 1776-1781.
90. Aceves, C. Anguiano, B. y Delgado, G. 2005. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 10: 189-196.
91. Mendiola, J. 2008. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis doctoral. Química-Física aplicada.
92. Yao, S.; Johannsen, M.; Hazell, R. y Jorgensen, K. 1983. Pherobase listing for dihidroactinidiolide. *J. Org. Chem.*, 63: 118-121.
93. Noguera, T. 2007. Aislamiento, elucidación estructural y posible bioactividad de algunos de los metabolitos secundarios de la planta *Ludwidia octovalvis* (Onagraceae). Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.
94. Rao, P.; Srinivasa P. y Karmakar S. 1991. Chemical investigations of Indian Phaeophyceae. Total sterol content from different species of Sargassum. *Seaweed Research*, 14: 15-19.

## **APÉNDICES**



## APÉNDICE A

Resultados del ensayo de bioactividad tóxica frente al crustáceo artemia salina de las fracciones obtenidas del extracto soluble en éter de petróleo.

Tabla A1. Actividad biotóxica de algunas fracciones del extracto soluble en éter de petróleo de *K. alvarezii* contra *Artemia salina*.



Crustáceo	Extracto	CL <sub>50</sub> (µg·ml <sup>-1</sup> )		Intervalo de confianza 95%
		24 horas	48 horas	
A. 	X	872,23	637,24	100-1000
	EP <sub>3</sub>	945,47	886,20	100-1000
	Y	930,84	784,62	100-1000
	EP <sub>6</sub>	915,97	816,30	100-1000
	EP <sub>8</sub>	955,72	858,20	100-1000
	Z	874,52	753,63	100-1000

Tabla A2. Actividad biotóxica de algunas fracciones del extracto soluble en cloroformo de *K. alvarezii* contra *Artemia salina*.

Crustáceo	Extracto	CL <sub>50</sub> (µg·ml <sup>-1</sup> )		Intervalo de confianza 95%
		24 horas	48horas	
A. 	D	24,91	4,38	1-100
	E	827,92	754,30	100-1000
	F	910,64	840,37	100-1000
	G	559,48	173,43	10-1000
	H	423,82	261,70	100-1000
	I	862,87	764,59	100-1000
	J	681,29	316,23	100-1000

## APÉNDICE B

Espectro de RMN bidimensionales y su correlación entre los núcleos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la subfracción FH<sub>4</sub>.

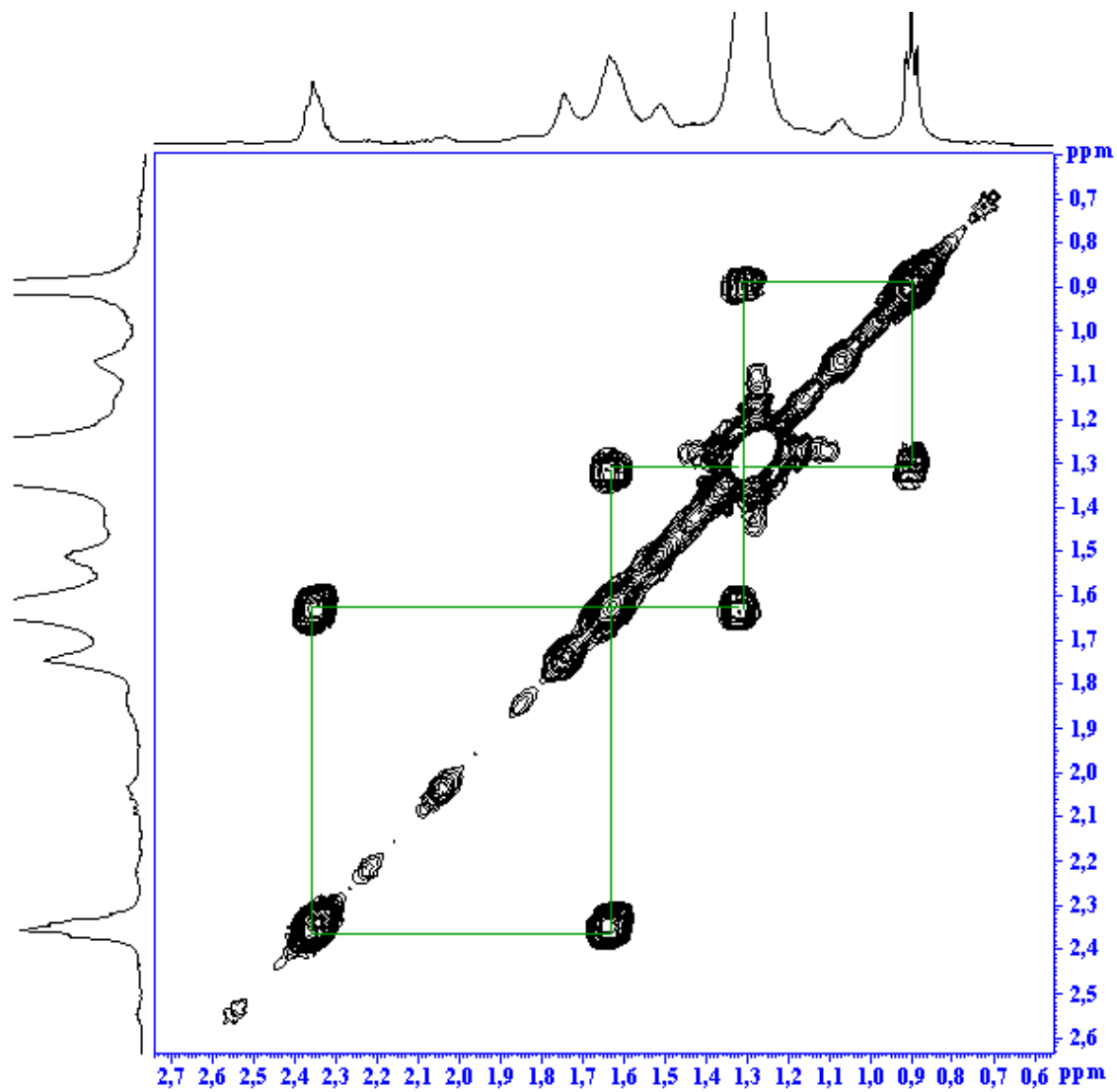


Figura B1. Espectro COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la subfracción H<sub>4</sub>, ampliada en la región de las señales.

HMQC

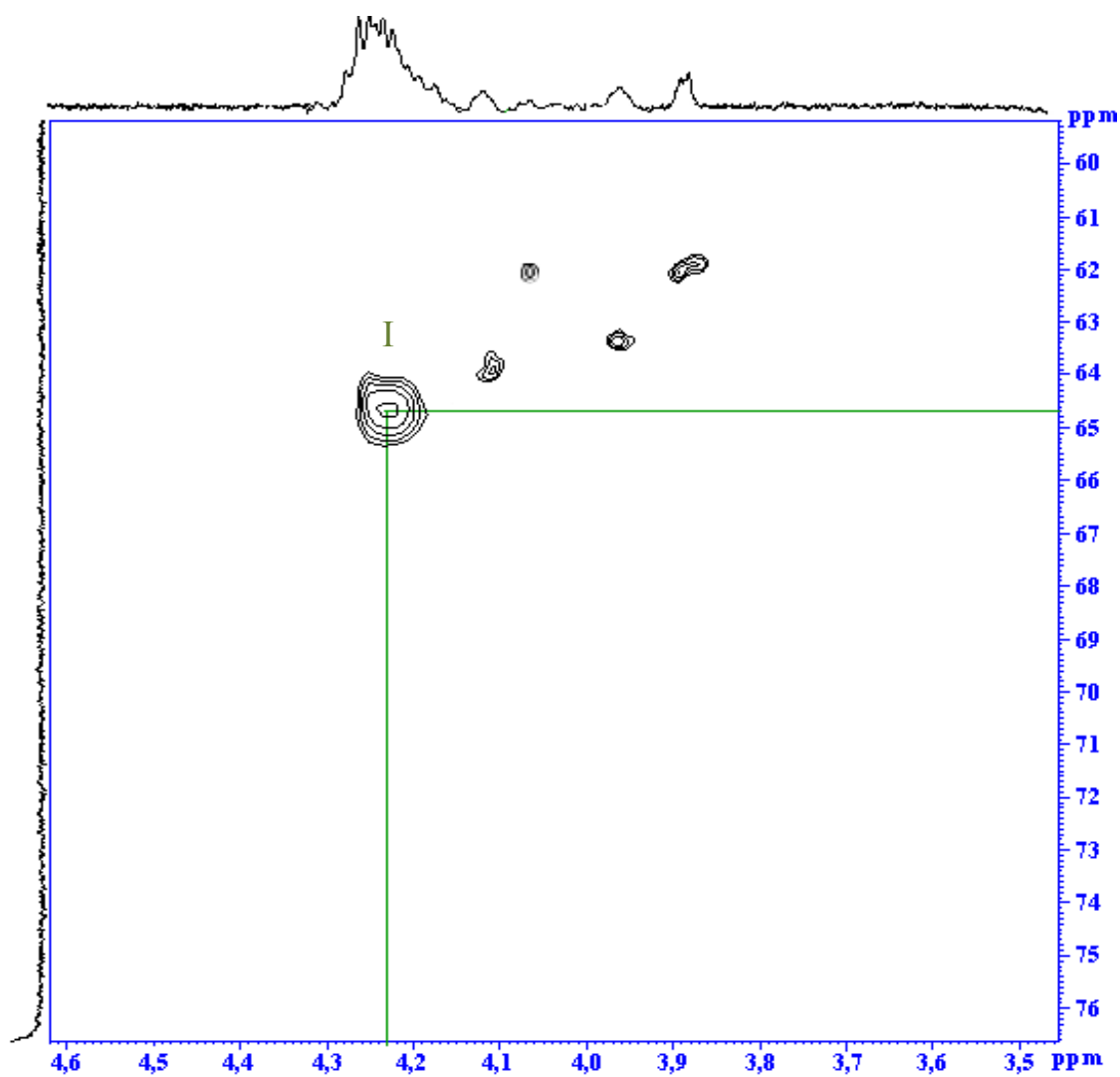


Figura B2. Espectro HMQC de la subfracción  $\text{H}_4$ , ampliada en la región de la señal de  $\text{C}_{10}$ .

Interacciones:

I:  $\text{C}_{10} \longrightarrow \text{H}_{10}$

HMQC

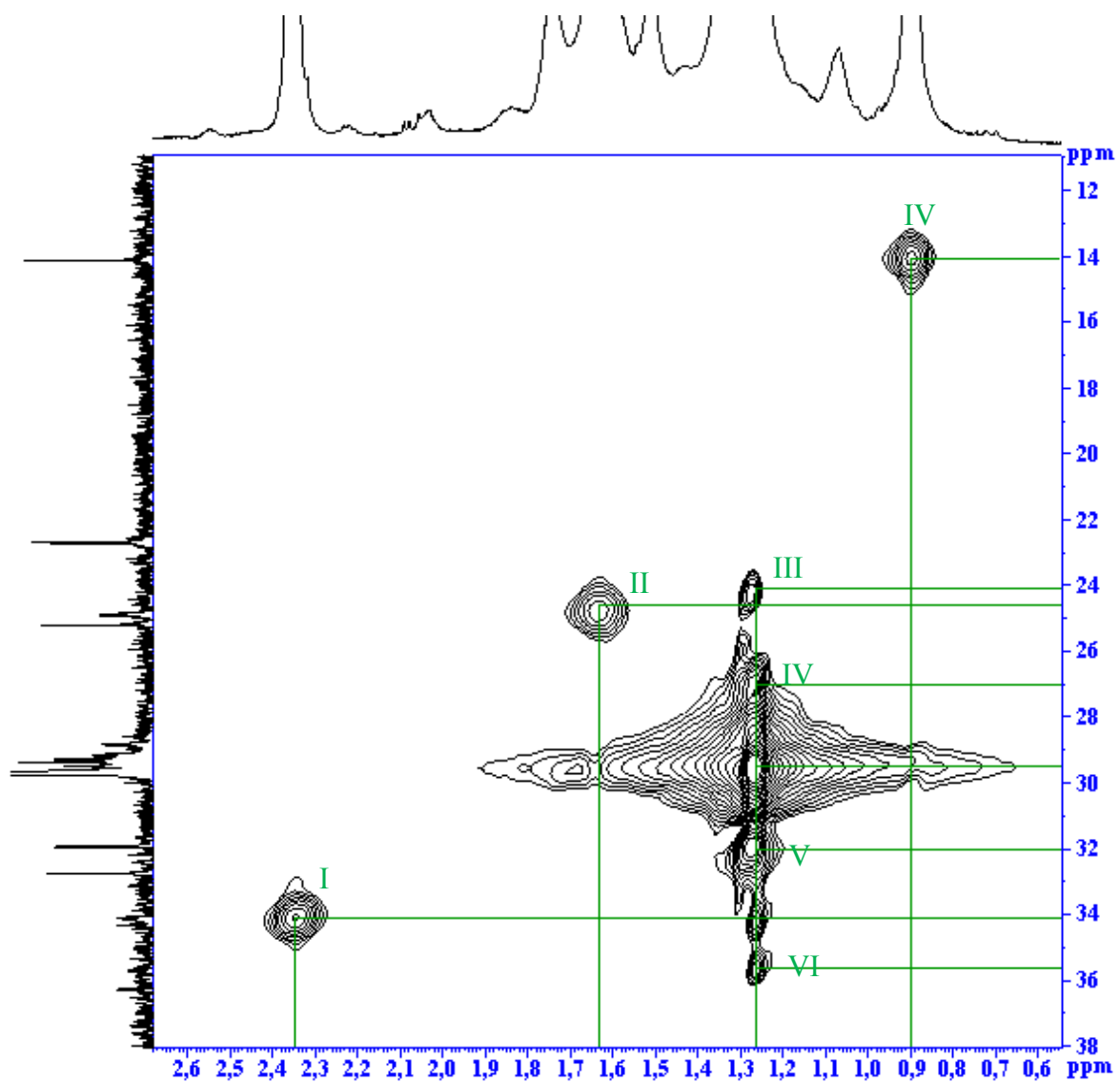


Figura B3. Espectro HMQC de la subfracción H<sub>4</sub>, ampliada en la región de las señales a campo alto.

Interacciones:

I: C<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>

II: C<sub>11</sub> → H<sub>11</sub>

III: C<sub>3</sub> → H<sub>3</sub>

IV: C<sub>8</sub>-C<sub>14</sub> → H<sub>6</sub>-H<sub>8</sub> y H<sub>11</sub>-H<sub>14</sub>

V: C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> y C<sub>11</sub>-C<sub>13</sub> → H<sub>5</sub>-H<sub>7</sub> y H<sub>10</sub>-H<sub>14</sub>

VI: C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> → H<sub>5</sub>-H<sub>8</sub> y H<sub>10</sub>-H<sub>14</sub>

HMBC

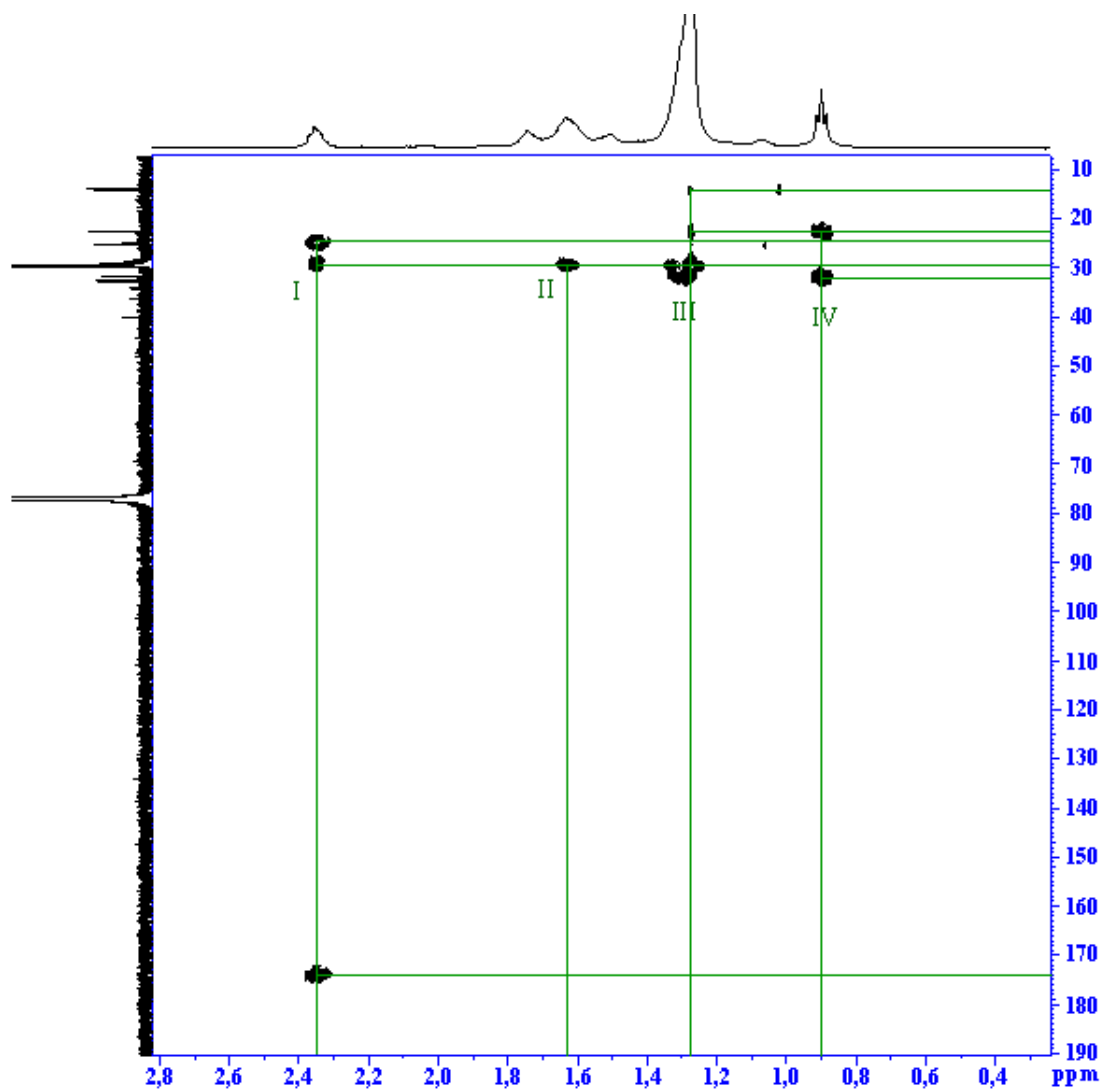


Figura B4. Espectro HMBC de la subfracción H<sub>4</sub>, ampliada en la región de las señales a campo alto.

Interacciones:

I: C<sub>3</sub> → H<sub>2</sub>

II: C<sub>13</sub>-C<sub>6</sub> → H<sub>11</sub>, H<sub>3</sub>

III: C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> y C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub> → H<sub>5</sub>-H<sub>7</sub> y H<sub>10</sub>-H<sub>14</sub>

IV: C<sub>7</sub>, C<sub>13</sub> → H<sub>9</sub>-H<sub>15</sub>

## **HOJAS DE METADATOS**

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

<b>Título</b>	EVALUACIÓN QUÍMICA, POSIBLE LETALIDAD Y CITOTOXICIDAD DEL ALGA INVASORA <i>Kappaphycus alvarezii</i>
<b>Subtítulo</b>	

## Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Neyra Jurado, Marylín Estefanía	CVLAC
e-mail		neyrajurado@gmail.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

## Palabras o frases claves:

Alga invasora
Citotoxicidad
<i>Kappaphycus alvarezii</i>

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química

### Resumen (abstract):

A los extractos crudos en éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y metanol del alga *Kappaphycus alvarezii* (recolectada en la Isla de Cubagua), se les realizó un estudio químico y de bioactividad. Todos los extractos ensayados evidenciaron presencia de esteroides insaturados; sin embargo, los extractos crudos en éter de petróleo y metanol, mostraron la presencia de alcaloides; a diferencia del extracto crudo en cloroformo y en acetato de etilo, los cuales dieron positiva la prueba para triterpenos pentacíclicos. Los valores de  $CL_{50}$  de todos los extractos obtenidos en este bioensayo mostraron toxicidad ante los crustáceos *Artemia salina* y *Litopenaeus vannamei*. Mediante cromatografías en columna y capa fina preparativa, se fraccionaron continuamente los extractos en cloroformo y en acetato de etilo, analizándose algunas subfracciones obtenidas mediante CG-EM e identificándose algunos de sus constituyentes por sus patrones de fragmentación y comparación de sus espectros de masas con los existentes en la base de datos. Encontrándose que la fracción  $A_2$  proveniente del extracto en acetato de etilo presentó como componentes mayoritarios al ácido hexadecanoico, dibutilftalato y el compuesto esteroideal colestano; además de 2,6-diterbutilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona; 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; ácido 2- fenilacético y 1-(1-propoxi) propano. Mientras que la fracción FD del extracto en cloroformo exhibió a los ácidos grasos saturados palmítico, esteárico y mirístico, como componentes abundantes; y en menor proporción a la 3-etil-4-metil-1*H*-pirrol-2,5-diona. En la fracción  $EM_7$  proveniente del fraccionamiento del extracto metanólico, se logró identificar al ácido octadecanoico a través de RMN uni y bidimensional y en la fracción FG del extracto en cloroformo, se caracterizó al 1-fenilbutan-1-ol, mediante esta misma técnica.



## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
D' Armas, Haydelba	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input checked="" type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail	htrinidad86@hotmail.com			
	e-mail				
Segnini Mary Isabel	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail	msegnini@gmail.com			
	e-mail				
	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				
	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC				
	e-mail				
	e-mail				

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	02	14

Lenguaje: spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

### Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-Neyra	Aplication /word

### Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

### Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciada en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Química

### Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE, NÚCLEO DE SUCRE

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

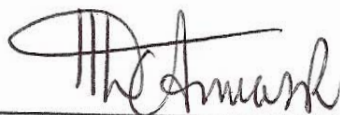
# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

## Derechos:

Yo, Marylín Neyra autorizo a la Universidad de Oriente para que publique la siguiente tesis en su totalidad para fines educativos.



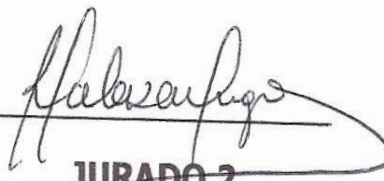
**AUTOR 1**



**TUTOR**



**JURADO 1**



**JURADO 2**

**POR LA COMISIÓN DE TESIS:**

