



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

EVALUACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS Y LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DEL ALGA INVASORA *Caulerpa racemosa*
(Modalidad: Tesis de Grado)

LAURENIS DEL VALLE MARTÍNEZ SÁNCHEZ

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

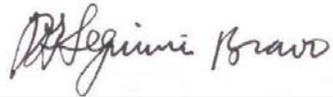
CUMANÁ, 2012

EVALUACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS Y LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DEL ALGA INVASORA *Caulerpa racemosa*

APROBADO POR:



Haydelba D' Armas, Ph.D.
Asesora



Dra. Mary Isabel Segnini
Co-Asesora



Ysabel Campos Santaella, Ph.D
Jurado principal



Dr. Willian C. Henriquez G.
Jurado principal

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	14
RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	14
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	15
PRUEBAS QUÍMICAS	16
Taninos.....	17
Polifenoles.....	17
Flavonoides.....	17
Glicósidos cianogénicos y cardiotónicos.....	17
Cumarinas	18
Antraquinonas	18
Metilencetonas	18
Alcaloides	18
Saponinas	19
Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos.....	19
Fenilpropanoides.....	19
FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS	20
Cromatografía de Columna (CC).....	20
Cromatografía de capa fina analítica (CCFA)	20
Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)	21
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	21
Espectroscopia de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN	22
Espectroscopia infrarroja	23
Espectrometría de masas.....	23
EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD	24
Actividad letal en <i>Artemia salina</i>	25
Citotoxicidad con huevos de erizo de mar (<i>Echinometra lucunter</i>)	26
Actividad antibacteriana	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
1. Rendimiento de los extractos crudos del alga <i>C. racemosa</i>	30
2. Análisis de los metabolitos secundarios presentes.....	31
3. Actividad biológica de los extractos del alga <i>C. racemosa</i>	36
3.1 Actividad tóxica de los extractos frente al crustáceo <i>Artemia salina</i>	37

3.2 Actividad antibacteriana de los extractos de <i>C. racemosa</i>	39
3.3 Citotoxicidad de los extractos de <i>C. racemosa</i> frente a los huevos del erizo de mar <i>Echinometra lucunter</i>	42
4. Fraccionamiento cromatográfico de los extractos.....	47
4.1 Aislamiento y análisis de los principales constituyentes químicos del extracto obtenido en éter de petróleo	47
4.2 Aislamiento y análisis de los principales constituyentes químicos del extracto obtenido en acetato de etilo.....	104
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
APÉNDICES.....	147
HOJA DE METADATOS	151

AGRADECIMIENTOS

Hoy se ha cumplido una de mis metas más anheladas, y se ha hecho realidad gracias al apoyo de muchas personas e instituciones, que con su pequeño grano de arena contribuyeron a la realización y culminación de este trabajo científico. Es por ello, que quiero expresarle mi más sincero agradecimiento a:

Dios todopoderoso por iluminar mi camino y darme la fortaleza, la confianza y la sabiduría para seguir adelante.

Haydelba D`Armas Ph.D., además ser mi asesora es un ejemplo de mujer a seguir, quiero agradecerle por haberme permitido formar parte de la familia del laboratorio de productos naturales y lípidos, nutrirme cada día de conocimientos, por brindarme su amistad, sus consejos y las herramientas necesarias para lograr la culminación de mi trabajo de pregrado.

Dra. Mary Isabel Segnini por compartir sus valiosos conocimientos y ser mi guía en la realización de una parte importante de este trabajo de investigación, gracias por su constante apoyo, orientación y colaboración.

Dra. Leonor Brito por estar siempre dispuesta a ayudarme y darme ese pequeño aporte que para mí fue muy valioso, especialmente en aquellas ocasiones que tenía dudas.

Dr. Jorge Barrios por su constante apoyo y colaboración.

La Universidad de Oriente por abrirme las puertas, y permitir mi formación profesional. Así como también, quiero agradecer al Departamento de Química, el cual tuvo la responsabilidad de mi formación profesional, y a todas aquellas personas que a pesar de las adversidades, siguen entregando todo por salir adelante y formando buenos profesionales en esta carrera.

A mis amigas, Fátima, Carmen y Maily, por brindarme su mano solidaria, y siempre estar conmigo en pie de lucha; con ellas compartí maravillosas experiencias que nunca olvidaré.

A mis amigos Alexys, Marilyn, Jean Paul, Niroski, Julinet, Lino, Jetsi, Raúl, Brimar, Miguel, Victoria y Adriana, por ser buenos compañeros y siempre estar

dispuestos a brindarme su apoyo.

Prof Noris Rodríguez del IUTC, por su eficiente colaboración en la realización de los análisis de IR.

Jose Gregorio Lanza M.Sc., perteneciente al Lab. de Química Ambiental de la USB, por su gran colaboración en los análisis de CG/EM. Igualmente, para el instituto IVIC por su colaboración en los análisis de RMN unidimensional.

A todos mil gracias, Dios le premie con muchas bendiciones.

DEDICATORIA

Éste gran logro nunca hubiese sido posible sin la ayuda de Dios todopoderoso. Él me ha acompañado durante todo el transitar de mi vida y ha estado siempre conmigo, dándome la fortaleza y las fuerzas para seguir adelante, a pesar de las adversidades.

A los seres más especiales de este mundo y quienes hicieron posible mi presencia en esta tierra, mis padres Mercedes Sánchez y Ángel Martínez, por su constante apoyo y por siempre darme esas palabras de aliento cuando veía que no era posible, ellos son el regalo más bello que me pudo haber dado Dios.

A mi abuela, Pastora Sánchez, por darme su amor, cariño y fortaleza para seguir adelante, sé que en donde te encuentres estás muy orgullosa de mí... te extraño. A mi abuelo, Felipe Sánchez, por sus constantes consejos y regaños, gracias por estar pendiente te quiero mucho abuelo.

A mis tíos y tías, en especial a mi tío Vidal Sánchez, por estar siempre conmigo, ayudándome, encaminándome y guiándome para poder encontrar mi verdadera vocación. Gracias tío te quiero mucho.

Al amor de mi vida, Frandys Noriega, tú llegaste a mí como un rayo de luz que iluminó mi vida y me has acompañado en mis momentos de tristeza y alegría. Eres un ser maravilloso y el tesoro más preciado que Dios me ha dado. A ti te dedico este logro porque estuviste allí conmigo día a día y fuiste testigo de mis triunfos y mis derrotas, dándome siempre las palabras de aliento cuando más la necesitaba. Gracias mi bello, Te Amo.

A mis hermanos Yudeici, José Angel, Wilfredo y Darwin, por estar allí siempre conmigo y ser para mí modelos de ejemplo y admiración. Los quiero y los adoro.

A mi amiga, Carmen Salazar, por estar en todo el transitar de la carrera conmigo, juntas pasamos muchos tropiezos y, por supuesto muchos logros. Ambas aprendimos que cuando la batalla es muy difícil hay que luchar siempre hasta el final. Aunque veíamos lejos este momento, con esfuerzo alcanzamos el mucho éxito. Te quiero mucho mi amiga.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas para la medición de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones.....	29
Tabla 2. Rendimiento porcentual de los extractos crudos del alga <i>C. racemosa</i>	31
Tabla 3. Grupos de metabolitos secundarios determinados en cada uno de los extractos crudos del alga <i>C. racemosa</i>	32
Tabla 4. Actividad antibacteriana mostrada por cada uno de los extractos.....	40
Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del EEP de <i>C. racemosa</i>	48
Tabla 6. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto en éter de petróleo.....	50
Tabla 7. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la fracción I, mediante CG/EM.....	52
Tabla 8. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la fracción II, mediante CG/EM.....	59
Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción IV del EEP de <i>C. racemosa</i>	67
Tabla 10. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción IV procedente del EEP.....	68
Tabla 11. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la subfracción IV ₃ , mediante CG/EM.....	69
Tabla 12. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción IV ₄ del EEP.....	73
Tabla 13. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción IV ₅ del EEP.....	74
Tabla 14. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ¹ H de la subfracción IV _{5.2}	77
Tabla 15. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ¹³ C de la subfracción IV _{5.2}	78
Tabla 16. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción IV ₆ del EEP.....	80
Tabla 17. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la subfracción IV ₆	81
Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción IV _{6.2}	82
Tabla 19. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción IV _{6.2}	82
Tabla 20. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción V del EEP de <i>C. racemosa</i>	86
Tabla 21. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción V procedente del EEP.....	87
Tabla 22. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción V ₃ del EEP.....	88
Tabla 23. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción V ₃ procedente del EEP.....	88

Tabla 24. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción V _{3.3} y V _{3.4} del EEP de <i>C. racemosa</i>	89
Tabla 25. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción V _{3.3} y V _{3.4}	89
Tabla 26. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción V ₄ del EEP.....	92
Tabla 27. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción V ₄ procedente del EEP.	92
Tabla 28. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la subfracción V ₅ , mediante CG/EM.....	95
Tabla 29. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción VI del EEP de <i>C. racemosa</i>	96
Tabla 30. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción VI procedente del EEP.....	97
Tabla 31. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción VI ₄ del EEP.	97
Tabla 32. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción VI ₄ procedente del EEP.....	98
Tabla 33. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción VI _{4.1} y VI _{4.2} del EEP de <i>C. racemosa</i>	99
Tabla 34. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción VI _{4.1} y VI _{4.2}	99
Tabla 35. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción VI _{4.1.3} del EEP.....	100
Tabla 36. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción VI _{4.1.4} del EEP.....	101
Tabla 37. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la subfracción VI _{4.1.5} , mediante CG/EM.	102
Tabla 38. Fraccionamiento cromatográfico del EAE de <i>C. racemosa</i>	105
Tabla 39. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto en acetato de etilo.....	106
Tabla 40. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la fracción A, mediante CG/EM.....	109
Tabla 41. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción C del EAE.	112
Tabla 42. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción C del EAE.....	112
Tabla 43. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ¹ H de la subfracción C ₂	114
Tabla 44. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ¹³ C de la subfracción C ₂	116
Tabla 45. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción D del EAE.....	119
Tabla 46. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción D del EAE.....	119
Tabla 47. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción D ₅ del EAE.....	120

Tabla 48. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de las señales observadas en el espectro de RMN ^1H de la subfracción $\text{D}_{5.1}$	123
Tabla 49. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C de la subfracción $\text{D}_{5.1}$	124
Tabla 50. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción E del EAE.	128
Tabla 51. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción E.....	128

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Algunos ejemplos de diterpenos aislados de algas marinas.	5
Figura 2. Estructura del difenil éter.....	6
Figura 3. Estructura del isorawsonol.....	7
Figura 4. Estructura de caulerpenina.....	8
Figura 5. Estructura de caulerpina I y sus análogos (II y III).	9
Figura 6. Estructura del caulersin.....	10
Figura 7. Estructura de caulerpales A y B.....	10
Figura 8. Ubicación geográfica del área de muestreo (Isla de Cubagua-estado Nueva Esparta, Venezuela).	14
Figura 9. <i>Caulerpa racemosa</i>	15
Figura 10. Esquema para la obtención de los extractos crudos de <i>C. racemosa</i>	16
Figura 11. Esquema del bioensayo de actividad letal aplicado a los extractos y fracciones.	25
Figura 12. Esquema de recolección de gametos de los erizos de mar <i>E. lucunter</i>	27
Figura 13. Esquema del bioensayo de citotoxicidad de los extractos o fracciones de <i>C. racemosa</i> frente a <i>E. lucunter</i>	28
Figura 14. Esquema del método de antibiograma para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones.	29
Figura 15. Desarrollo embrionario del erizo de mar <i>Echinometra lucunter</i> . Control del bioensayo de citotoxicidad.....	44
Figura 16. Efectos citotóxicos de los extractos EEP, EAE, EM (concentraciones desde 500 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de <i>C. racemosa</i> , en el desarrollo embrionario de <i>E.</i> <i>lucunter</i>	45
Figura 17. Esquema de fraccionamiento y análisis de los compuestos químicos del extracto obtenido en éter de petróleo del alga <i>C. racemosa</i>	49
Figura 18. Cromatograma de gases de la fracción I.....	52
Figura 19. Espectro de masas del 8-heptadeceno.....	53
Figura 20. Patrón de fragmentación propuesto para el 8-heptadeceno.	53
Figura 21. Espectro de masas del heptadecano.....	54
Figura 22. Patrón de fragmentación propuesto para el heptadecano.	54
Figura 23. Espectro de masas del Z-5-nonadeceno.....	55
Figura 24. Patrón de fragmentación propuesto para el Z-5-nonadeceno.	55
Figura 25. Espectro de masas del nonadecano.....	56
Figura 26. Patrón de fragmentación propuesto para el nonadecano.	56
Figura 27. Cromatograma de gases de la fracción II.	58
Figura 28. Espectro de masas del 6,10,14-trimetil-pentadecanona.....	60
Figura 29. Patrón de fragmentación propuesto para 6,10,14-trimetil- pentadecanona.....	60
Figura 30. Espectro de masas del ácido tetradecanoico.....	61
Figura 31. Patrón de fragmentación propuesto para ácido tetradecanoico.	62
Figura 32. Espectro de masas del éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2	

bencenodicarboxílico.....	63
Figura 33. Patrón de fragmentación propuesto para éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico.....	64
Figura 34. Espectro de masas del éster hexadecílico del ácido hexadecanoico.....	65
Figura 35. Patrón de fragmentación propuesto para el éster hexadecílico del ácido hexadecanoico.....	66
Figura 36. Cromatograma de gases de la subfracción IV ₃	69
Figura 37. Espectro de masas del ftalato de dibutilo.....	70
Figura 38. Patrón de fragmentación propuesto para el ftalato de dibutilo.....	70
Figura 39. Espectro de masas del 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido.....	71
Figura 40. Patrón de fragmentación propuesto para 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido.....	72
Figura 41. Espectro IR de la subfracción IV _{5.2} del EEP.....	75
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H de la subfracción IV _{5.2} . (300 MHz; CDCl ₃).....	76
Figura 43. Ampliaciones en diferentes regiones de las señales del espectro de RMN de ¹ H de la subfracción IV _{5.2}	76
Figura 44. Espectro de RMN de ¹³ C de la subfracción IV _{5.2} . (300 MHz; CDCl ₃).....	77
Figura 45. Espectro de RMN DEPT-135 de la subfracción IV _{5.2}	78
Figura 46. Comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y ¹³ C de la subfracción IV _{5.2}	79
Figura 47. Estructura del ácido heptadecanoico.....	79
Figura 48. Espectro IR de la subfracción IV _{6.2.1} del EEP.....	83
Figura 49. Cromatograma de gases de la subfracción IV _{6.2.1}	84
Figura 50. Espectro de masas del ácido n-hexadecanoico.....	84
Figura 51. Patrón de fragmentación propuesto para el ácido n-hexadecanoico.....	85
Figura 52. Espectro IR de la subfracción V _{3.3.1}	90
Figura 53. Cromatograma de gases de la subfracción V _{3.3.1}	91
Figura 54. Espectro IR de la subfracción V _{4.2}	93
Figura 55. Cromatograma de gases de la subfracción V _{4.2}	94
Figura 56. Cromatograma de gases de la subfracción V ₅	95
Figura 57. Cromatograma de gases de la subfracción VI _{4.1.5}	102
Figura 58. Espectro de masas del 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona.....	103
Figura 59. Patrón de fragmentación propuesto para 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona.....	103
Figura 60. Esquema de fraccionamiento y análisis de los compuestos químicos del extracto obtenido en acetato de etilo del alga <i>C. racemosa</i>	107
Figura 61. Cromatograma de gases de la fracción A.....	108
Figura 62. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico.....	109
Figura 63. Patrón de fragmentación propuesto para éster etílico del ácido hexadecanoico.....	110

Figura 64. Espectro de RMN de ^1H de la subfracción C_2 . (300MHz; CDCl_3).....	113
Figura 65. Ampliaciones en diferentes regiones del espectro de RMN ^1H de la subfracción C_2	114
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C de la subfracción C_2	115
Figura 67. Espectro RMN DEPT-135 de la subfracción C_2	116
Figura 68. Comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y ^{13}C de la subfracción C_2	117
Figura 69. Estructura del éster di-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico.....	118
Figura 70. Espectro de RMN de ^1H de la subfracción $\text{D}_{5.1}$. (300 MHz; CDCl_3).....	121
Figura 71. Ampliaciones de las regiones de las señales los protones del anillo aromático (Ar) del espectro de RMN ^1H de la subfracción $\text{D}_{5.1}$	122
Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C de la subfracción $\text{D}_{5.1}$	125
Figura 73. Espectro de RMN DEPT-135 de la subfracción $\text{D}_{5.1}$	125
Figura 74. Comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y ^{13}C de la subfracción $\text{D}_{5.1}$	126
Figura 75. Posible estructura propuesta para la subfracción $\text{D}_{5.1}$	126

LISTA DE ABREVIATURAS

1. CC Cromatografía de Columna
2. CCFA Cromatografía de capa fina analítica
3. CCFP Cromatografía de capa fina preparativa
4. RMN Resonancia magnética nuclear
5. IR Espectroscopia de Infrarrojo
6. RMN ¹H Resonancia magnética nuclear de protones
7. RMN ¹³C Resonancia magnética nuclear de carbono 13
8. DEPT Distortionless enhancement by polarization transfer
9. CG/EM Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas
10. UV Ultravioleta
11. EP Éter de petróleo
12. AcOEt Acetato de etilo
13. DMSO Dimetilsulfóxido
14. EEP Extracto soluble en éter de petróleo
15. EAE Extracto soluble en acetato de etilo
16. EM Extracto soluble en metanol
17. CL₅₀ Concentración letal media
18. TR Tiempo de retención
19. DBF Dibutil ftalato
20. R_f Relación entre el desplazamiento del soluto y el solvente
21. AMBF Agua de mar bifiltrada

RESUMEN

A la alga *Caulerpa racemosa* (recolectada en la Isla de Cubagua), se le realizaron extracciones exhaustivas con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol. A cada uno de los extractos se le realizó análisis fitoquímico, así como pruebas de actividad antibacteriana, citotoxicidad con huevos de erizo de mar *Echinometra lucunter* y letalidad contra el crustáceo *Artemia salina*. El análisis químico demostró la presencia de cumarinas, alcaloides, esteroides insaturados, polifenoles y glicósidos cardiotónicos. El EEP mostró actividad antibacteriana débil (diámetro del halo entre 7-11 mm) contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia sp.*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*; mientras que EAE, solo fue activo contra la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*. Asimismo, algunas fracciones del EEP mostraron actividad débil y moderada (diámetro del halo entre 11-16 mm) contra el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus subsp aureus* y *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*. Aunque ninguno de los extractos mostraron actividad letal frente al crustáceo *A. salina*, algunas fracciones del EAE mostraron actividad fuerte a las 48 horas de exposición con CL_{50} menor a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los tres extractos ensayados y algunas fracciones del EAE, originaron efectos citotóxicos de gran importancia en el desarrollo embrionario del erizo de mar *E. lucunter* con un porcentaje de anomalías entre 50-70%. Después de realizar el fraccionamiento cromatográfico continuo en el EEP, mediante CG/EM se logró caracterizar los compuestos mayoritarios de algunas fracciones y subfracciones: 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona, nonadecano, Z-5 nonadeceno, 8-heptadeceno, heptadecano, ácido tetradecanoico, 6,10,14-tetrametil-2-pentadecanona, éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico, éster hexadecílico del ácido hexadecanoico, ftalato de dibutilo, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y ácido hexadecanoico. Los análisis de IR, RMN de ^1H , ^{13}C y DEPT-135, permitieron caracterizar el ácido heptadecanoico en la subfracción IV_{5.2}. En el EAE, se identificaron mediante CG/EM, los compuestos éster etílico del ácido hexadecanoico, éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico y ftalato de dibutilo; y a través de los análisis de RMN unidimensional, se pudieron caracterizar los compuestos éster di-(etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico y el 4-metoxi-3-metil-1-naftoato de metilo.

INTRODUCCIÓN

Desde la historia de la humanidad, la naturaleza ha sido siempre una fuente inagotable de compuestos activos que, desde el punto de vista farmacológico, se han venido utilizando con gran efectividad para el alivio de diversos tipos de enfermedades (1). Antiguamente, las plantas y los microorganismos de origen terrestre, fueron los primeros organismos empleados por el ser humano, como productores de principios activos con aplicación medicinal (1,2).

En años recientes, se ha despertado un significativo interés en los productos naturales para la elaboración de nuevos medicamentos, lo cual ha sido de gran utilidad para las industrias farmacéuticas. La búsqueda de medicamentos de origen natural, surge por el frecuente incremento de las enfermedades, tales como el cáncer. Hoy en día, se estima que cerca del 60 % de las drogas con actividad antibacteriana y anticancerosa son de productos naturales o sus derivados (2,3). Dentro de éstas se encuentran los antibióticos claritromicina [Biaxin[®]] y azitromicina [zitromax[®]], un análogo de paclitaxel [Taxol[®]] y el docetacel [Taxotere[®]] (4).

Los productos naturales son considerados las mejores fuentes de compuestos para la elaboración de nuevos fármacos, debido a que poseen estructuras únicas, que pueden ser fácilmente absorbidas y metabolizadas por el organismo (2,4). Aunque inicialmente el estudio de los productos naturales se basó principalmente en plantas terrestres, la búsqueda de nuevos compuestos que puedan cubrir las necesidades terapéuticas del siglo XXI, ha llevado a la exploración de otros organismos como nuevas fuentes de sustancias naturales (4,5).

Los océanos cubren cerca de las tres cuartas partes de la superficie del planeta y la biodiversidad de especies que habita en su seno es superior a la existente en la tierra, estimándose que contiene alrededor del 95% de la biósfera (6). La elevada diversidad de especies en el mar es originada por la variabilidad de ambientes marinos: en distintos rangos de temperatura, presión, nutrientes, iluminación solar, y altas concentraciones de halógenos (7).

Aunque la biodiversidad de los océanos es muy superior a la de la tierra

(representado por 34 phyla), su exploración desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado (más de 30 años), conociéndose alrededor de 11 000 compuestos marinos frente a 155 000 de origen terrestre (5,6).

Las especies marinas han evolucionado para adaptarse a una gran variedad de ambientes ecológicos, permitiendo definir y seleccionar diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque y comunicación con otros organismos marinos. La amplia variabilidad de hábitats, les ha permitido desarrollar diversas rutas metabólicas secundarias, que producen una gran cantidad de compuestos químicos inusuales para adaptarse a sus estilos de vida (5,8). Estos compuestos abarcan una enorme variedad de clases químicas, incluyendo terpenos, policétidos, acetogeninas, péptidos, alcaloides, compuestos halogenados y muchas estructuras no identificadas y caracterizadas (8).

Casi todas las clases de organismos que habitan en el ecosistema marino, exhiben una variedad de moléculas con características estructurales y químicas únicas; es decir, que no se encuentran en las especies de origen terrestre (9). En los últimos años, los productos naturales de origen marino, han adquirido mayor relevancia en el sector farmacéutico, debido al descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos, para combatir múltiples enfermedades que afectan al hombre (8,10).

Las propiedades farmacológicas y médicas de los extractos de las especies marinas, hacen de este medio, una fuente potencial de fármacos y un campo abierto a la investigación en la farmacognosia (11). Numerosas publicaciones en revistas científicas, les atribuyen a las sustancias bioactivas de origen marino, actividades farmacológicas como: anti-cancerígenos, antivirales, anti-maláricos, anti-fúngicos, anti-coagulantes, antibacterianos, entre otros (12).

En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas con aplicación biomédica, la atención se centra en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento y colores llamativos, que usualmente indican la presencia de sustancias químicas, usadas como método de defensa contra sus depredadores (10,12). Entre estos organismos, las algas poseen un mecanismo

defensivo similar, donde los compuestos químicos crean las condiciones necesarias para evitar ser atacadas por organismos epibioentes (12,13).

Las algas figuran entre los seres vivientes más antiguos del planeta tierra, con aproximadamente 1 a 3 millones de años de antigüedad (14). Estas conforman un conjunto de organismos acuáticos con una estructura morfológica menos compleja que la de las plantas terrestres y son responsables de más de la mitad de la actividad fotosintética del mundo (15,16).

Existen aproximadamente 30 000 especies de algas distribuidas en todo el mundo, produciéndose en lugares donde hay luz y humedad; y se encuentran en mayor abundancia en el mar (17). Estas especies poseen variadas formas, desde la más simple estructura celular de 1 a 15 micras (microalgas) hasta las más complejas que llegan a 60 metros de largo (macroalgas) (18).

Tradicionalmente, los países asiáticos han incluido a las algas marinas en su dieta por constituir un alimento sano (bajo en calorías y grasas), completo (contienen carbohidratos y son una fuente inigualable de proteínas) y con un elevado valor nutritivo (altas concentraciones de vitaminas, minerales, fibras y ácidos grasos poli-insaturados) (19). En el campo industrial y tecnológico las algas son de gran importancia y utilidad, ya que se usan en la producción de compuestos biológicos, de hidrógeno, de biocombustibles, específicamente biodisel y biofertilizantes; en el tratamiento de aguas, en las industrias cosmética, farmacéutica y alimenticia; siendo de especial importancia la obtención de ficocoloides (alginatos, carragenatos, agar y agarosa) empleados en la industria química, textil y alimenticia (19,20).

Desde hace varias décadas, las algas han sido reconocidas como una de las fuentes más ricas de nuevos compuestos bioactivos, descubriéndose en algunos casos estructuras moleculares únicas que manifiestan actividad antibacteriana, anticancerígena, cardiotónica, antiviral, antitumoral, antiinflamatoria, anticoagulante, entre otros (21,22).

La producción de metabolitos secundarios de estas especies, es considerada una respuesta a las presiones ecológicas, tales como la defensa química para disuadir

a los organismos herbívoros, competencia por el espacio, atracción de gametos y fecundación a través de receptores específicos; además de controlar el establecimiento y crecimiento de bacterias y otros organismos que alteran su entorno (23, 24).

No hay que olvidar que las algas marinas viven en un hábitat complejo y están sometidas a condiciones, a veces extremas (cambios bruscos de salinidad, variación en la irradiación, periodos de emersión por efecto de mareas, oleaje y predadores), por lo que tienen que adaptarse rápidamente a las nuevas circunstancias, produciendo metabolitos secundarios que pueden ser de gran utilidad para el hombre (25).

Las algas marinas son capaces de producir una increíble diversidad de metabolitos secundarios, que pueden ser utilizados de forma beneficiosa, para el desarrollo de biofármacos con una amplia aplicación medicinal (26), demostrando ser una fuente de aminoácidos, terpenos, florotaninos, esteroides, compuestos fenólicos, cetonas y alcanos halogenados y polisulfuros cíclicos (27).

Las pruebas fitoquímicas y estudios farmacológicos sobre algas marinas, se refirieron especialmente a terpenos y esteroides, ya que en éstos organismos suelen encontrarse una gran diversidad de formas de carotenoides y esteroides, al contrario de las plantas terrestres, donde son muy similares entre sí (27,28). Al igual que sucede en las plantas terrestres, las estructuras de los metabolitos secundarios de las algas son modificadas debido a los elementos presentes en el medio marino, tales como bromuro, yoduro y cloruro (28). En este sentido, se han aislado terpenoides en algas marinas del tipo diterpeno con estructuras únicas y algunas de ellas son halogenadas (Fig. 1).

Un nuevo diterpeno bicíclico [1], fue identificado en el alga *Dictyota crenulata* recolectada en las cercanías de Cuba; este compuesto fue aislado posteriormente, en otras especies. El diterpeno [2] separado del alga parda *Pachydictyon coriaceum* (Óceano Pacífico). Muchos otros compuestos análogos han sido identificados en esta especie. También se ha determinado que algunas algas del Mediterráneo, pertenecientes al orden Gigartinales, producen cantidades sustanciales

de metabolitos inusuales, siendo el diterpeno [3] el más abundante (29).

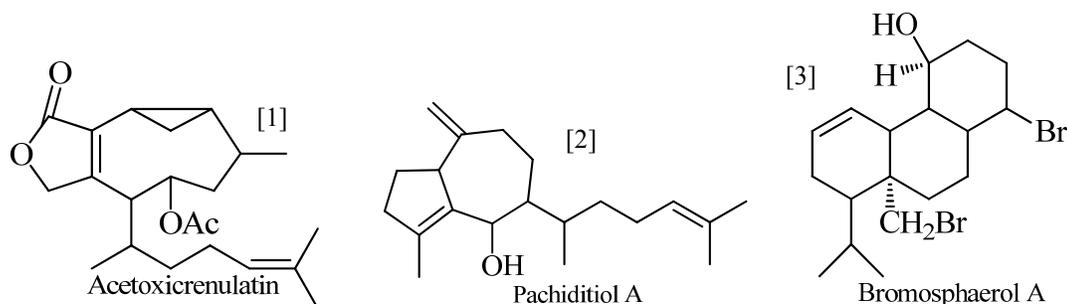


Figura 1. Algunos ejemplos de diterpenos aislados de algas marinas.

En relación a la actividad antibacteriana y antifúngica se han desarrollado una importante cantidad de investigaciones (30). En este sentido, al evaluar la actividad antibacteriana de los extractos hexánico, clorofórmico y etanólico de 6 macroalgas de la costa noreste de Brasil, se demostró que el extracto hexánico del alga *Amansia multifida* inhibió el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Serratia marcescens* y *Vibrio cholerae*; y las Gram positivas, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (31). Asimismo, los extractos orgánicos de 3 macroalgas de la India, presentaron actividad antibacteriana contra el crecimiento de tres bacterias Gram negativas (*Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*) y 2 Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Bacillus brevis*) (27).

En un estudio realizado para la determinación de la actividad antifúngica y antibacteriana de 82 especies de macroalgas marinas de la Península Ibérica, se observó actividad antimicrobiana en el 67% de todas las macroalgas estudiadas, donde se relacionó la producción de sustancias antimicrobianas con la estación del año, observándose mayor actividad biológica en la estación de otoño (32). El potencial antibacteriano de las algas marinas se debe a su capacidad para sintetizar, entre otros, diterpenos en las algas verdes (Chlorophyta), terpenos halogenados en las algas rojas (Rhodophyta) y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático en las

algas pardas (Phaeophyta) (33-36).

Más de 2 400 productos naturales han sido aislados a partir de macroalgas, pertenecientes a las divisiones Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta, de origen tropical y subtropical (37). A pesar de ello, el número de especies de macroalgas estudiadas e identificadas, representa solo el 2% de los 155 000 compuestos aislados de las especies, en diferentes partes del mundo (38).

La División Chlorophyta, que comprende las algas verdes, constituye otro gran grupo de macroalgas de interés farmacológico. Estas especies se encuentran en gran abundancia en los ambientes acuáticos y habitan tanto en aguas dulces como saladas, encontrándose también en ambientes terrestres (rocas, lodos, troncos de árboles); contienen los pigmentos clorofila *a* y *b*, β - carotenos y diversas xantofilas (es decir, la misma combinación de las plantas terrestres); además, de ser ricas en ácido acrílico, aldehídos y terpenoides (39,40).

Las familias Codiaceae, Udoteaceae y Caulerpaceae, han mostrado una amplia bioactividad en ensayos farmacológicos, aislándose aproximadamente 70 metabolitos secundarios de estas algas (41); sin embargo, hay muy pocos reportes de nuevos metabolitos secundarios en las Chlorophytas, respecto a otras divisiones algales (42). El difenil éter [4] (Fig. 2) aislado del alga *Cladophora fascicularis* por diferentes métodos cromatográficos, constituye el primer ejemplo de este tipo de compuesto aislado en las algas verdes. Esta sustancia [4] presentó propiedad antiinflamatoria al suprimir la inflamación causada por la administración a ratones de una toxina de serpiente; además, fue activo en la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (43).

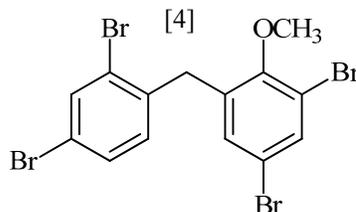


Figura 2. Estructura del difenil éter.

A partir de las algas verdes se han aislado otros metabolitos de distinta naturaleza química con actividad biológica. Así, el liengarosido A, aislado de *Codium iyengarii* presentó una moderada actividad antibacteriana. Los carpisterones A y B (ésteres de triterpenos sulfatados) separados del alga *Penicillus capitatus*, presentaron una potente actividad antifúngica contra el hongo patógeno de algas marinas *Lindra thallasiae*. A partir de la especie *Codium pungniformis* se purificaron polisacáridos con propiedades anticoagulantes, determinando que el mecanismo de acción a través de la cual ejerce su actividad biológica implica la inhibición de la trombina y la potenciación de la antitrombina III (43).

Un nuevo derivado del difenil bromado [5] (Fig. 3) fue aislado del alga verde *Arrainvilla rawsonii*, el cual mostró actividad inhibitoria contra la enzima IMPDH que está relacionada con la proliferación celular, demostrando así, la actividad de este compuesto contra el cáncer y los efectos inmunosupresores. Tres nuevos cicloartenol disulfatos aislados del alga *Tydemania expeditionis*, exhibieron una inhibición moderada de esta enzima (43).

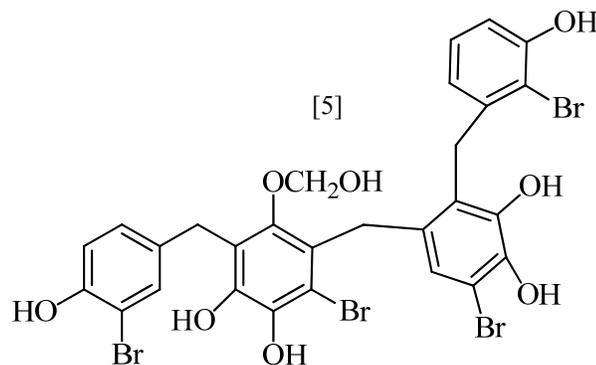


Figura 3. Estructura del isorawsonol

Las algas marinas del género *Caulerpa* (División Chlorophyta, orden Bryopsidales, Familia Caulerpaceae) comprenden alrededor de 70 especies, las cuales se encuentran distribuidas en los mares tropicales y subtropicales. Estas especies han sido ampliamente estudiadas en diferentes partes del mundo por su carácter invasor, ya que suelen reproducirse muy rápidamente, lo que ha originado en muchos casos,

daños ecológicos de gran importancia a los ecosistemas nativos (44, 45).

El interés químico en los metabolitos presentes en las algas de este género, surgió debido a la búsqueda del principio irritante de estas especies consideradas comestibles, y de la observación, de que los peces e invertebrados herbívoros que estaban a su alrededor, evitaban consumir las algas de las Familias Caulerpaceae y Codiaceae (46).

La producción de metabolitos secundarios en las especies del género *Caulerpa*, está asociada principalmente a la defensa contra organismos herbívoros, ya que éstas suelen sintetizar sustancias repulsivas y tóxicas para evitar ser consumidas. La mayoría de estos compuestos incluyen terpenos, polifenoles, bases aminoácidas, compuestos halogenados y caulerpenina (47). Los diferentes metabolitos encontrados en las algas de este género, han mostrado considerable actividad en diferentes ensayos biológicos, encontrándose en algunos casos niveles similares de actividad biológica (44).

El sesquiterpeno [6] (Fig. 4), es el principal metabolito sintetizado por las algas verdes del género *Caulerpa*, el cual juega un papel importante en su defensa química (48). Este compuesto es un sesquiterpenoide acetilénico que fue aislado por primera vez de *Caulerpa prolifera* recolectada en el Mediterráneo, pero desde entonces se ha encontrado en otras especies de *Caulerpa*, siendo un constituyente particular de *Caulerpa taxifolia* (49,50). El compuesto [6] ha mostrado propiedades antibióticas, efectos citotóxicos en las células de mamíferos, actividad antiproliferativa e inhibición de la división celular en huevos de erizo de mar (48,49).

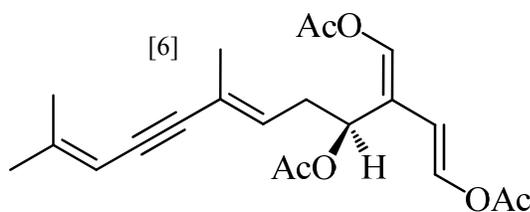
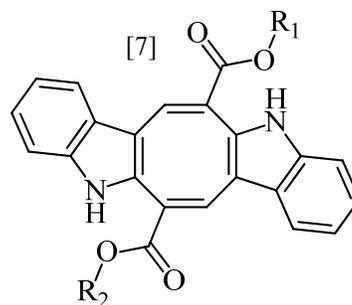


Figura 4. Estructura de caulerpenina.

El compuesto [7] (Fig. 5), se aisló del alga *Caulerpa racemosa* recolectada en Sri Lanka es un derivado de fenazina, el cual corresponde a el único pigmento extraído originalmente de *C. racemosa* (51). El pigmento [7] contiene dos grupos indol unidos a un anillo cíclico que contiene ocho átomos de carbono con dos grupos carboxílicos (52). La estructura cristalina de este pigmento rojo fue identificada mediante las técnicas de infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. Posteriormente, la caulerpina ha sido identificada en otras especies de *Caulerpa*, algas verdes y algunas algas rojas (17,51,52).

Los análogos de [7] (I), caulerpina (II) y (III) también fueron aislados de *Caulerpa racemosa* (52). El compuesto [7] (I) ha exhibido actividad tóxica en los humanos (en algunos casos) luego de la ingestión del género *Caulerpa*, actividad antifúngica, actividad antitumoral moderada *in-vitro* contra el tumor de corona biliar, actividad antibacteriana moderada contra 8 especies de bacterias aisladas de la superficie de algas y actividad reguladora en el crecimiento vegetal (52).



- I R₁: CH₃; R₂: CH₃
 II R₁: H; R₂: H
 III R₁: CH₃; R₂: H

Figura 5. Estructura de caulerpina I y sus análogos (II y III).

El alcaloide [8] (Fig. 6), el cual es un bisindol con siete miembros en el anillo central y dos antiparalelos en el núcleo indol, se aisló en 1997 a partir del alga *Caulerpa serrulata*. Hasta el momento, este compuesto [8] representa el único producto natural aislado, que contiene una estructura de puente bisindol por un armazón troponoide central (52,53).

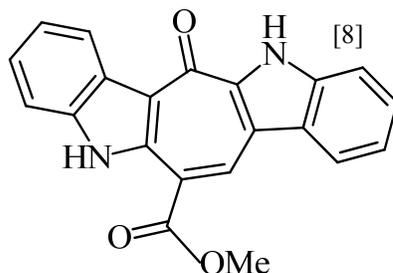
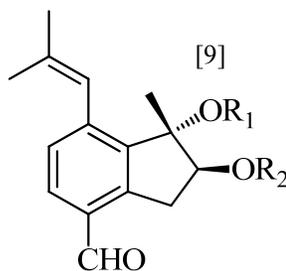


Figura 6. Estructura del caulersin.

La caulerpicina fue el primer compuesto aislado de las algas pertenecientes al género *Caulerpa*. Este principio activo fue extraído específicamente de la especie *Caulerpa racemosa*, y fue identificado como una mezcla de tres amidas homólogas de 2-aminohexadecanol con penta, hexa y ácido heptacosanoico; posteriormente, fue caracterizado mediante las técnicas de espectrometría de masas, RMN e IR, como una mezcla de ceramidas derivadas del 2*S*, 3*R*- esfinganina (54). La caulerpicina es un compuesto tóxico que ha causado efectos adversos en los seres humanos. Este metabolito se acumula en algunos herbívoros asociados a las especies del género *Caulerpa*, lo que permite protegerlas contra los depredadores; además, ha exhibido actividad antibacteriana pero altamente tóxica (54).

Dos sesquiterpenos [9] (Fig. 7) fueron aislados del alga verde *Caulerpa taxifolia*; además de la caulerpicina, se ha demostrado que estos compuestos [9] son potentes inhibidores de la proteína humana fosfatasa tirosina 1 B (hPTP I B) (43).



A R₁: H; R₂: Ac

B R₁: Me; R₂: H

Figura 7. Estructura de caulerpales A y B.

En Venezuela, son muy pocas las investigaciones acerca de la actividad biológica en algas marinas, ya que la gran mayoría están enfocadas a estudios taxonómicos; sin embargo, entre estas investigaciones se puede resaltar el aislamiento, de una nueva lectina en 1990, a partir del alga *Halimeda opuntia*, la cual presentó una fuerte actividad aglutinante en los eritrocitos humanos del tipo ABO. En algas marinas recolectadas en las costas del Distrito Federal y del estado Falcón, se demostró la presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasa; además, se realizaron ensayos con diferentes eritrocitos (conejo, cobayo, ratones y humanos), encontrándose que los eritrocitos tratados enzimáticamente fueron más susceptibles a la presencia de las lectinas, siendo las especies de la división Chlorophyta las que exhibieron mayor actividad aglutinante (55).

En 1992, al ensayar con muestras de algas provenientes de las costas venezolanas, se detectó la presencia de lectinas, alcaloides y agentes antihemostáticos. Asimismo, en el año 2001, se evaluó la actividad antibacteriana y hemaglutinante de 12 extractos acuosos provenientes de algas marinas del nororiente venezolano; solo *Derbesia vaucheriaeformis*, *Ulva fasciata*, *Halimeda opuntia* e *Hypnea musciformis*, mostraron propiedades aglutinantes en sangre humana del tipo ABO y solo *Ulva fasciata* sobre el grupo O. El estudio de la actividad antibacteriana demostró que las algas *U. fasciata*, *D. vaucheriaeformis*, *Halimeda gelinaria*, *Laurencia papillosa* e *H. musciformis* inhibieron las cepas patógenas Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, atribuyendo dicha actividad a las lectinas presentes en estas algas marinas (55).

En el 2009, se realizó un estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos en hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol obtenidos de las macroalgas *Glacilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatun* y *Kappaphycus alvarezii*. En este estudio se demostró que las 3 especies estudiadas presentaron actividad bactericida frente a las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Yersinia sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y las Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus luteus*

con halos de inhibición entre 11-19 mm, siendo todos los extractos inactivos contra el crecimiento de las cepas de hongos ensayadas. La actividad biológica observada fue atribuida a la presencia de los compuestos hidrocarburos saturados e insaturados, alcoholes, fenoles, lactonas, cetonas, ácidos grasos y esteroides, previamente identificados como componentes mayoritarios mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (56).

En la búsqueda de sustancias bioactivas presentes en las costas venezolanas, se destaca la evaluación toxicológica y fitoquímica del alga *Kappaphycus alvarezii* proveniente de la región oriental de Venezuela realizada en el año 2011, donde las pruebas químicas revelaron la presencia de esteroides insaturados, saponinas, alcaloides y triterpenos pentacíclicos en esta especie. Los resultados de la actividad tóxica frente a los organismos *Artemia salina*, *Daphnia magna* y *Litopennaeus vannamei*, demostraron que los extractos en acetato de etilo y metanol del alga recolectada en Cubagua y el Guaranache presentaron mayor actividad letal frente al crustáceo *A. salina* con CL_{50} entre 6,85-361,45 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mostrando el extracto metanólico actividad letal para *D. magna* con CL_{50} 117,93 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y los extractos en éter de petróleo y metanol la mayor actividad tóxica frente *L. vannamei* con CL_{50} igual a 29,16 y 49,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La actividad citotóxica frente a los huevos de los erizos de mar fue mayor en el alga proveniente de Cubagua, observándose daños citológicos importantes en el desarrollo embrionario del erizo *Echinometra lucunter* (57).

Venezuela cuenta con una increíble diversidad de especies, tanto de flora como de fauna, lo que implica que una gran variedad de estructuras químicas útiles están siendo ignoradas. Los estudios sobre la actividad biológica en especies marinas venezolanas son muy escasos, por lo que nuestras costas continúan inexploradas. Las algas del género *Caulerpa* son especies que presentan diversos tipos de actividad biológica, los cuales son objeto de estudio en diferentes países latinoamericanos, delimitados por el mar Caribe. Por otra parte, aunque este género presenta una gran variedad de especies, las mismas han sido poco estudiadas o permanecen aún por descubrir.

Considerando el potencial farmacológico del género *Caulerpa*, la presente investigación realizó el estudio fitoquímico y bioactividad de la especie *C. racemosa* proveniente de las costas venezolanas (Isla de Cubagua), con el fin de identificar a través de la combinación de diferentes técnicas (IR, RMN y CG/EM) y varias pruebas químicas, los metabolitos secundarios responsables de su posible actividad biológica (letalidad, citotoxicidad y actividad antibacteriana). Esta investigación, no solo se hace una contribución al conocimiento científico de los productos naturales de esta especie de las costas venezolanas, sino que, además, se espera sirva como incentivo para posteriores investigaciones en la búsqueda de nuevos compuestos con aplicación medicinal e industrial.

METODOLOGÍA

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las muestras del alga *Caulerpa racemosa* utilizadas en esta investigación fueron recolectadas mediante buceo libre a profundidades cercanas a los 2 metros, en arrecifes de coral de fuego (*Millepora alcicornis*), ubicados en la costa noreste de la Isla de Cubagua, municipio Tubores, estado Nueva Esparta, con una ubicación geográfica de 10° 43' 23'' Latitud Norte y 66° 05' 08'' Longitud Oeste (Fig. 8). La cantidad de alga húmeda recolectada para la realización de este trabajo científico, fue de aproximadamente 5 Kg.



Figura 8. Ubicación geográfica del área de muestreo (Isla de Cubagua-estado Nueva Esparta, Venezuela).

Las muestras de *C. racemosa* (Fig. 9), fueron identificadas por el Prof. Jorge Barrios perteneciente al grupo de investigadores del Instituto Oceanográfico de Venezuela (I.O.V.). Posteriormente, las algas recolectadas se trasladaron al

Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos en una cava con hielo, para su posterior procesamiento y análisis.



Figura 9. *Caulerpa racemosa*.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Las muestras húmedas del alga *C. racemosa* fueron limpiadas manualmente y lavadas con abundante agua destilada para remover el exceso de sal, arena y los organismos epífitos o partículas extrañas presentes en el material vegetal objeto de estudio. Luego, las algas se deshidrataron a temperatura ambiente y a la sombra durante una semana. Una vez secas, fueron pulverizadas en un molino eléctrico y el polvo obtenido se pesó en una balanza analítica y se almacenó en bolsas plásticas para su posterior extracción.

El alga pulverizada se maceró en éter de petróleo durante 72 horas para obtener los extractos crudos (Fig. 10), Luego de filtrar el solvente, el residuo se extrajo de nuevo con el mismo solvente por 48 horas, para asegurar la completa extracción de sus principios activos, este procedimiento se repitió 3 veces. El residuo se maceró de forma consecutiva utilizando solventes de mayor polaridad como: acetato de etilo y metanol, y aplicando la metodología antes mencionada. Los filtrados resultantes fueron unidos de acuerdo a cada solvente y cada uno de los filtrados totales, se concentraron a presión reducida en un rotaevaporador marca Hildolph a una temperatura inferior a 50°C, obteniéndose, así, los extractos crudos

solubles en éter de petróleo (EEP), acetato de etilo (EAE) y metanol (EM).

Cada uno de los extractos crudos del alga, fueron colocados en recipientes de vidrio y almacenados en un desecador, para realizarle posteriormente las pruebas de letalidad, citotoxicidad, actividad antibacteriana y el estudio fitoquímico.

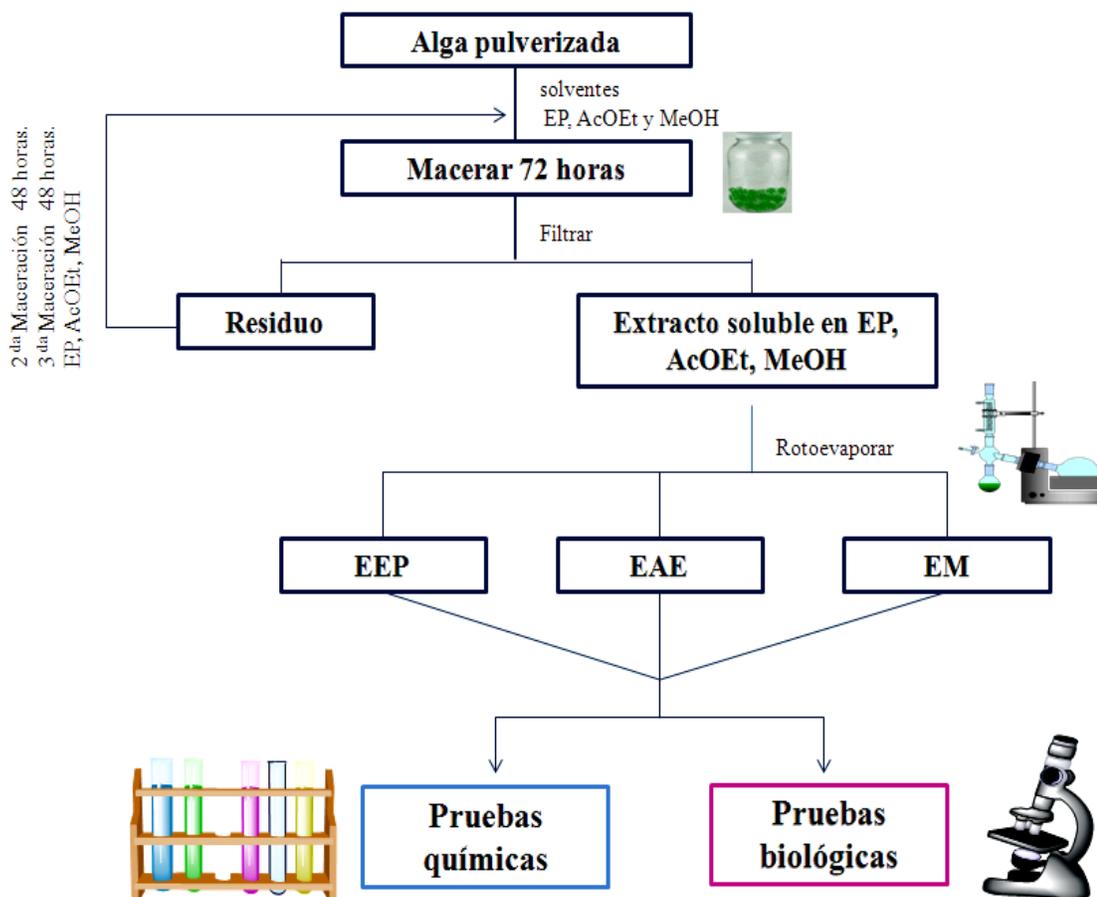


Figura 10. Esquema para la obtención de los extractos crudos de *C. racemosa*.

PRUEBAS QUÍMICAS

La evaluación química preliminar de los extractos (EEP, EAE y EM) se realizó empleando ciertos reactivos de clasificación. A través de ensayos analíticos de coloración y de precipitación, se pudo detectar la presencia o ausencia de los diversos metabolitos secundarios en los distintos extractos (58,59).

Taninos

En dos tubos de ensayos, se colocaron 0,5 g del extracto y 1 ml de solución de gelatina-sal (solución de gelatina al 1% en NaCl al 10%). En el primer tubo se añadieron 0,5 ml del reactivo gelatina-sal y el segundo tubo sirvió como control. La formación de un precipitado, indicó la presencia de taninos.

Polifenoles

La detección de polifenoles, se llevó a cabo evaporando a sequedad el extracto crudo, el cual se retomó en agua destilada y se filtró. Seguidamente, el extracto filtrado se hizo reaccionar con una solución de cloruro de hierro (III) al 1 %. La prueba de polifenoles se consideró positiva por el cambio de la solución a una coloración parda.

Flavonoides

A 1 ml del extracto disuelto, se le agregaron 0,5 g de virutas de Mg y, HCl concentrado gota a gota, hasta que terminara el desprendimiento de hidrógeno y durante 10 minutos se observaron cambios de color en la solución. La aparición de una coloración amarilla a roja fue positiva para la presencia de flavonoides.

Glicósidos cianogénicos y cardiotónicos

La presencia de glicósidos cianogénicos, se detectó añadiendo al material fresco macerado unas gotas de cloroformo y calentando entre 50 a 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 identificaron por la aparición de una mancha roja sobre el papel de filtro.

Los glicósidos cardiotónicos se detectaron por la reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5- dinitrobenzoico (2%) y KOH ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). La presencia de los glicósidos cardiotónicos fue detectada por la aparición de un color

rojo violeta.

Cumarinas

El extracto crudo fue disuelto en etanol, y se tapó con un papel de filtro impregnado en una solución diluida de NaOH; posteriormente, se llevó a un baño de maría a 100°C por algunos minutos. Transcurrido este tiempo, se removió el papel de filtro y fue observado Bajo la luz UV. Una fluorescencia amarilla observada en el papel de filtro fue indicativo para la presencia de cumarinas.

Antraquinonas

Los extractos crudos se extrajeron con KOH ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$); luego, fueron filtrados y acidificados con ácido acético, y después, la solución preparada se agitó con benceno. La aparición de una coloración roja en las capas orgánicas al alcalinizar con hidróxido de amonio fue positiva para la presencia de antraquinonas.

Metilencetonas

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

Alcaloides

El extracto casi seco se retomó con HCl al 10% y se agitó con cloroformo. El empleo del solvente poco polar permitió la separación de la sal formada de los compuestos orgánicos presentes, lo que facilitó la determinación de los alcaloides. La fase acuosa, luego de alcalinizada, se extrajo con cloroformo. Las tres fases se analizaron por separado con el reactivo de Meyer (tetrayodomercuriato de potasio), de Dragendorff (tetrayodobismutato de potasio), o ácido yodoplatínico, lo cual permitió detectar los alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de

amonio. La aparición de un precipitado marron-rojizo fue indicativo como positivo para la detección de alcaloides.

Saponinas

Se tomaron aproximadamente 0,5 g del extracto crudo y se transvasaron a un tubo de ensayo con 2 ml de agua destilada. Posteriormente, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos. La presencia de saponinas se tomó como positiva por la aparición de una espuma persistente durante 10 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 empleando el reactivo de Liebermann-Burchard (1 gota de ácido sulfúrico a 1 ml de cloroformo), una coloración azul o verdosa indicó la presencia de esteroles. Mientras que la producción de una coloración roja o violeta, se consideró positiva para triterpenos.

Fenilpropanoides

Una pequeña cantidad del extracto crudo se disolvió en etanol y se añadió 1 ml de la solución del extracto etanólico en tres tubos de ensayo. El primer tubo sirvió como patrón de comparación, al segundo se le añadieron 2 ml de HCl $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 2 ml de la solución acuosa de nitrito de sodio al 10% (reactivo de Arnow) y 2 ml de la solución acuosa de NaOH $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, y, en el tercer tubo, se adicionaron todos los reactivos sin la muestra que también sirvió como testigo para la comparación ante los cambios de coloración. Al haber presencia de fenilpropanoides, el reactivo de Arnow muestra una coloración naranja y después de la adición del NaOH se cambia a un rosado púrpura, lo que se considera positivo para esta prueba.

FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS

El fraccionamiento cromatográfico es una técnica fundamental para la investigación de cualquier especie en el campo de los productos naturales, ya que permite el aislamiento y la purificación de los compuestos químicos presentes en los extractos y fracciones. La aplicación en conjunto de diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía de columna, de capa fina analítica y preparativa), permitió separar en lo posible los principales constituyentes químicos de la especie *C. racemosa* presente en los extractos y en las principales fracciones (60).

Cromatografía de Columna (CC)

La separación de los principales constituyentes químicos tanto de los extractos como de las principales fracciones, se realizó mediante columnas cromatográficas empaquetadas adecuadas a la cantidad obtenida de los extractos y fracciones en una proporción 1:30, 1:40 y 1:50 ($M_{\text{extracto}}: M_{\text{sílica}}$) de acuerdo a los requerimientos de muestra a separar. La técnica cromatográfica empleada fue la de adsorción en fase normal a presión atmosférica, en donde se empleó sílica gel de 35-70 mesh para rellenar la columna (fase estacionaria) y solventes o mezclas de solventes de diferentes polaridades para arrastrar los compuestos presentes en la muestra (fase móvil).

Cromatografía de capa fina analítica (CCFA)

Esta técnica cromatográfica se basa en el mismo principio de la cromatografía de columna de adsorción a presión atmosférica, con la diferencia de que la fase estacionaria se encuentra soportada en una superficie lisa. Así, se utilizaron placas de vidrio ($20 \times 20 \text{ cm}^2$) recubiertas con sílica gel 60 mesh, con espesor de 0,5 mm. Ésta técnica se empleó con fines cualitativos, para la combinación de los eluatos provenientes de la cromatografía en columna (CC), conforme a los R_f medidos para cada uno de los desplazamientos alcanzados por los componentes de las fracciones o subfracciones dividido entre la distancia recorrida por el solvente .

Como fase móvil se tomaron los solventes o mezcla de solventes, con el cual fueron arrastrados los compuestos al momento de desplazarse en la columna cromatográfica. Cada una de las fracciones o subfracciones fueron analizadas por CCFA, de acuerdo a su comportamiento bajo la luz ultravioleta y solución ácida de molibdato de amonio, en donde se revelaron los distintos componentes de la fracción o subfracción. Aquellas manchas que poseían igual R_f se unieron en una sola fracción.

Cromatografía de capa fina preparativa (CCFP)

La CCFP es similar a la CCFA, con la diferencia de que el espesor de la sílica fue de 1 mm. Esta técnica fue empleada para aislar y purificar las bandas de los diferentes constituyentes químicos de las fracciones y subfracciones separados en la CCFA. Para la separación de los componentes de las fracciones y subfracciones, la muestra se aplicó sobre la placa preparativa en forma de franja (en línea recta) a la misma anchura de la placa de vidrio. Luego de desarrollada la cromatografía, se observaron las bandas a través de la lámpara UV y dichas franjas observadas se marcaron con una espátula. Una vez localizados los compuestos, estos se rasparon uno a uno con cuidado de la sílica, con la ayuda de una espátula. Posteriormente, cada uno de los componentes separados se colocaron en un erlenmeyer y se extrajeron con un solvente adecuado, colocándolo en agitación constante durante 45 min aproximadamente. El compuesto extraído se filtró varias veces, y el solvente fue evaporado a temperatura ambiente bajo una campana de extracción, para obtener finalmente el compuesto purificado y aislado.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Los metabolitos secundarios del alga *C. racemosa* aislados cromatográficamente, se identificaron a través de la combinación de las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM) (61,62).

Espectroscopia de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es un método físico-químico basado en la medición de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias de aproximadamente de 4 a 900 MHz. A diferencia de las técnicas de UV-vis e IR, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de los átomos en lugar de los electrones externos. Los núcleos con un número atómico o un número de masa impar poseen un *spin nuclear* y un momento magnético y que, como consecuencia, al ser expuestos a un intenso campo magnético, absorben radiación electromagnética conduciendo al desdoblamiento de sus niveles de energía.

La identificación de compuestos orgánicos, se realizó por la técnica de RMN para el estudio de los núcleos de protón (^1H) y de carbono-13 (^{13}C), ya que el carbono y el hidrógeno constituyen los componentes mayoritarios en las moléculas orgánicas. Los desplazamientos químicos (δ), son medidos en ppm, como la diferencia en las variaciones en las posiciones de las absorciones, con relación al solvente CDCl_3 .

Los análisis de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se llevaron a cabo en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), en donde los metabolitos secundarios aislados, fueron analizados en el equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 300 MHz. Las muestras se disolvieron previamente en un solvente deuterado adecuado y fueron colocadas en un tubo de resonancia, y luego se introdujeron en el equipo de RMN para la obtención de los espectros.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es la herramienta más poderosa de la que se dispone para la determinación de estructuras en el campo de los productos naturales, ya que se requiere de poca cantidad de muestra y, además, la misma no es destruida. Algunas estructuras se pueden determinar por RMN, pero generalmente es necesario del empleo de un conjunto de técnicas espectroscópicas y análisis, para la determinación de la estructura de una molécula orgánica.

Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia de infrarrojo (IR) se basa en las vibraciones de los enlaces, originados por los distintos cambios en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros, permitiendo así, obtener información acerca de los grupos funcionales presentes en una molécula. La región infrarroja del espectro corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo del visible, y por encima de las microondas ($12\ 800$ a $10\ \text{cm}^{-1}$), siendo las de mayor utilidad en la región de infrarrojo medio ($4\ 000$ a $670\ \text{cm}^{-1}$). La región del espectro IR de frecuencias entre 600 y $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$ (región de la huella dactilar), contiene la mayoría de las vibraciones de una molécula, alguna de ellas características de los enlaces sencillos, existiendo numerosas bandas correspondientes de las deformaciones moleculares, como también algunos sobretonos y combinaciones.

El análisis de IR de las fracciones y subfracciones aisladas, se realizó colocando las muestras en pastillas de KBr y disolviendo algunas de ellas en CHCl_3 (dependiendo de la característica física y la cantidad de muestra). Posteriormente, las pastillas preparadas, fueron introducidas en un espectrofotómetro de IR con Transformada de Fourier (FT), marca Perkin Elmer en el Instituto Universitario de Tecnología (IUT-Cumaná).

Espectrometría de masas

De todas las herramientas analíticas de que dispone un científico, la espectrometría de masas (EM) es quizás la de mayor aplicación, ya que esta técnica es capaz de proporcionar información acerca: de la composición elemental de una muestra, estructura de las moléculas inorgánicas y orgánicas, así como de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas, estructura y composición de muestras sólidas; y relaciones isotópicas de los átomos en las muestras.

En el espectrómetro de masas, se hace incidir electrones (u otras partículas) de alta energía sobre el compuesto a identificar, lo que origina la ionización de las

molécula, luego estos iones son separados de acuerdo con sus masas y se mide finalmente las masas de los diferentes fragmentos; y con esta información se construye la molécula, logrando la elucidación de los compuestos presentes en una muestra.

En el espectro de masas, se representa la relación masa/carga (eje x) y la proporción relativa de cada ion (eje y); en donde las masas de las moléculas fragmentadas estarán redondeadas al número entero más próximo. Una de las grandes ventajas de este análisis es que se necesita de pequeñas cantidades de muestras, es decir que se puede destruir menos de 3 mg; sin embargo, es necesario de un gran conocimiento de los principales procesos de fragmentación.

La combinación de las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), permite la realización de análisis de mezclas de compuestos, el cromatógrafo de gases separa los componentes de la mezcla y el espectrómetro de masas ioniza y fragmenta las moléculas aisladas.

Las fracciones y/o subfracciones mas impuras (constituidos por varios compuestos según CCFA) fueron analizadas a través de CG-EM. Los análisis por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, fueron realizados en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Simón Bolívar (USB). Los resultados fueron registrados en un cromatógrafo de gases marca Hewlett- Packard (HP) modelo 5890, serie II, con una fuente de ionización por impacto electrónico de 70 eV, equipado con una columna de 25 m x 0,18 D.I x 0,18 mm de espesor, acoplado a un espectrómetro de masas de la misma marca modelo 5971 A. La identificación de los compuestos se realizó mediante la utilización de la base de datos y librería NIST 2008.

EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD

Para evaluar la bioactividad del alga *C. racemosa*, se realizaron pruebas de actividad letal, citotoxicidad y de actividad antibacteriana a los extractos y a las fracciones y/o subfracciones aisladas, con la finalidad de determinar la posible

actividad biológica de esta alga verde.

Actividad letal en *Artemia salina*

La actividad letal de los extractos crudos, fracciones y/o subfracciones separadas, fue evaluada mediante la realización de un bioensayo empleándose nauplios del crustáceo *Artemia salina*. Para la obtención de las larvas de *A. salina*, los quistes fueron colocados en un envase de plástico con agua de mar bifiltrada, aeración continua y luz artificial durante 24 horas.

A las 24 horas, luego de haber eclosionado las artemias, se preparó una solución patrón de $10\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ del extracto o fracción, en una mezcla de agua de mar bifiltrada y dimetil sulfóxido (DMSO), según la solubilidad de éstos, y a partir de esta solución, se prepararon soluciones de $1\ 000$; 100 ; 10 ; 1 ; $0,1$; y $0,01\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada (AMBF) en frascos que contenían 10 nauplios de *A. salina* (Fig. 11).

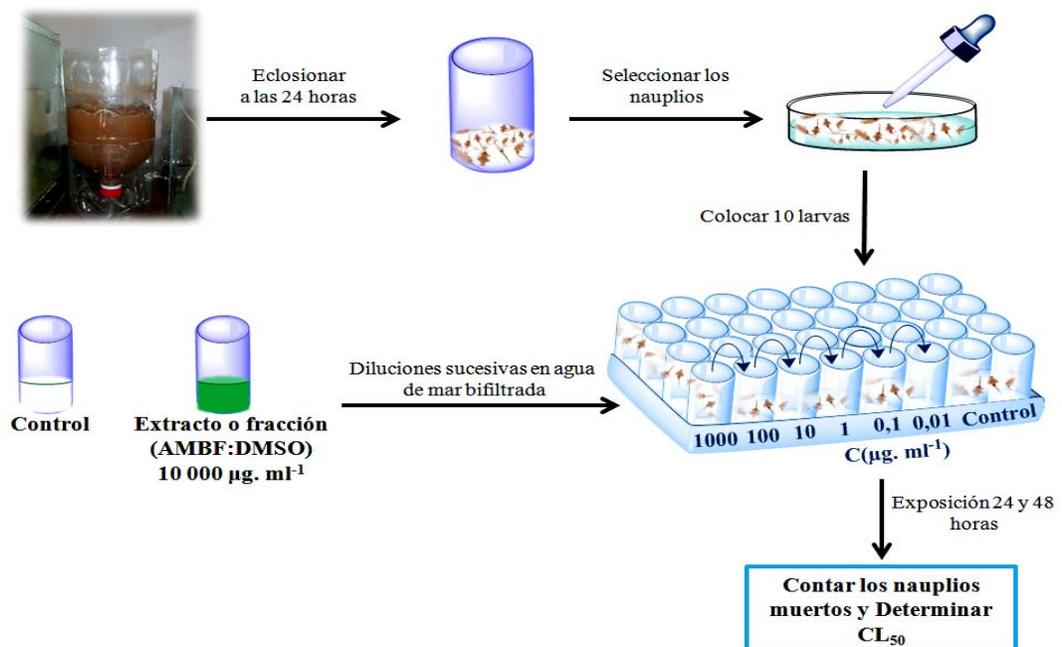


Figura 11. Esquema del bioensayo de actividad letal aplicado a los extractos y fracciones.

De las diferentes soluciones preparadas y de los controles se realizaron tres réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo luego de transcurridas las 24 y 48 horas, respectivamente. En cada una de las soluciones diluidas preparadas, se determinó la cantidad de larvas muertas, cuantificados con una lupa estereoscópica. El análisis de la actividad letal de los extractos crudos, fracciones y/o subfracciones, se efectuó mediante el empleo de diversos métodos estadísticos (Binomial, Moving Average, Probit y Logit) diseñados para estimar la concentración letal media (CL_{50}) (63,64).

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. Posteriormente, estos fueron trasladados hasta el Laboratorio de Fisiología y Ecología Química del Instituto Oceanográfico de Venezuela, colocándolos en agua de mar con aireación continua. Una vez en el laboratorio, se inoculó el erizo en tres puntos diferentes de la región peribucal con 1 ml de KCl al $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, para provocar la expulsión de los gametos. Seguidamente, los ejemplares se invirtieron sobre una cápsula de Petri con agua de mar para colectar los gametos. Luego, las células femeninas (óvulos) fueron lavados, colocándolos en una probeta con 500 ml de agua de mar, para que perdieran gradualmente la capa gelatinosa que los recubre, dejándolos durante 20 minutos para que decantaran los óvulos. Después, se descartó un poco de agua de mar hasta tener un total de 100 ml y en otro vaso de precipitado se recolectaron los gametos masculinos. Como control del bioensayo citotóxico fueron colocados en frascos, 100 μl de esperma, 100 μl de agua de mar y 1 800 μl de óvulos (Fig. 12).

Se preparó una solución madre de $10\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, la cual fue preparada, pesando 12,5 mg de cada extracto crudo o fracción y disolviéndolo en 1,25 ml de DMSO. A partir de la solución de $10\ 000 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ fueron preparadas soluciones diluidas de 500, 250, 125, 75, 10 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$, completando con agua de mar hasta 2 000

μl , realizándose tres réplicas para cada solución preparada y para el control. A cada una de las disoluciones preparadas, se les añadió 100 μl de gametos masculinos y 1 800 μl de femeninos. Además, se realizó un control con DMSO, el cual contenía la misma cantidad de óvulos y espermatozoides que en las disoluciones preparadas, ya que los extractos fueron disueltos en este reactivo.

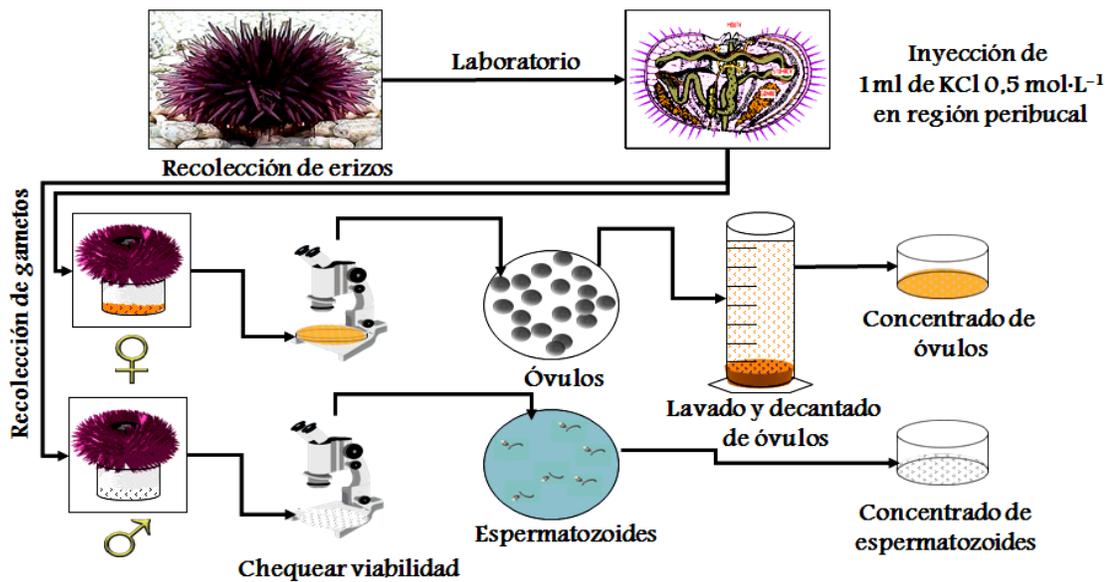


Figura 12. Esquema de recolección de gametos de los erizos de mar *E. lucunter*.

Luego de transcurridos 3 minutos aproximadamente, se observaron los procesos de fecundación, y posteriormente, las divisiones mitóticas de las células fecundadas, y las eventuales anomalías causadas por los extractos o fracciones ensayadas. El tiempo esperado para realizar las observaciones de los efectos causados por los extractos y/o fracciones, fue de 1 a 2 horas para colocar en láminas y observar en el microscopio (Fig. 13). El conteo se realizó bajo un microscopio binocular escogiendo 7 campos al azar. En los experimentos donde se probaron los extractos y/o fracciones, se contabilizaron en porcentaje el número de huevos fecundados, sin fecundar y el número de cigotos con alteraciones en su desarrollo embrionario (57,65).

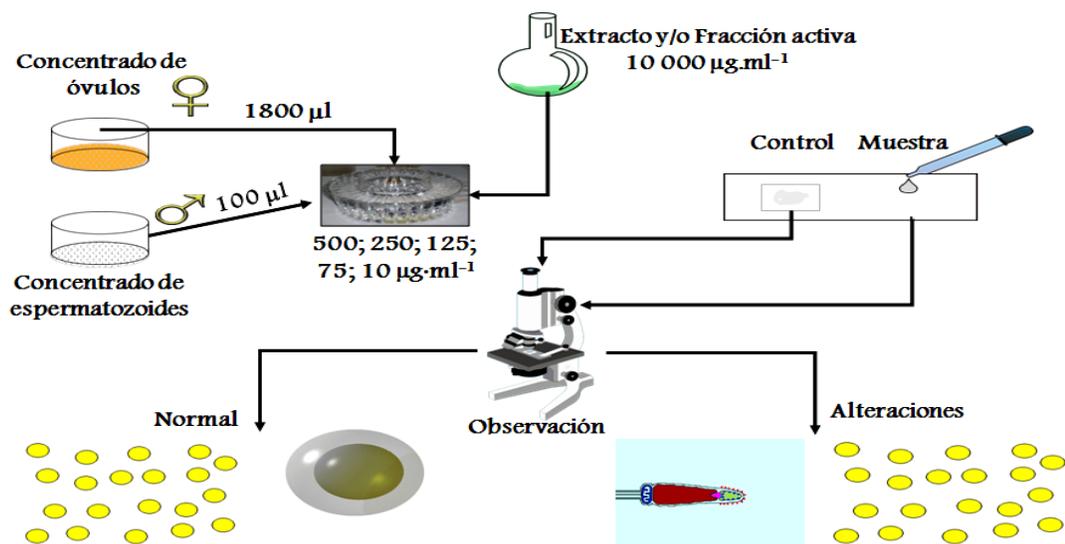


Figura 13. Esquema del bioensayo de citotoxicidad de los extractos o fracciones de *C. racemosa* frente a *E. lucunter*.

Actividad antibacteriana

La presencia de principios antibacterianos se detectó utilizando cepas de bacterias certificadas, pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) existentes en el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Las cepas bacterianas se utilizaron a una concentración conocida (1×10^8 bacterias/ml), en relación a un patrón comercial (MacFarlan 0,5). Para la realización de este ensayo biológico, se utilizó la técnica de difusión en agar, llamada antibiograma, la cual consiste en impregnar discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro, con 10 ó 25 µl de una solución (preparada con 40 mg del extracto o fracción a probar en 1 ml de un solvente adecuado) y colocarlos en una placa de agar Müller-Hinton, previamente inoculada con una suspensión bacteriana de concentración conocida.

Posteriormente, se preincubaron a 5°C por 12 horas y, luego, se incubaron a 37°C por 24 horas. La acción antibacteriana se determinó midiendo el diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnado [Fig. 14] (66).

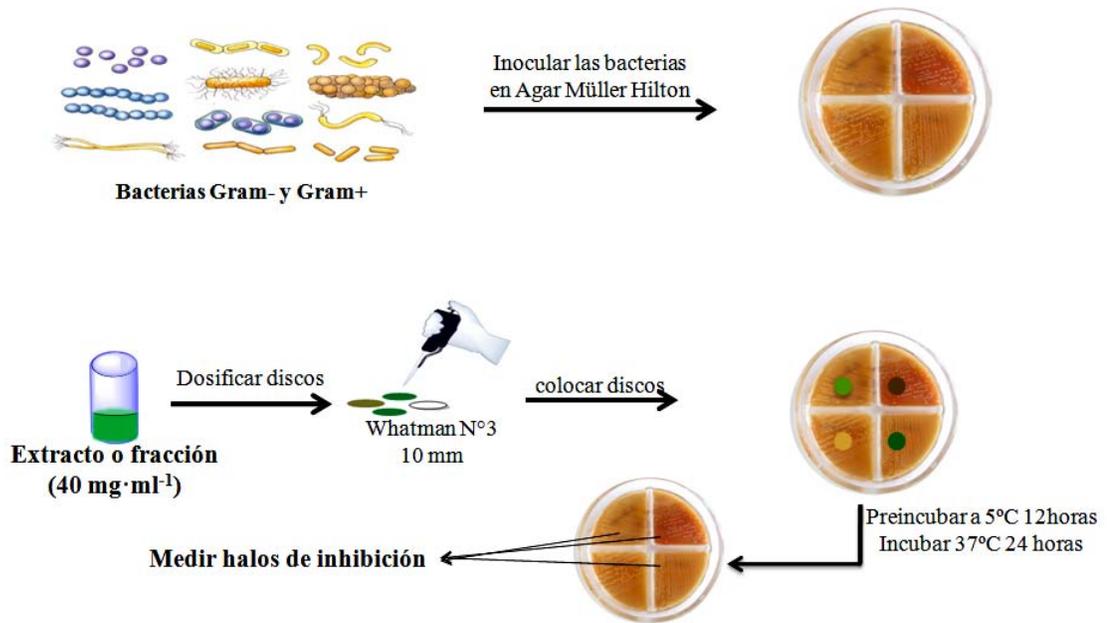


Figura 14. Esquema del método de antibiograma para la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas para la medición de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones.

	Microorganismos	Procedencia
Gram-Positivas	<i>Micrococcus luteus</i>	Bioanálisis (33-8-10)
	<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA(07)
	<i>Staphylococcus aureus subsp aureus</i>	IBE(DOC-19)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	WHO(14)
Gram-Negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC(27853)
	<i>Yersinia sp.</i>	DAI(269JI)
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC(23055)
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC(25922)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la obtención de los extractos crudos del alga *C. racemosa*, fue importante mantener las muestras en condiciones adecuadas para garantizar la preservación de sus principios activos. Por tal motivo, tanto el proceso de deshidratación como el almacenamiento de las muestras, fueron realizadas en un lugar limpio, fresco y libre de humedad, ya que un incremento de la temperatura podía originar la pérdida de sus componentes químicos y un exceso de humedad, hidrólisis y degradación del material vegetal. Además, las muestras fueron protegidas de la luz, principalmente de la luz ultravioleta, para prevenir decoloraciones, catálisis de muchos procesos reactivos y aceleración de la degradación del alga.

1. Rendimiento de los extractos crudos del alga *C. racemosa*.

La extracción de los metabolitos secundarios del alga, se hizo mediante el método de maceración, en el cual se colocó en contacto el material vegetal (previamente molido) con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol. Éste procedimiento fue realizado con la finalidad, que los metabolitos secundarios presentes en el alga pasaran al disolvente empleado, obteniéndose como producto final un extracto líquido. El tiempo de contacto de las muestras, con el disolvente fue un factor importante en este tipo de extracción, ya que se realizó a temperatura ambiente y sin agitación constante; por lo tanto, se realizaron extracciones exhaustivas hasta agotamiento para cada solvente, para garantizar la completa disolución de sus componentes químicos en los solventes empleados.

El método de extracción por maceración, permitió la obtención de 2,57 g del extracto crudo soluble en éter de petróleo (EEP); 11,25 g en el extracto soluble en acetato de etilo (EAE) y 11,61 g correspondiente al extracto soluble en metanol (EM). Los rendimientos porcentuales de cada uno de estos extractos se presentan en la Tabla 2, donde el extracto en metanol obtuvo el mayor rendimiento porcentual. El alto rendimiento en el extracto metanólico se puede inferir que es originado por la gran cantidad de sales presentes en el alga marina, ya que la sal al ser un componente

hidrofílico (se disuelve en agua), es fácilmente disuelto en la extracción al emplear un disolvente de mayor polaridad (metanol), por lo que las sales presentes fueron arrastradas en esta última extracción originando un ligero incremento de masa en este extracto. Además, es necesario resaltar que el EAE fue el segundo extracto con mayor rendimiento porcentual, lo que indica que la mayor parte de los compuestos químicos del alga son de polaridad intermedia (semipolar). A pesar que la extracción se inició con éter de petróleo (solvente de menor polaridad), éste extracto crudo presentó el menor rendimiento en la extracción de compuestos apolares, lo cual confirma que esta especie es capaz de sintetizar compuestos de una polaridad intermedia.

Tabla 2. Rendimiento porcentual de los extractos crudos del alga *C. racemosa*.

Masa alga seca (g)	Extractos	Masa extracto crudo (g)	Rendimiento (% m/m)
288	EEP	2,57	0,89
	EAE	11,25	3,91
	EM	11,61	4,03

EEP: extracto soluble en éter de petróleo; EAE: extracto soluble en acetato de etilo; EM: extracto soluble en metanol.

2. Análisis de los metabolitos secundarios presentes.

Los compuestos químicos sintetizados por las algas son de gran interés y presentan un amplio rango de aplicabilidad en diversos campos de la ciencia, especialmente en el campo de la medicina, la agricultura y la ingeniería. La increíble diversidad de estructuras químicas que son capaces de producir las algas marinas, varían dependiendo de la especie, el hábitat, la época y las presiones ecológicas a las que están sometidos estos organismos (67). Para determinar los constituyentes biológicamente activos del alga *C. racemosa*, se realizó un estudio químico preliminar, para determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en esta especie, ya que la síntesis de estos compuestos está relacionada con actividades biológicas específicas en el medio marino donde habitan (60).

El análisis fitoquímico preliminar, fue realizado a cada uno de los extractos crudos EP, EAE y EM, tal como se muestra en la Tabla 3. Estos resultados demostraron que el alga *C. racemosa* es capaz de biosintetizar los productos naturales: alcaloides, glicósidos cardiotónicos, cumarinas, polifenoles y esteroles insaturados; mostrándose la presencia de cumarinas en todos los extractos, alcaloides en el extracto etéreo y metanólico, esteroles insaturados en los extractos éter de petróleo y acetato de etilo; mientras que los polifenoles y glicósidos cardiotónicos solo se detectaron en el extracto acetato de etilo.

El extracto que presentó la mayor cantidad de metabolitos fue el EAE con un 30,77%; seguido del EEP con 23,08% y por último EM con un 15,38%.

Tabla 3. Grupos de metabolitos secundarios determinados en cada uno de los extractos crudos del alga *C. racemosa*.

Metabolitos secundarios	EEP	EAE	EM	%MPA
Alcaloides	+	-	+	66,67
Metilencetonas	-	-	-	0
Glicósidos cardiotónicos	-	+	-	33,33
Saponinas	-	-	-	0
Polifenoles	-	+	-	33,33
Taninos	-	-	-	0
Esteroles insaturados	+	+	-	66,67
Triterpenos pentacíclicos	-	-	-	0
Antraquinonas	-	-	-	0
Flavonoides	-	-	-	0
Fenilpropanoides	-	-	-	0
Cumarinas	+	+	+	100
Glicósidos cianogénicos	-	-	-	0
%MPE	23,08	30,77	15,38	

(+) Presencia (-) Ausencia %MPA: porcentaje de metabolitos presentes en el alga; %MPE: porcentaje de metabolitos presente en cada extracto.

Las cumarinas fue el grupo de metabolitos más abundante en los tres extractos probados, lo que representa el 100% del porcentaje de metabolitos presentes en el alga *C. racemosa* (%MPA). Para detectar la presencia de cumarinas en cada uno de los extractos, se tomó en consideración el hecho de que las cumarinas poseen un gran

número de insaturaciones en su estructura química, por lo tanto, al ser irradiados con la luz UV, exhiben fluorescencia azul o verde (68).

Las cumarinas son compuestos derivados de las benzo- α -pironas o α -cromonas, por lo tanto, poseen el mismo esqueleto carbonado de los ácidos cinámicos. En general, son lactonas insaturadas que comprenden la clase C_6C_3 , prácticamente todas las cumarinas, a excepción de la cumarina propiamente dicha, poseen un sustituyente oxigenado en la posición 7, ya sea hidroxilado o combinado (metilo, azúcares, etc). Estas sustancias se clasifican como cumarinas simples que poseen sustituciones en las posiciones 6,7 y 8 del núcleo bencénico y cumarinas complejas que tienen un anillo furano unido a la posición 6,7 o 7,8 (furanocumarinas), o un anillo pirona que puede estar unido a distintas posiciones del anillo cumarínico: 6,7; 5,6 ó 7,8 (piranocumarinas) (60, 69, 70).

Las cumarinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y muy pocas han sido halladas en los microorganismos (60,71). La acumulación de cumarinas en las algas marinas juega un papel importante en la fotoprotección contra los rayos UV (72). En las algas verdes del género *Caulerpa* y *Dasycladus* se aisló e identificó la cumarina 3, 6, 7-trihidroxycumarin, la cual fue la responsable de la alta absorción observada contra los rayos UVA (72). Estos compuestos presentan un amplio rango de actividades farmacológicas entre las que se destacan: su actividad anticoagulante, antitumoral, antimicrobiana, fotosensibilizante cutánea, su efecto tónico venoso, vasodilatadora coronaria, actividad antiespasmódica, antiinflamatoria y analgésica e hipotérmica (60,71).

En la Tabla 3 se puede observar que los alcaloides fue el segundo grupo de metabolito secundario con mayor presencia en el alga, resultando positiva en el extracto etéreo y en el extracto metanólico con un 66,67% MPA. Los alcaloides son sustancias orgánicas que se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y comprende una familia de más de 15 000 metabolitos secundarios (69).

Aunque muy pocos alcaloides han sido aislados en algas marinas en comparación a la cantidad de estudios realizados en plantas terrestres, se puede

mencionar: la β /2- feniletilamina identificada en algunas algas pardas y rojas, las cuales actúan en el cerebro humano como neuromodulador y neurotransmisor; la dopamina que fue aislada por primera vez en el alga verde *Monostroma fuscum*; y la caulerpina que ha sido identificada en variadas especies de algas verdes y rojas, siendo mayormente encontrada en las algas del género *Caulerpa* (52).

Los alcaloides suelen tener en común las siguientes características: son solubles en agua, poseen estructuras moleculares complejas y contienen al menos un nitrógeno, y exhiben una importante actividad biológica. En general, los alcaloides son heterocíclicos, pero se pueden encontrar compuestos nitrogenados alifáticos (69). La mayoría de los alcaloides con excepción de los alcaloides de amonio cuaternario y n-óxidos de aminas, son solubles en solventes orgánicos de baja polaridad como cloroformo, pero pueden formar sales solubles en agua en presencia de ácidos minerales diluidos, como el HCl al 10% (68). Los compuestos cíclicos halogenados que contienen nitrógeno en su estructura, son incluidos en el término de alcaloides, los cuales son específicos de los organismos marinos y algas marinas (52).

Al realizar la prueba de esteroides y triterpenos pentacíclicos con el reactivo de Liebermann-Burchard, se observó la formación de una coloración verde en la solución, lo que determinó la presencia de esteroides insaturados en los extractos EEP y EAE, lo cual corresponde al 66,67% MPA. Los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40 000 moléculas diferentes (69).

A diferencia de las especies terrestres, los organismos marinos contienen frecuentemente mezcla de esteroides más complejas; mientras que las plantas poseen esteroides monohidroxi, los esteroides marinos pueden tomar una gran variedad de sustituciones y rearrreglos, encontrándose esteroides con 9 grupos hidroxilos, tal como es en el caso de los equinodermos y otra gran variedad de esteroides en esponjas, gorgonios, tunicados, moluscos, corales, dinoflagelados, celenterados y anélidos (73). Aunque solo se detectó esteroides insaturados en los extractos EEP y EAE, no se puede descartar la presencia de otro grupo de terpenos en esta especie, ya que las

macroalgas suelen producir sustancias como monoterpenos (bromo-lactonas halogenadas), diterpenos (acetoxicrenulatin), sequiterpenos (caulerpenina) y carotenoides de gran importancia (74).

Los terpenos suelen ser insolubles en agua y todos ellos derivan de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C); por tal motivo, los terpenos se clasifican de acuerdo a la cantidad de moléculas de isoprenos presentes en la estructura. En el grupo de los terpenos se incluyen a las hormonas, pigmentos carotenoides, esteroides, derivados de los esteroides, látex y los aceites esenciales (71). Los esteroides son 3 β -hidroxiesteroides cristalinos que contienen una cadena lateral alifática, y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal. Se les encuentra en formas libres como esterificados con ácidos alifáticos o como glicósidos. Estos compuestos son de naturaleza lipídica, por lo tanto son insolubles en solventes polares (60, 71).

Los polifenoles fueron unos de los grupos de metabolitos secundarios que presentaron el menor porcentaje de metabolitos en el alga (33,34% MPA), siendo detectados solo en el EAE. La producción de compuestos polifenólicos en las algas marinas, es asociada al estrés oxidativo y a las intensas radiaciones UV a las cuales se encuentran sometidos estos organismos. En diferentes especies y géneros de algas marinas se ha encontrado la presencia de flavonoides, bromofenoles, florotaninos, y ácidos fenólicos y cinámicos (75).

Los polifenoles constituyen uno de los grupos más numerosos y representativos en las plantas, participan en la fisiología y metabolismo celular en la morfología, el crecimiento, reproducción, defensa contra plagas y predadores y procesos germinativos, entre otros; además, se ha demostrado que estos compuestos poseen una significativa actividad antioxidante, lo que genera beneficios para la salud humana (76). Estos compuestos tienen en su estructura un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Suelen unirse a azúcares para formar heterósidos, pero también, se pueden encontrar en forma libre, desde sustancias muy simples hasta muy complejas como las ligninas y taninos (77).

En las algas marinas se han identificado una gran variedad de estructuras químicas como proteínas, cumarinas, terpenoides, santonas, alcaloides, polifenoles, flavonoides y polisacáridos producidos por estas especies (78). Dentro de los estudios realizados en la detección de metabolitos secundarios en algas marinas, se puede mencionar: el del alga roja *Glacilaria blodgettii*, donde el estudio fitoquímico del alga mostró la presencia de triterpenos y/o esteroides, compuestos fenólicos y/o taninos, lactonas y saponinas (79). En el alga verde *Tydemania expeditions*, las pruebas químicas resultaron positivas para triterpenos y/o esteroides, saponinas y compuestos fenólicos, y en la especie *C. racemosa* proveniente de la India presentó los metabolitos secundarios polifenoles, flavonoides, alcaloides y esteroides (80,81). El resultado del estudio fitoquímico de esta última especie, coincide con el análisis de metabolitos secundarios realizado en el alga *C. racemosa*; sin embargo, la prueba para la detección de flavonoides no fue positiva en esta alga proveniente de las costas venezolanas.

Aunque las pruebas realizadas no evidenciaron la presencia de los metabolitos: metilencetonas, saponinas, taninos, triterpenos pentacíclicos, antraquinonas, flavonoides, fenilpropanoides y glicósidos cianogénicos en los extractos crudos ensayados, no se puede descartar su presencia, ya que las algas suelen sintetizar metabolitos secundarios lipofílicos no polares a altas concentraciones como compuestos de biosíntesis mixtas en bajas concentraciones (82). Tal como es el caso de los glicósidos cardiotónicos y los polifenoles, que se detectaron en un solo extracto del alga *C. racemosa*. Además, hay que resaltar que la determinación de metabolitos secundarios, se puede ver afectada por la realización de una prueba química no adecuada.

3. Actividad biológica de los extractos del alga *C. racemosa*

Las algas marinas están sujetas a condiciones ambientales completamente distintas a las presentes en los ambientes terrestres, éstas determinan que las rutas biosintéticas sean completamente diferentes. Por esta razón, las algas marinas suelen

producir interesantes e inusuales sustancias químicas, cuya función juega un papel importante en las interacciones inter e intra específicas con otros organismos. Por tal motivo, se infiere que estas especies son una rica fuente de compuestos potencialmente útiles para el control de múltiples enfermedades que afectan a los seres humanos (31,83).

Uno de los aspectos más importantes en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, es la detección y la cuantificación de la actividad biológica para la valoración de los productos naturales, mediante el empleo de ensayos biológicos (84). Como respuesta a la necesidad de realizar ensayos con los que se pueda detectar un amplio espectro de actividades, se han implementado pruebas que requieren pequeñas cantidades de muestras y que permiten la evaluación rápida de los extractos crudos y fracciones, además de no requerir el empleo de tecnologías sofisticadas y que puedan ser realizadas a muy bajos costos. Estas pruebas son de gran importancia para la estimación preliminar de la bioactividad de los extractos, fracciones y/o compuestos puros (84,85).

3.1 Actividad tóxica de los extractos frente al crustáceo *Artemia salina*

En la búsqueda de nuevos compuestos activos con actividades farmacológicas específicas, como por ejemplo antitumorales; suelen emplearse bioensayos para la detección preliminar de la actividad antineoplásica de ciertos extractos de organismos terrestres y marinos. Dentro de estos bioensayos, suelen emplearse organismos como las artemias, para evaluar la actividad tóxica de los extractos, fracción y/o compuestos puros a estudiar (84).

Las artemias son consideradas una herramienta útil para predecir actividades antitumorales, ya que este estudio tiene una correlación positiva entre la mortalidad de los nauplios de *A. salina* con la citotoxicidad frente a las células 9 KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (leucemia *in vivo*). Además, son empleados para medir actividades plaguicidas; ya que estos crustáceos son muy sensibles a un amplio rango de compuestos químicos y de diversos fármacos. Para el

estudio preliminar de la actividad tóxica de los extractos (bioensayo *in vivo*) se empleó el organismo *Artemia salina*, en donde se determinó la cantidad de organismos muertos con respecto a una población control, que generalmente se expresa como CL₅₀ (concentración que causa la muerte del 50% de los organismos expuestos a la sustancia) (84,85).

El valor del CL₅₀ se encuentra dividida en 3 categorías: CL₅₀ > 1 000 µg·ml⁻¹ es no activo, entre 30-1000 µg·ml⁻¹ son considerados como activos y CL₅₀ < 30 µg·ml⁻¹ son compuestos muy activos (86). Al evaluar la actividad letal de los 3 extractos crudos del alga *C. racemosa*, no se obtuvo actividad tóxica en ninguno de los extractos luego de las 24 horas de exposición, ya que no se observó mortalidad de los nauplios de *A. salina*. Después de transcurridas las 48 horas de estar en contacto las artemias con los extractos ensayados, se observó un leve incremento en la cantidad de organismos muertos en el extracto metanólico, en comparación con las 24 horas, considerándose este extracto no letal a las 48 horas, ya que presentó un valor de CL₅₀ por encima de 1 000 µg·ml⁻¹.

Estos resultados son similares, con el estudio de la actividad citotóxica de algunas algas verdes provenientes de la India, donde el extracto metanólico del alga *C. racemosa* no mostró actividad letal frente al crustáceo *A. salina*; sin embargo, en este mismo estudio las algas *C. perlata* y *C. taxifolia* pertenecientes al mismo género, si presentaron actividad tóxica (87). No obstante, otros estudios reportan la actividad tóxica del alga *C. racemosa* contra este crustáceo; así, en un estudio de algas provenientes de Egipto, la especie *C. racemosa* mostró un valor de CL₅₀ igual a 1000 µg·ml⁻¹ (88), así mismo ésta alga proveniente de la costa oeste de la India se reportó un CL₅₀ < 250 µg·ml⁻¹ (89), y al estudiar la bioactividad de algas provenientes de Pakistán, el extracto etanólico de *C. racemosa* presentó un CL₅₀ igual a 929 µg·ml⁻¹ (90).

Las diferentes actividades tóxicas mostradas por el alga verde, pueden estar afectadas por el método de extracción, el cual influye en la actividad natural de los compuestos químicos, la concentración de los compuestos activos del alga, ya que

estos varían de un ecosistema a otro, y a las poblaciones de depredadores, que pueden ser los responsables de la producción de ciertos metabolitos (91). Estos factores hacen que el contenido químico de las algas varíe dependiendo de cuando y donde son recolectadas (26). La ausencia de actividad letal en los extractos ensayados pudo ser originada por el efecto sinérgico y/o antagónico total de la mezcla de compuestos químicos presentes en cada uno de los extractos, que no permitió exhibir su actividad tóxica individual. Por lo tanto, no se puede descartar la presencia de compuestos con actividades antitumorales y/o plaguicidas, ya que sería necesario realizar otros bioensayos más precisos para confirmar o descartar esta actividad.

3.2 Actividad antibacteriana de los extractos de *C. racemosa*

Las pruebas de susceptibilidad están indicadas para cualquier organismo que contribuya a un proceso infeccioso, pero frecuentemente suelen emplearse cuando se presume que un organismo pertenece a una especie capaz de exhibir resistencia a los agentes antimicrobianos comunes. Son variados los métodos que pueden ser usados para medir la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos frente a agentes antimicrobianos; sin embargo, en muchos laboratorios, el método de difusión en agar es usado rutinariamente por ser el más común, rápido y acertado para el control de bacterias patógenas (92).

Para la interpretación de los resultados respecto a la actividad antibacteriana de los extractos, se siguió el procedimiento en el cual se establecen las siguientes categorías interpretativas para los diámetros de las zonas de inhibición para bacterias: - no hay actividad; + actividad leve o débil (diámetro entre 7-11 mm); ++ actividad moderada (diámetro entre 11-16) y +++ actividad fuerte (diámetro mayor a 16 mm) (93).

Tal como se muestra en la Tabla 4, los extractos EEP y EAE inhibieron débilmente el crecimiento de algunas de las especies de bacterias empleadas, mientras que el EM no presentó actividad. El extracto EEP presentó un espectro más amplio de acción con relación al extracto EAE, inhibiendo las bacterias Gram positivas

Micrococcus luteus y *Bacillus subtilis*, y las bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia sp.*; y el extracto EAE solo exhibió actividad antibacteriana contra la cepa Gram negativa *Acinetobacter calcoaceticus*. Estos resultados permiten afirmar que la especie *C. racemosa* es capaz de sintetizar compuestos bioactivos con efecto antibacteriano.

Tabla 4. Actividad antibacteriana mostrada por cada uno de los extractos.

Bacterias	EEP	EAE	EM
<i>Micrococcus luteus</i>	9	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	7	-	-
<i>Staphylococcus aureus subsp aureus</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	-	-
<i>Yersinia sp.</i>	7	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	7	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-

(+++) Actividad fuerte (diámetro del halo > 16 mm); (++) Actividad moderada (diámetro del halo entre 11-16 mm); (+) Actividad débil (diámetro del halo entre 7-11 mm); (-) inactivo; Diámetro del disco: 10 mm; Concentración: 40 mg·ml⁻¹; Discos dosificados con 25 µl.

El análisis de metabolitos realizado para cada uno de los extractos, mostró que el EAE presentó la mayor cantidad de metabolitos; sin embargo este solo fue activo contra una sola cepa bacteriana; el extracto etéreo que presentó la segunda posición con mejor cantidad de metabolitos, exhibió una mayor actividad antibacteriana. La actividad biológica mostrada por el EEP y EAE del alga *C. racemosa* (Tabla 5), coincide con lo reportado en otras investigaciones, donde se demuestra que los extractos de menor polaridad de las algas marinas exhiben una actividad más eficaz en la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias (27, 94-96). Los extractos liposolubles de macroalgas marinas han sido ampliamente investigados como fuentes de sustancias con actividad farmacológica, en donde se resalta la gran actividad

contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; y la Gram positiva *Staphylococcus aureus* (96).

En este sentido, algunas investigaciones realizadas en la búsqueda de moléculas con potencial antibacteriano, señalan que las algas del género *Caulerpa* poseen actividad antimicrobial, así, se puede señalar, que los extractos de la especie *C. racemosa* proveniente de la India, son activos frente a la gran mayoría de las bacterias ensayadas con halos de inhibición entre 12-16 mm, con excepción de *Escherichia coli* que fue resistente a los extractos probados (97). En otro estudio, la especie *C. racemosa* presentó actividad antibacteriana frente a las bacterias *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* (halos de inhibición entre 2-5 mm), siendo los extractos acetato de etilo y metanol activos contra todas las bacterias ensayadas (98).

Así mismo, a excepción de *Caulerpa sp.*, las especies *C. spp.* y *C. mexicana* provenientes de la costa de Falcón, mostraron halos de inhibición entre 1-3 mm, en el crecimiento de las bacterias *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *S. aureus* (96). Algunos de los resultados descritos anteriormente, con respecto a la actividad antibacteriana del alga *C. racemosa*, concuerdan con los obtenidos por otros autores. En este sentido, *C. racemosa* fue activa frente a *B. subtilis*, *P. aeruginosa*; a pesar de que otras investigaciones resaltan la actividad de los extractos de las algas del género *Caulerpa* en las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, en los extractos evaluados no se observó actividad en estos microorganismos.

Los resultados sobre la actividad antibacteriana de los extractos del alga *C. racemosa*, pueden estar relacionados con la naturaleza de los microorganismos, la presencia de más de un compuesto activo y efectos antagónicos o sinérgicos (99). No obstante, es importante señalar que la producción de metabolitos secundarios en los organismos marinos es muy variable, ya que muchos organismos modifican sus niveles de metabolitos secundarios de acuerdo a las interacciones químicas entre ellos, a las que no solo se les atribuye la defensa química frente a sus depredadores y a los factores físicos, sino también a la disminución de epibiontes y de los

competidores (100).

El potencial bactericida y/o bacteriostático de las algas ha sido asociado a su capacidad de sintetizar diterpenos, terpenos halogenados, alcaloides, bromofenoles y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático (100). En las algas del género *Caulerpa* su actividad antibacteriana ha sido asociada a los compuestos caulerpina y caulerpicina presentes en esta especie (96). Los cinco diferentes mecanismos de acción, por los cuales los metabolitos secundarios presentes en los extractos pudieron inhibir el crecimiento bacteriano, son bien conocidos: inhibición de la síntesis de la pared celular, interrupción del metabolismo de ADN, inhibición de la síntesis de proteínas, alteración de la permeabilidad de la membrana celular e inhibición del metabolismo celular (73).

La aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a los antibióticos tradicionales, constituye un serio problema a escala mundial, lo que ha conducido a la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad antibacteriana. Los resultados demostraron la capacidad de esta alga, de sintetizar sustancias bioactivas con efectos antibacterianos, por lo cual resultó prometedor continuar con su estudio químico para aislar y caracterizar en lo posible, los principios activos responsables de la actividad antibacteriana observada.

3.3 Citotoxicidad de los extractos de *C. racemosa* frente a los huevos del erizo de mar *Echinometra lucunter*.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas, que conlleva a un daño que puede ser detectado. A partir de aquí, muchos investigadores han desarrollado diferentes pruebas *in vitro*, para predecir los efectos tóxicos originados por las drogas y compuestos químicos (101). Entre los bioensayos embrio-larvarios más utilizados se encuentran los realizados con erizos de mar (102).

La prueba de citotoxicidad en huevos fecundados de erizos de mar ha sido utilizada ampliamente por biólogos y bioquímicos debido a la simplicidad y tamaño

de las células, característica que permite fácilmente visualizar tanto resultados sencillos de división celular como aquellos que incluyen un fuerte componente molecular. Los gametos de erizo de mar pueden ser utilizados con mayor frecuencia por cuanto no requieren de técnicas sofisticadas de obtención, mantenimiento y observación, y son lo suficientemente sensibles para identificar actividad positiva o negativa con claridad, igualmente para distinguir los efectos citotóxicos y antimitóticos causados por los compuestos. También, es un ensayo adecuado para el estudio de la acción de fármacos, ya que los embriones son expuestos a éstos durante los mismos estados del ciclo celular, lográndose de esta forma un alto grado de reproducibilidad, así como de uniformidad (103).

La actividad citotóxica de los extractos del alga *C. racemosa* frente a los huevos del erizo de mar *Echinometra lucunter*, fue evaluada desde la formación del cigoto hasta su desarrollo a blástula (Fig. 15). Inicialmente, se observaron los óvulos y los espermatozoides del erizo antes y después de colocar en contacto ambos gametos, para estimar la viabilidad del bioensayo. La capacidad de fecundación de los gametos del erizo de mar antes de ser expuesto a los extractos (control), fue alrededor de un 99%; demostrando así la confiabilidad de la fertilidad *in vitro*, ya que se alcanzó un porcentaje de fecundación ideal (mayor al 90%).

Los tres extractos ensayados (EEP, EAE y EM) del alga *C. racemosa*, permitieron la formación de la membrana de fecundación en un 95%, por lo tanto, estos extractos no mostraron inhibición en la fecundación del huevo del erizo de mar *E. lucunter*. En los procesos de segmentación del cigoto, luego de ser expuesto a los extractos, se pudieron observar malformaciones y divisiones mitóticas incompletas de gran importancia en el desarrollo embrionario del erizo de mar *E. lucunter*, el cual se realizó por comparación con los estadios normales del desarrollo observado en los controles con DMSO (solvente) y sin el solvente.

Los efectos citotóxicos mostrados por los extractos EEP, EAE y EM del alga, se visualizaron en todas las concentraciones desde 500 hasta 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Fig. 16); donde se observaron muy pocas células con blastómeras pareadas (blastómeras de

diferentes tamaños), células con diferentes densidades ópticas (indicando diferentes actividades fisiológicas), células con divisiones mitóticas alteradas y rotura de la membrana de fecundación (lisis celular), lo que permitió el vaciado citoplasmático.

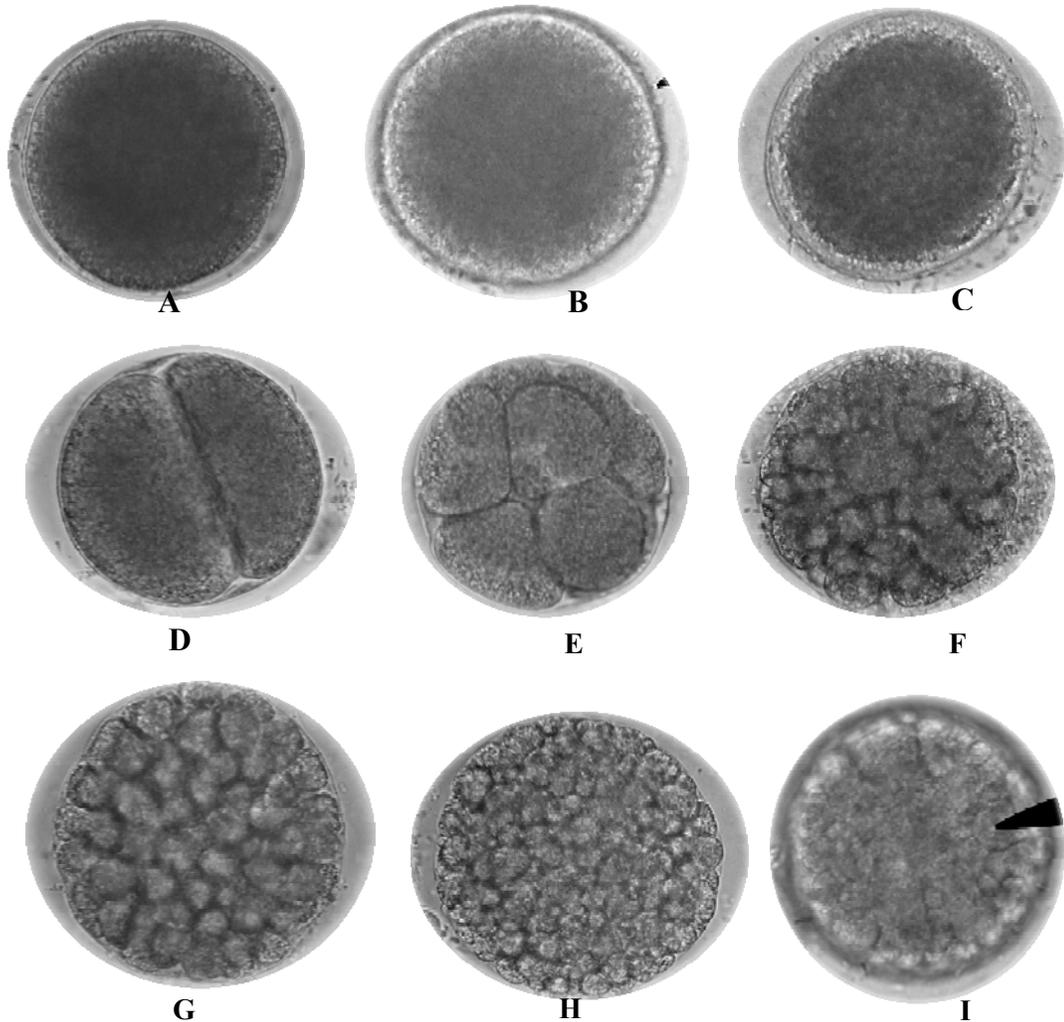


Figura 15. Desarrollo embrionario del erizo de mar *Echinometra lucunter*. Control del bioensayo de citotoxicidad. **A-C**: secuencia de fertilización para la formación del cigoto. Estados del desarrollo embrionario: **D**: segmentación del núcleo en 2 blastómeros; **E**: formación de 8 blastómeros; **F**: célula dividida en 32 blastómeros; **G**: huevo dividido en 64 blastómeros; **H**: mórula; **I**: blástula.

De los tres extractos probados, solo en dos de ellos se observaron mayor

cantidad de anomalías en la división celular del erizo en las diferentes concentraciones ensayadas, presentando un 50% para el EAE y un 70% en el EEP. La actividad citotóxica observada de los extractos en los huevos del erizo, pudo ser originada por la acción conjunta (efecto sinérgico) de los compuestos químicos presentes en cada uno de los extractos ensayados.

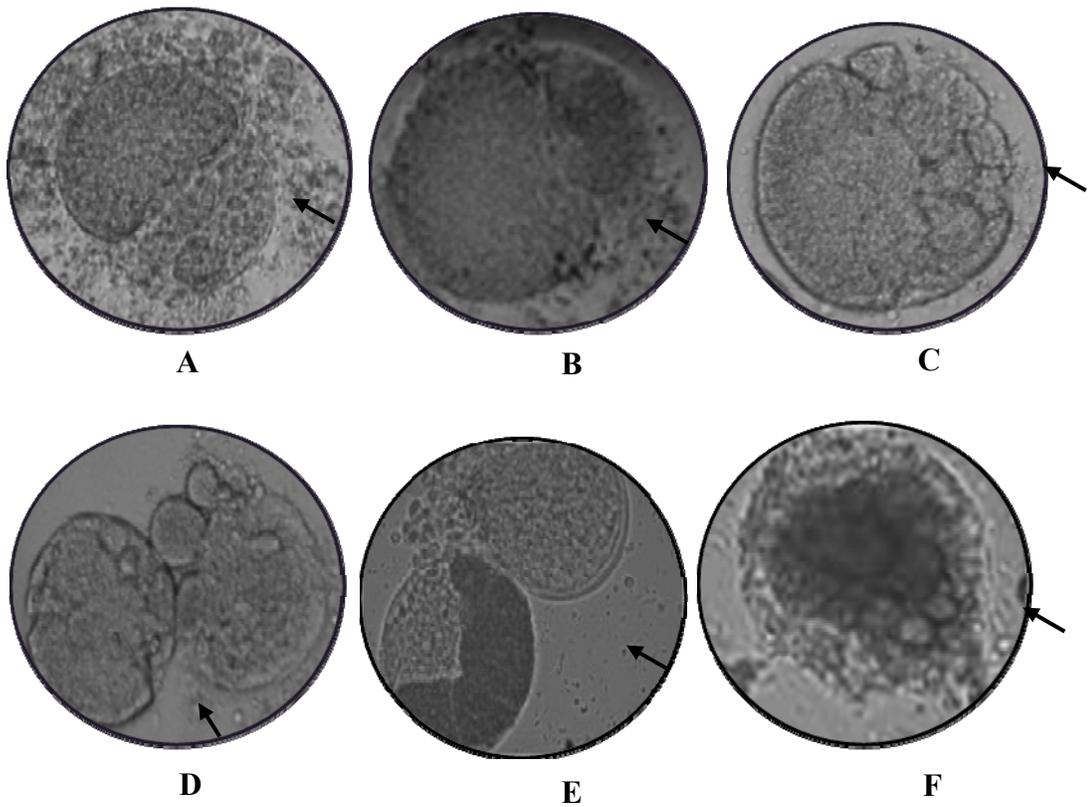


Figura 16. Efectos citotóxicos de los extractos EEP, EAE, EM (concentraciones desde 500 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de *C. racemosa*, en el desarrollo embrionario de *E. lucunter*. **A**: blastómeros con diferentes densidades ópticas; **B**: desincronización en la división celular; **C** y **D**: divisiones mitóticas alteradas; **E** y **F**: fragmentación de la membrana celular y pérdida del material citoplasmático (lisis celular).

Los resultados de citotoxicidad mostrado por los extractos del alga *C. racemosa*, concuerda con los reportados por algunos autores con relación a la actividad citotóxica del alga *Caulerpa taxifolia*, donde se señala que la caulerpenina

aislada de esta alga (metabolito secundario sintetizado por algunas algas del género *Caulerpa*) no tuvo efecto en la fertilización del huevo del erizo *Paracentrotus lividus*, pero se observaron inhibiciones y alteraciones en la división celular del erizo (104). Así mismo, otro estudio realizado a la misma especie, señala que el sequisterpeno [6] (compuesto aislado de *C. taxifolia*) parece alterar algunos eventos citológicos en el desarrollo embrionario del erizo de mar y que dichas alteraciones están relacionadas con la concentración de este compuesto en el alga (105). Además, el compuesto [6] no solo ha mostrado efectos citotóxicos en los diferentes estadios del desarrollo embrionario de los erizos de mar, sino también efectos citotóxicos en células de mamíferos y diferentes líneas celulares (106,107).

La evolución de los organismos marinos, se ha dirigido hacia la producción de compuestos citotóxicos para defenderse de sus predadores o de infecciones, por lo que pueden constituir una fuente muy importante de nuevos antitumorales; en este sentido, se ha encontrado que diferentes especies de algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad antitumoral (13). Un polisacárido sulfatado purificado del alga *C. racemosa* mostró actividad *in vitro* contra el virus herpes simple tipo 1 y 2 (108); además, los extractos y la caulerpenina aislada del alga *C. racemosa* var. *cylindracea*, mostró actividad antiproliferativa y efectos apoptóticos sobre dos líneas celulares de neuroblastomas [SH-SY5Y y Kelly] (109).

Al evaluar la actividad citotóxica y antiproliferativa de 27 macroalgas provenientes de Yucatán, México, los resultados demostraron que la mayoría de las especies pertenecientes a la división Chlorophyta fueron las que presentaron la mayor cantidad de extractos citotóxicos, siendo las especies *Udotea flabellum* y *Udotea conglutinata* las que mostraron mayor actividad citotóxica selectiva (con valores de CC_{50} iguales a 0,23 y 10,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente) sobre todas las líneas celulares tumorales [células normales de riñón caninino (MDCK), células de carcinoma humano laríngeo (Hep-2), células de adenocarcinoma humano de la cervix (HeLa) y células de carcinoma humanonasofaríngeo (KB)] (13).

Diferentes investigaciones realizadas a extractos de algas marinas, demuestran

que estas especies son una fuente prometedora de compuestos para el tratamiento del cáncer (13). Por lo tanto, la actividad biológica observada en el alga *C. racemosa*, la convierte en una especie interesante para continuar con estudios en la búsqueda de nuevas posibilidades quimioterapéuticas.

4. Fraccionamiento cromatográfico de los extractos

La separación de los principales constituyentes químicos presentes en cada uno de los extractos crudos, fue llevada a cabo tomando en consideración, la cantidad de muestra obtenida y la actividad biológica ejercida por cada uno de los extractos sobre a los diferentes organismos ensayados. Los resultados de los distintos criterios descritos anteriormente, permitieron seleccionar los extractos EEP y EAE para realizarles fraccionamiento cromatográfico, ya que fueron activos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, y presentaron actividad citotóxica frente a los huevos del erizo de mar *E. lucunter*. Estos resultados demuestran, la capacidad que tiene la especie *Caulerpa racemosa* de sintetizar compuestos bioactivos; por lo tanto, es de suma importancia determinar en lo posible las sustancias responsables de la actividad biológica observada.

4.1 Aislamiento y análisis de los principales constituyentes químicos del extracto obtenido en éter de petróleo

El fraccionamiento cromatográfico del extracto obtenido en éter de petróleo, se llevó a cabo por cromatografía de columna (CC), utilizando una columna de vidrio de dimensiones 42 cm de largo y 2 cm de diámetro, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh (fase estacionaria). Se emplearon 2,20 g de EEP y 110,00 g de sílica gel en una relación de muestra: sílica de 1:50.

Para dar inicio al fraccionamiento cromatográfico se usó éter de petróleo (EP) al 100% para empaquetar y estabilizar el absorbente de relleno de la columna, posteriormente se emplearon como eluyentes, mezclas de solventes de polaridad ascendente, en diferentes proporciones de volúmenes EP-CHCl₃, CHCl₃, CHCl₃-

AcOEt, AcOEt, AcOEt-CH₃OH y CH₃OH (fase móvil). En esta cromatografía se obtuvieron 52 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 75 ml en erlenmeyers de 125 ml de capacidad para cada eluato (Tabla 5). El comportamiento de cada uno de los eluatos, se analizó por cromatografía de capa fina analítica (CCFA) y para ello se emplearon placas de vidrios de (20 × 20 cm²) recubiertas con sílica gel de 60 mesh con 0,5 mm de espesor, usando como eluyentes los mismos solventes utilizados en la cromatografía de columna. Como reveladores, se utilizaron una solución ácida de molibdato de amonio y una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (100 a 280 nm).

Los eluatos que presentaron valores similares en sus R_f fueron unidos en una sola fracción, obteniéndose 15 fracciones en esta cromatografía (Tabla 6). La cantidad de muestra orgánica recuperada después del fraccionamiento de sus compuestos químicos, fue de 2,04 g, lo que corresponde a un 92,72% de rendimiento.

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del EEP de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-3
EP-CHCl ₃	70-30	4-6
EP-CHCl ₃	50-50	7-28
CHCl ₃	100	29-33
CHCl ₃ -AcOEt	50-50	34-39
AcOEt	100	40-43
AcOEt-CH ₃ OH	50-50	44-49
CH ₃ OH	100	50-52

Las fracciones resultantes en esta cromatografía, fueron analizadas por CCFA para observar el comportamiento de los componentes químicos presentes en cada fracción, para continuar posteriormente, con la separación y elucidación de los principales metabolitos secundarios.

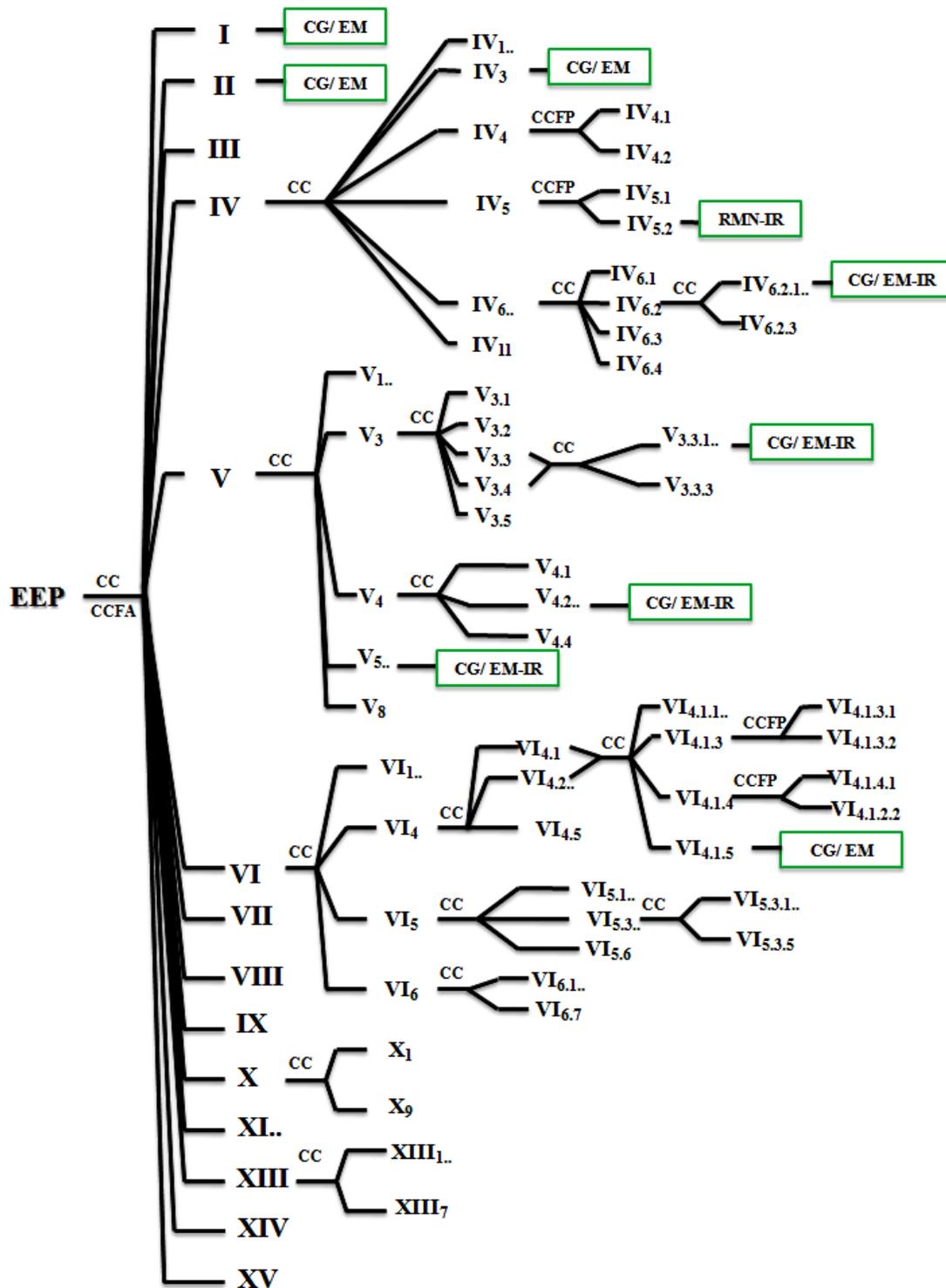


Figura 17. Esquema de fraccionamiento y análisis de los compuestos químicos del extracto obtenido en éter de petróleo del alga *C. racemosa*.

De acuerdo al esquema mostrado en la Fig. 17, las fracciones I y II fueron seleccionadas para ser analizadas, ya que se observaron manchas definidas con valores de R_f distantes, cuyos compuestos podían ser separados e identificados por CG/EM. En cambio, las fracciones IV, V, VI, X, XIII fueron seleccionadas en base a la cantidad de masa obtenida y al comportamiento de los constituyentes separados por CCFA, las cuales mostraron valores de R_f cercanos. Para llevar a cabo un fraccionamiento biodirigido, a estas fracciones se le realizaron pruebas biológicas de actividad tóxica frente a *Artemia salina* y actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Tabla 6. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto en éter de petróleo.

Fracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
I	1-3	6,30	Líquido incoloro viscoso
II	4-6	5,50	Líquido aceitoso amarillo
III	7-10	33,50	Líquido aceitoso amarillo
IV	11-18	590,70	Sólido amarillo pálido
V	19-20	330,00	Sólido naranja
VI	21-23	615,50	Sólido negro
VII	24-28	56,80	Sólido amarillo
VIII	29-33	21,66	Aceite sólido amarillo
IX	34-35	17,60	Aceite sólido marrón claro
X	36-37	176,10	Sólido negro
XI	38-41	24,30	Sólido amarillo claro
XII	42-44	18,30	Sólido marrón claro
XIII	45-47	138,60	Sólido café oscuro
XIV	48-49	3,00	Sólido marrón
XV	50-52	1,50	Sólido marrón

Las fracciones seleccionadas, mostraron actividad antibacteriana moderada

contra las bacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus subsp aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*; a diferencia de la fracción IV que presentó actividad débil contra la bacterias *S. aureus*, y las fracciones V y XIII que inhibieron débilmente el crecimiento de la bacteria *E. faecalis* (Apéndice A, Tabla A1). Los resultados indican que los compuestos contenidos en el EEP poseen actividad contra el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Ninguna de las fracciones mostró actividad tóxica frente al crustáceo a *A. salina*.

4.1.1 Análisis de la fracción I

La fracción I que presentó una apariencia líquida incolora, mostró unas manchas bien definidas con valores de R_f relativamente distantes desde el origen hasta la mitad del recorrido del solvente, observados en la placa de CCFA. Debido a que esta fracción no presentó una masa acorde para seguir con el fraccionamiento cromatográfico, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM). Esta fracción presentó solubilidad en éter de petróleo y cloroformo, cuya característica indico la presencia de sustancias de menor polaridad.

El análisis por CG/EM de la fracción I, mostró la existencia de una serie de compuestos; siendo identificada una mezcla de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados, con un mayor porcentaje de abundancia, tal como se muestra en la Fig. 18. En este cromatograma de gases, aparecen cuatro bandas de mayor intensidad a tiempos de retención aproximados de 12,5; 12,8; 14,6 y 14,8 minutos; los cuales corresponden a los compuestos 8-heptadeceno [pico I], heptadecano [pico II], Z-5 nonadeceno [pico III] y nonadecano [pico IV] (Tabla 7).

Los alcanos y alquenos identificados presentaron un porcentaje de probabilidad entre 95-99%, lo que garantizó la confiabilidad de los compuestos químicos caracterizados.

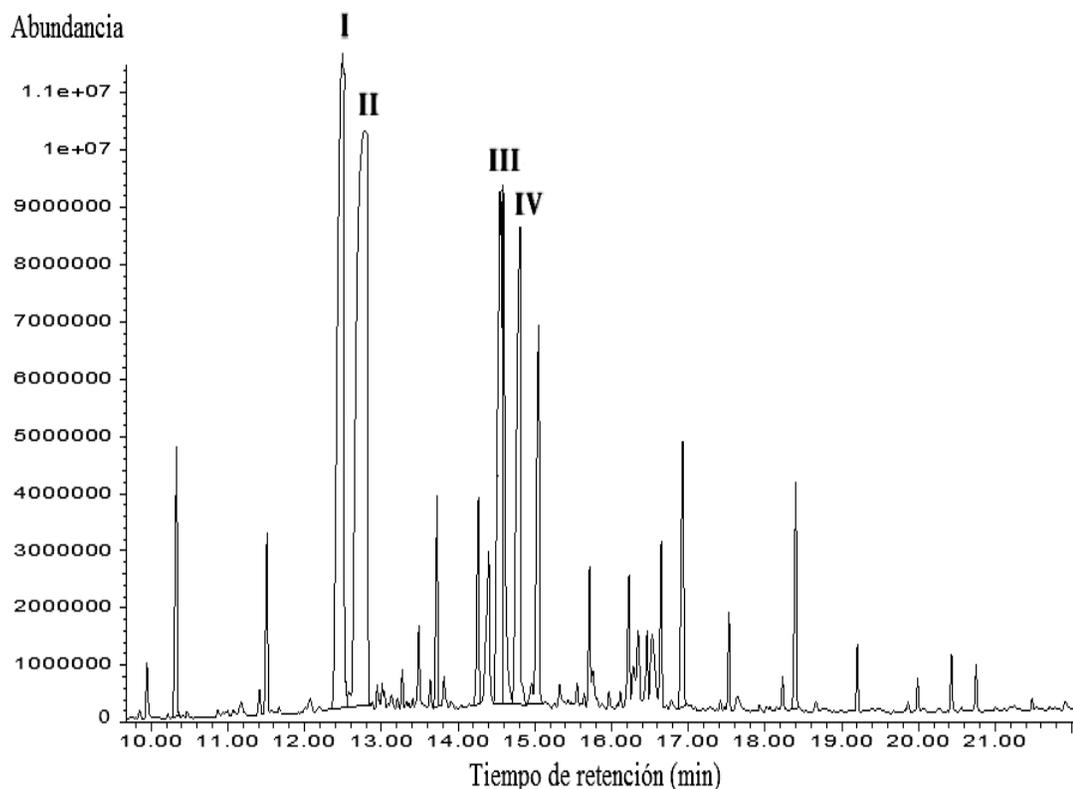


Figura 18. Cromatograma de gases de la fracción I.

Tabla 7. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la fracción I, mediante CG/EM.

Pico	Compuesto Identificado	M ⁺ (m/z)	Tr(min)	% P	% Área
I	8-heptadeceno	238	12,50	98	14,86
II	Heptadecano	240	12,79	95	23,02
III	Z-5-nonadeceno	266	14,56	99	8,15
IV	Nonadecano	268	14,81	98	7,37

Tr (min): Tiempo de retención en minutos; %P: Porcentaje de probabilidad.

El espectro de masas del 8-heptadeceno (Fig. 19), presentó una señal a una relación m/z 238, correspondiente al ión molecular de este alqueno de fórmula C₁₇H₃₄. De igual manera, se observaron las señales de los fragmentos más abundantes a m/z 55 (pico base), 69, 83, 97 y 111 (Fig. 20).

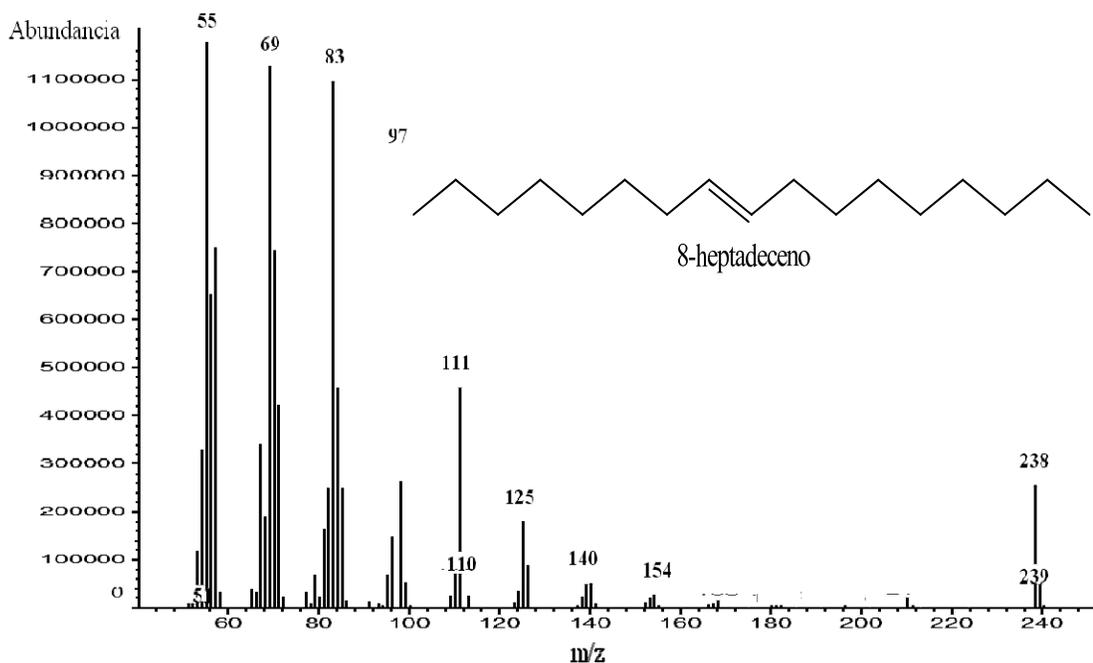


Figura 19. Espectro de masas del 8-heptadeceno.

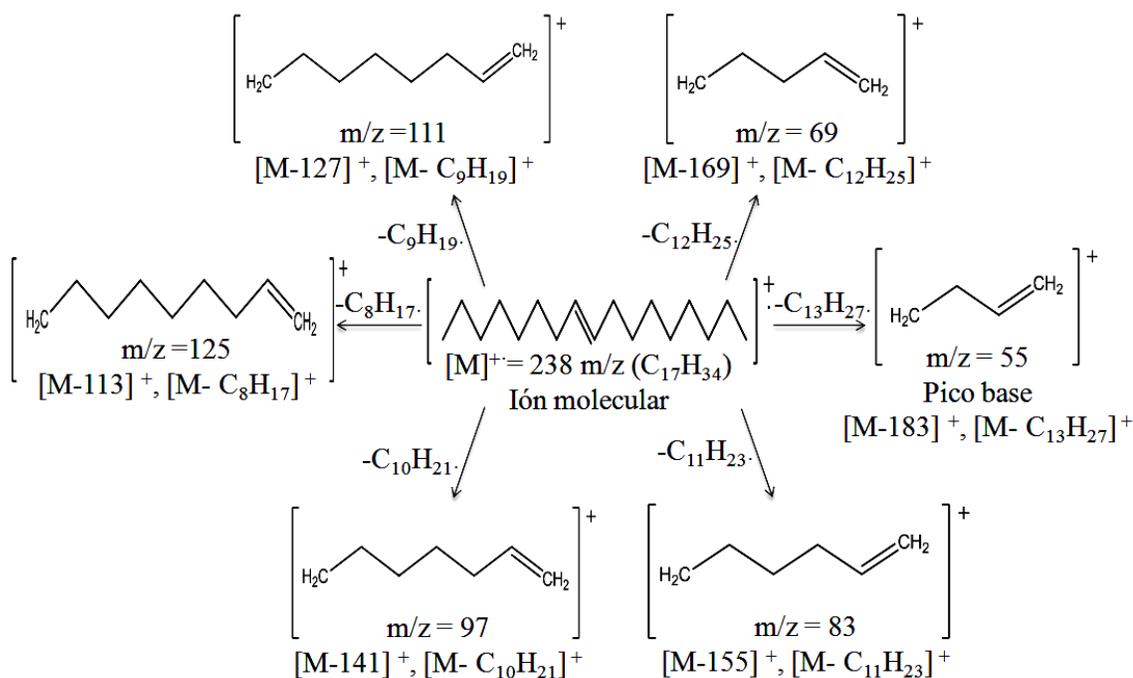


Figura 20. Patrón de fragmentación propuesto para el 8-heptadeceno.
 En el espectro de masas del heptadecano (Fig. 21), se observó la formación

la Fig. 23, donde el pico del ión molecular de este compuesto se observó a una relación m/z 266 ($C_{19}H_{38}$); además, al igual que en el 8-heptadeceno, los fragmentos más abundantes se observaron de a m/z 55 (pico base), 69, 83, 97 y 111 (Fig. 24).

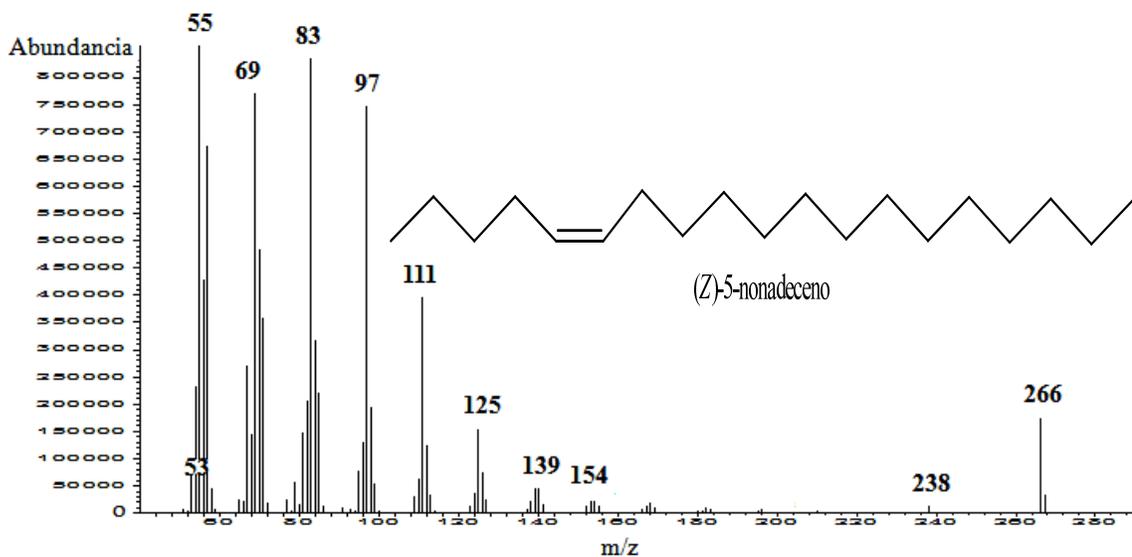


Figura 23. Espectro de masas del Z-5-nonadeceno.

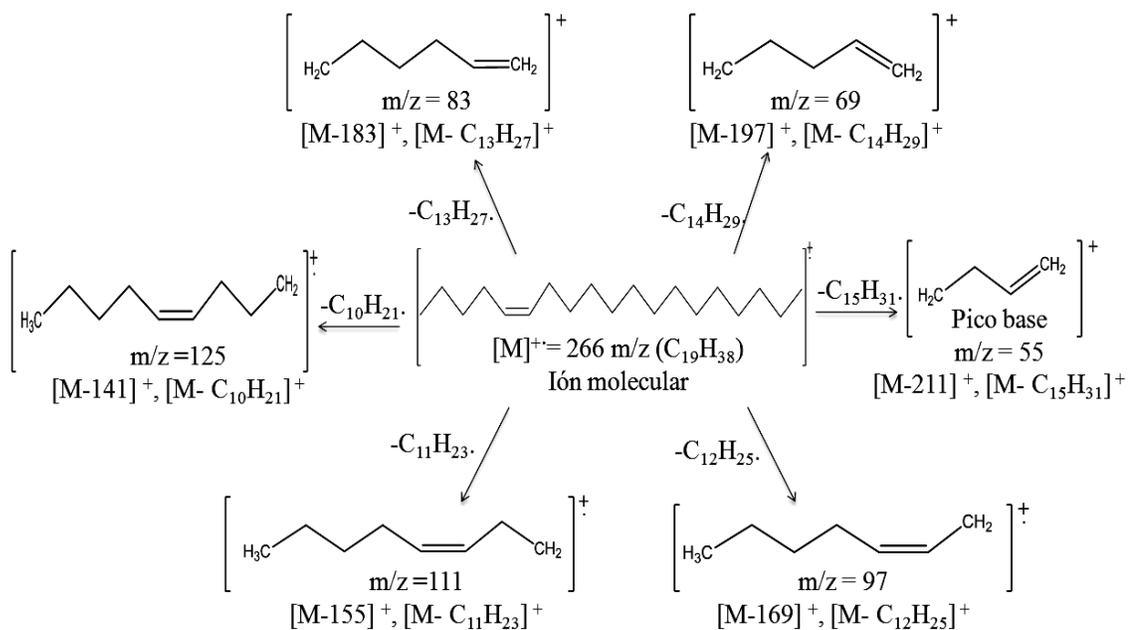


Figura 24. Patrón de fragmentación propuesto para el Z-5-nonadeceno.

El espectro de masas del nonadecano, se muestra en la Fig. 25, donde el ión

molecular $[M^+]$ se visualizó a un m/z 268 de fórmula molecular $C_{19}H_{40}$. Los fragmentos más abundantes de este alcano, fueron observados al igual que en el heptadecano a m/z 57 (pico base), 71, 85, 99 y 113 (Fig. 26).

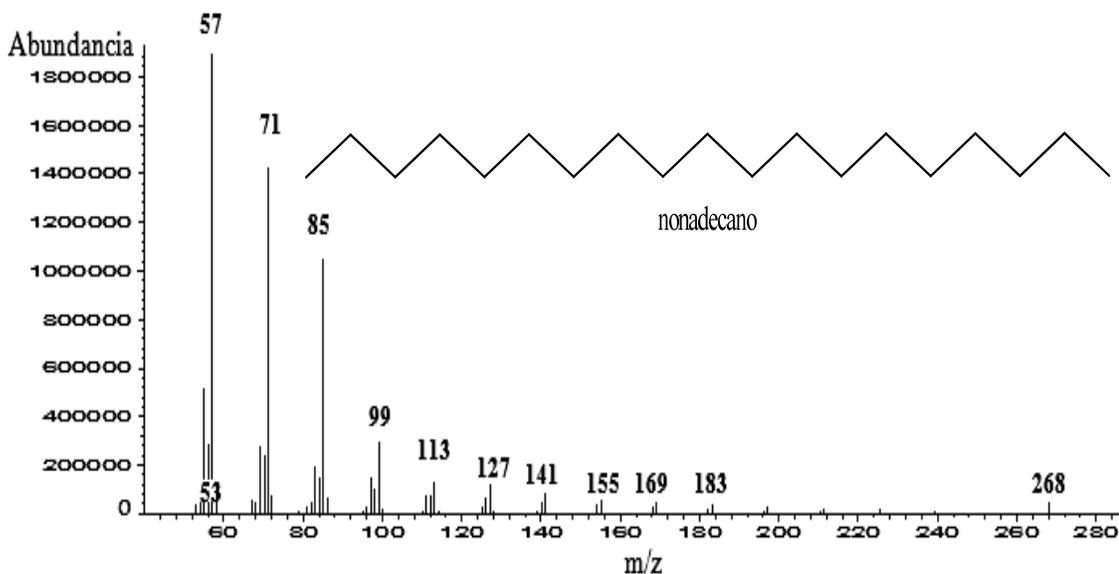


Figura 25. Espectro de masas del nonadecano.

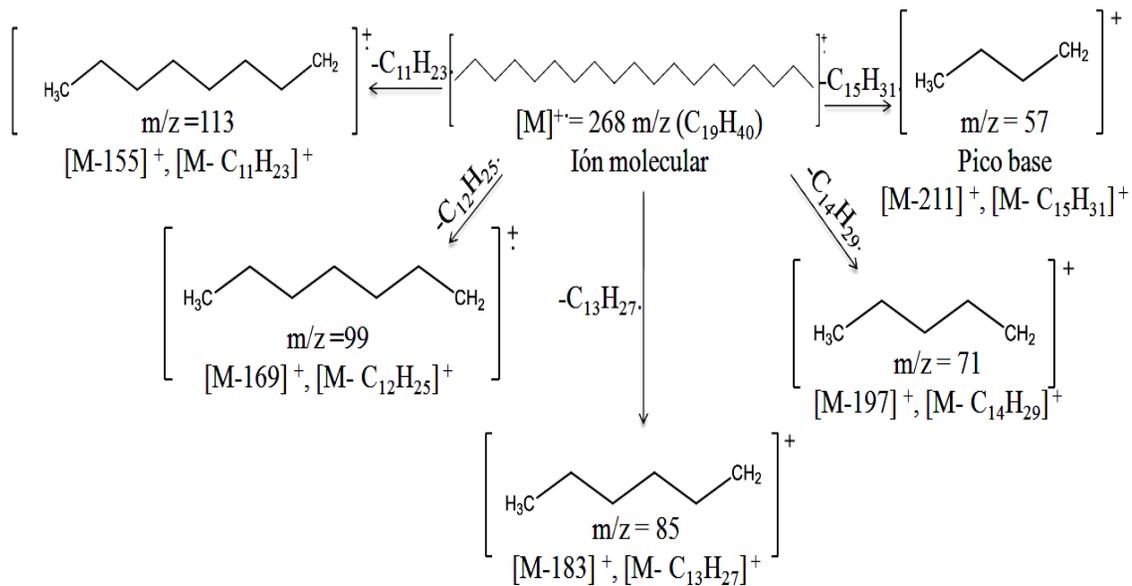


Figura 26. Patrón de fragmentación propuesto para el nonadecano.
En la naturaleza los hidrocarburos se encuentran presentes en diferentes

formas, por ejemplo, la parte aérea de las plantas está cubierta de una cutícula cerosa compuesta principalmente por n-alcanos de cadena larga, la cual protege a la planta de la pérdida de agua, reducción del depósito de polvo, polen, contaminantes ambientales, protección contra la radiación ultravioleta, hongos y bacterias (110). Numerosas investigaciones señalan la presencia de hidrocarburos en diferentes especies marinas, tales como peces, plancton y algas, donde se resalta que estos compuestos son sintetizados de forma natural por estos organismos (111).

Se ha demostrado que las algas marinas contienen diferentes hidrocarburos, siendo predominante los de cadenas lineales con menos de 21 átomos de carbonos (112). En las algas verdes *Ulva rigida*, *Enteromorpha muscoides*, *Enteromorpha linza*, *Codium fragile* se identificó una mezcla de hidrocarburos de la serie n-C₉ hasta n-C₁₈, donde el alcano n-C₁₇ fue identificado en los extractos de todas las algas estudiadas (algas verdes, marrones y rojas) (111). Además, se aislaron los alquenos 1-heptadeceno en las algas verdes *U. rigida*, *E. muscoides*, *E. linza* y *C. fragile* (111). Algunas investigaciones señalan que los n-alcanos con un número de átomos de carbono C₁₇ son predominantes en las algas y los microorganismos (111).

En años recientes, las algas han ocupado un gran interés para la obtención de biodisel, ya que este combustible natural sería un reemplazo para el gasoil proveniente del petróleo, debido a que son renovables y además, compatibles con los motores diesel existentes (113). El interés se debe al hecho de que a partir de las algas y especialmente las microalgas, se pueden obtener productos n-alcanos y n-alquenos en números límites de C₁₃ a C₂₀, los cuales son componentes principales de la gasolina [C₄ a C₉], combustibles reactivos [C₈ a C₁₄] y gasoil [C₁₂ a C₂₂] (113, 114).

4.1.2 Análisis de la fracción II

En la fracción II (líquido viscoso con apariencia aceitosa) se observaron 2 manchas bien separadas, donde la primera estaba formada por una pequeña mancha continua y la segunda mostraba estar constituida por un solo compuesto. Esta

observación demostró que la fracción II estaba formada por una mezcla muy sencilla, por lo cual sería fácil identificar los compuestos químicos contenidos en ella. La poca masa que se obtuvo de esta fracción, impidió seguir con el fraccionamiento cromatográfico, por tal motivo, se realizó un análisis por CG/EM.

En el cromatograma de gases de la fracción II, se logró caracterizar una mezcla de compuestos de diferentes familias químicas, de los cuales solo fueron identificados 6 metabolitos, ya que presentaron mayor abundancia y el mejor porcentaje de probabilidad (superior al 90%) de los compuestos presentes en esta fracción (Fig. 27). Entre los grupos químicos identificados se encuentra un hidrocarburo, una cetona, un ácido graso y ésteres.

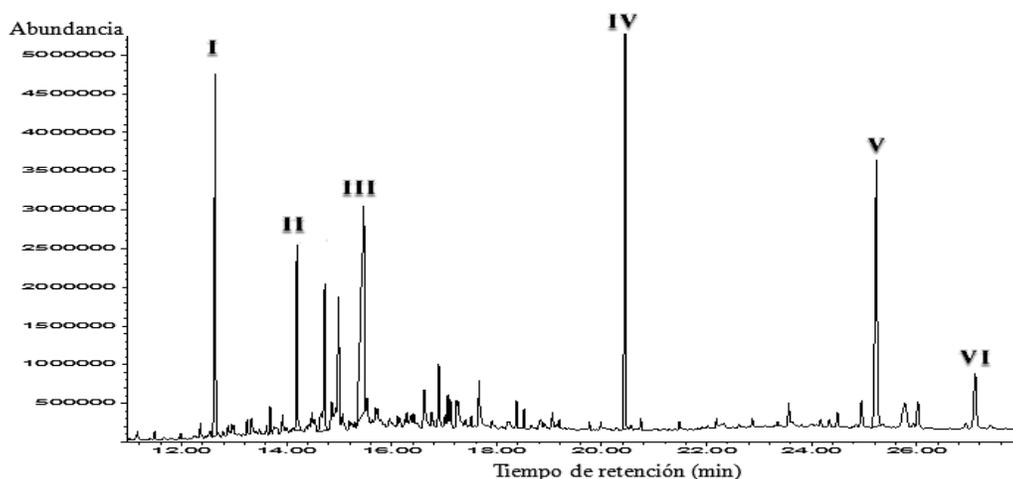


Figura 27. Cromatograma de gases de la fracción II.

El compuesto heptadecano separado por CG (representado en el cromatograma como pico I), mostró un tiempo de retención de 12,64 min. con un área bajo la curva de 9,70%. Seguidamente, se identificó a un tiempo de retención de 14,20 min. la cetona 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (pico II) con un área de 4,81%. La banda denotada como pico III en el cromatograma de gases, presentó el porcentaje de área bajo la curva (16,41%) de todos los compuestos identificados, corresponde al ácido tetradecanoico que fue detectado a un tiempo de retención de 15,47 minutos. En

los picos IV y V se identificaron dos ésteres como éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico y el éster hexadecílico del ácido hexadecanoico; estos compuestos presentaron tiempos de retención de 20,45 y 27,12 minutos con áreas de 10,24 y 2,84, respectivamente (Tabla 8).

De todos los compuestos identificados por CG/EM, no se realizará el análisis del espectro de masa del heptadecano, puesto que, este compuesto ya fue estudiado con detalle en la fracción I.

Tabla 8. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la fracción II, mediante CG/EM.

Pico	Compuesto Identificado	M ⁺ (m/z)	Tr(min)	% P	% Área
I	Heptadecano	240	12,64	97	9,70
II	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	268	14,20	99	4,81
III	Ácido tetradecanoico	228	15,47	94	16,41
IV	Éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico	278	20,45	91	10,24
V	Éster hexadecílico del ácido hexadecanoico	480	27,12	99	2,84

Tr (min): Tiempo de retención en minutos; %P: Porcentaje de probabilidad.

En la Fig. 28, se muestra el espectro de masas del 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, observándose un ión molecular con una relación m/z 268 que coincide con la fórmula molecular C₁₈H₃₆O; y cuya ruptura originó los fragmentos, que corresponden a los picos de los iones más abundantes a m/z 250, 85, 71, 58 (pico base). En la Fig. 29, se presenta los patrones de fragmentación característicos de este compuesto.

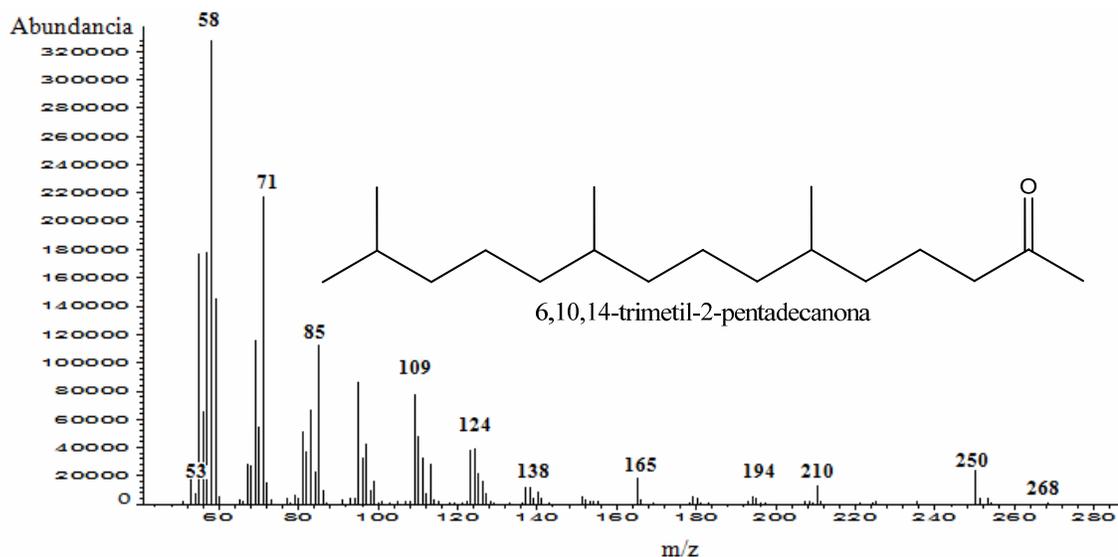


Figura 28. Espectro de masas del 6,10,14-trimetil-pentadecanona.

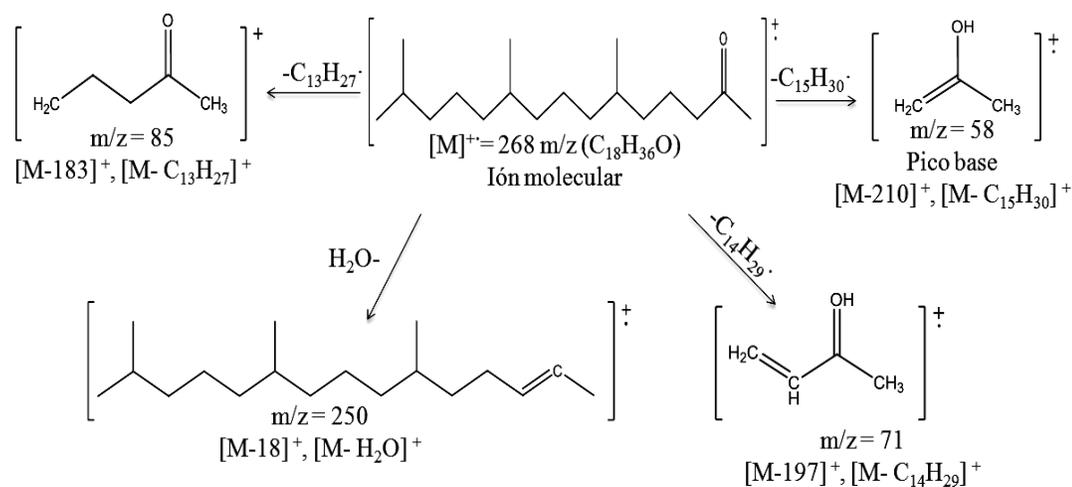


Figura 29. Patrón de fragmentación propuesto para 6,10,14-trimetil-pentadecanona.

La habilidad de las macroalgas para producir metabolitos secundarios de interés, ha sido extensamente documentada, entre los compuestos reportados se encuentran las cetonas. Una de las características químicas de las Chlorophytas es la presencia de 1,4-diacetoxibutadieno, un éster dienolado encontrado en muchos terpenos de algas verdes (115). Algunas cetonas halogenadas aisladas en algas verdes, rojas y marrones han presentado actividad antibacteriana (116). En el alga *C.*

racemosa recolectada en la India, se aisló un nuevo sequiterpeno ceto ácido, denominado 3,7,11-trimetil-10-oxododecanoico; así mismo, en el alga *C. taxifolia* (procedente de la India) se ha identificado el 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, el cual se origina por la degradación del diterpeno fitol, que es el componente éster de la clorofila (117).

El espectro de masas del ácido tetradecanoico (Fig. 30), presentó una señal con una relación m/z 228, la cual corresponde al ión molecular $[M^+]$ de este compuesto que concuerda con la fórmula molecular $C_{14}H_{28}O_2$, según el análisis del patrón de fragmentación.

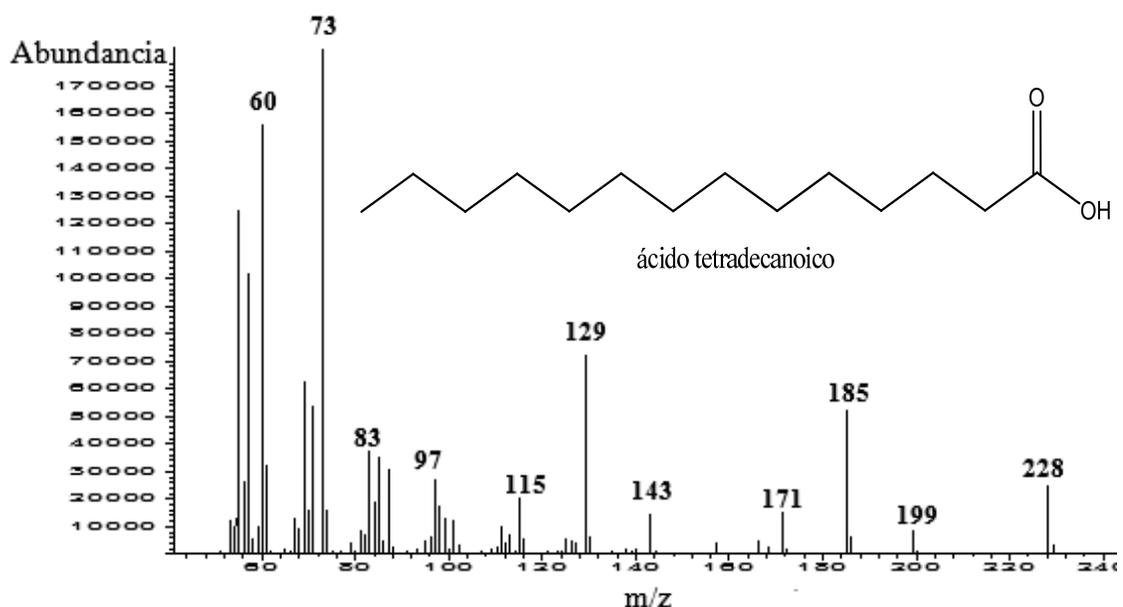


Figura 30. Espectro de masas del ácido tetradecanoico.

El patrón de fragmentación de los iones más abundantes del ácido tetradecanoico se presenta en la Fig. 31, donde se observan las señales de los fragmentos más abundantes con relaciones m/z 60, 73 (pico base), 129 y 185. La formación del ión a una relación m/z de 60, se genera por un reordenamiento de McLafferty, el cual implica la transferencia intramolecular cíclica de un átomo de hidrógeno en posición γ (gamma) con respecto al oxígeno carboxílico (ruptura

heterolítica). Del mismo modo, ocurrió en la formación del pico base a m/z 73 donde el rearrreglo de McLafferty fue originado por la ruptura homolítica de la transferencia del hidrógeno de un carbono α (alfa) con relación al grupo carboxílico. Este tipo de arreglo es común en los compuestos que contienen grupos carbonilos tales como cetonas, aldehídos, ésteres y ácidos (61).

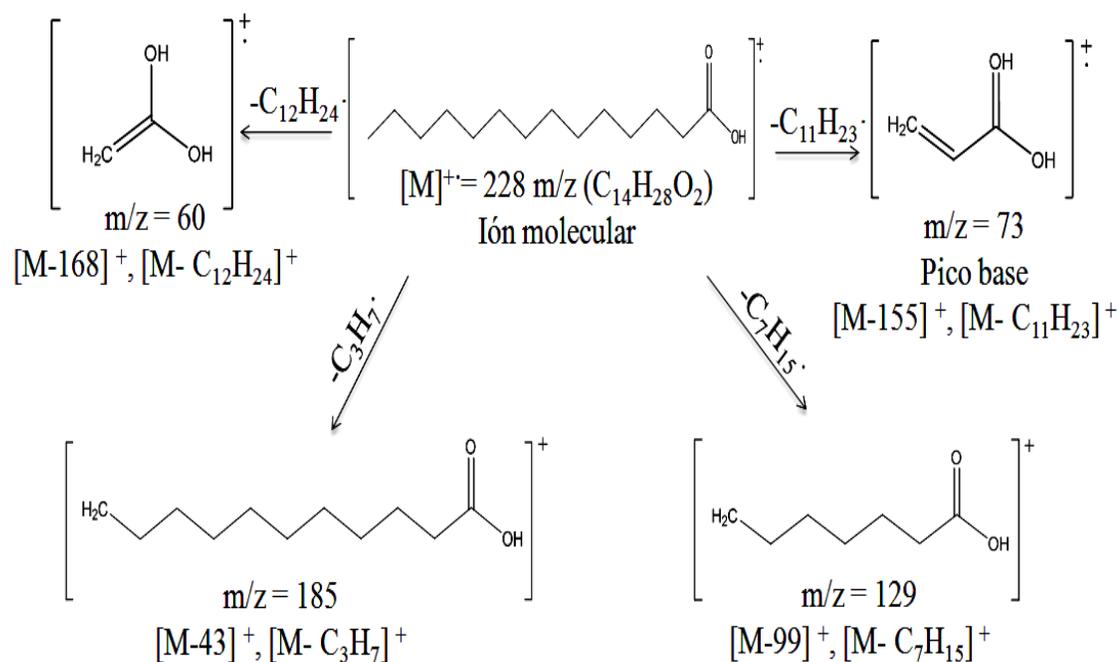


Figura 31. Patrón de fragmentación propuesto para ácido tetradecanoico.

En general, las algas marinas acumulan cantidades pequeñas de ácidos grasos y lípidos, las cuales varían dependiendo de las condiciones a la que se encuentra sometida el alga y la genética de la especie (118, 119). La función de los ácidos grasos en las algas está relacionada con la membrana celular en el almacenaje de energía y procesos metabólicos (120). En las algas verdes, los ácidos grasos poliinsaturados de la serie C_{16} y C_{18} suelen ser generalmente los más abundantes (120). Los ácidos grasos pueden desempeñar papeles importantes en la ecología de ecosistemas acuáticos; algunas investigaciones señalan la actividad antibacteriana mostrada por los ácidos oleico, láurico, palmítico, linoleico, linolénico, entre otros

(120). Estos compuestos también participan en la defensa y son capaces de controlar el crecimiento de microalgas (119).

Los espectros de masas de los ésteres mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico y hexadecílico del ácido hexadecanoico, se muestran en la Fig. 32 y 34, donde el espectro del éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico mostró un ión molecular a un m/z 279, el cual corresponde a la masa del éster 278 ($C_{16}H_{22}O_4$) al cual se le adicionó un proton ($M^+ + H$).

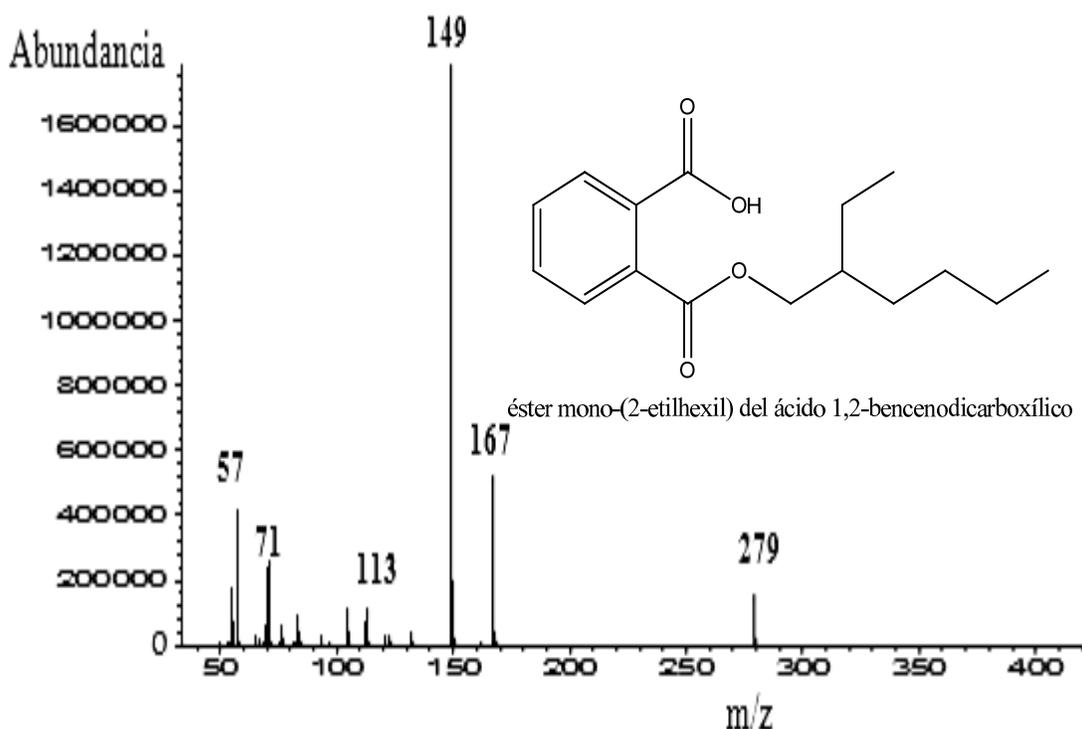


Figura 32. Espectro de masas del éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico.

En este espectro, también se pudo visualizar, los fragmentos de los iones más abundantes de este compuesto a m/z 57, 71, 113, 149 (pico base), 167. La formación de los fragmentos característicos del éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico se muestra en la Fig. 33.

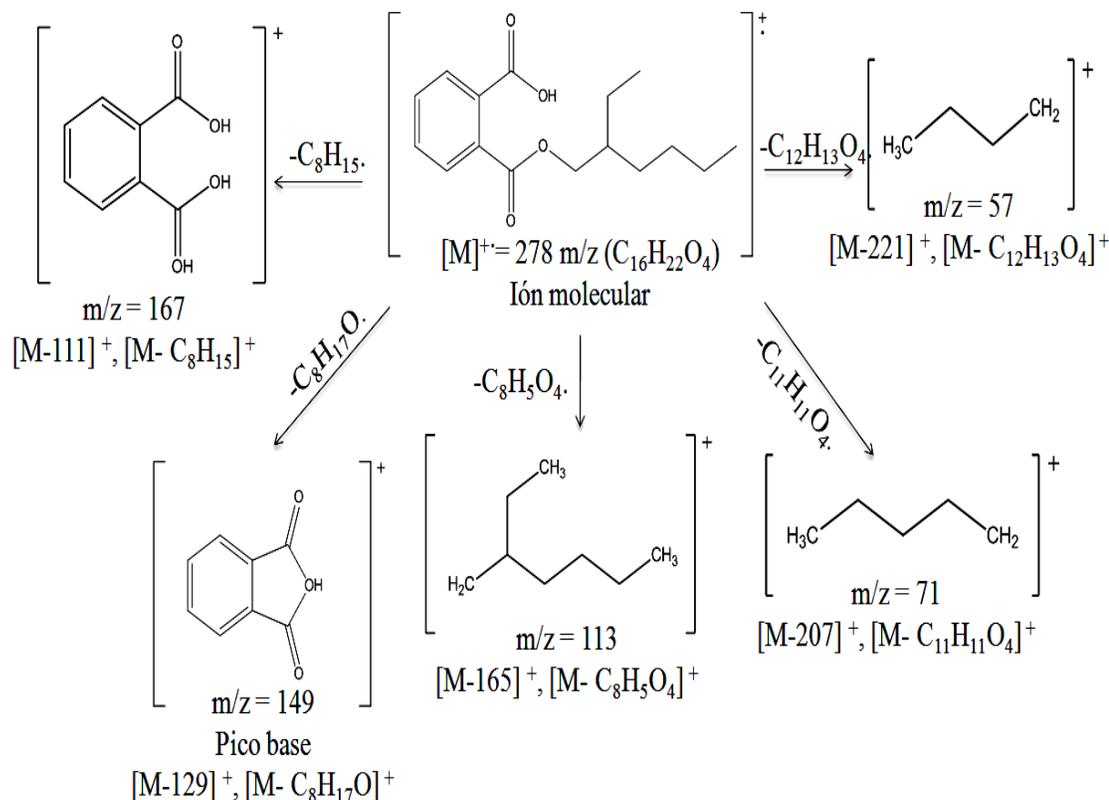


Figura 33. Patrón de fragmentación propuesto para éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico.

Los ftalatos son un grupo de compuestos químicos usados como plastificantes, que proporcionan flexibilidad, transparencia y durabilidad a los plásticos (materiales de construcción, ropa, cosméticos, perfumes, embalaje de comida, juguetes, entre otros); también se encuentran en los aceites lubricantes, solventes y detergentes (121). Entre los ftalatos mas ampliamente usados en la industria, se encuentra el dioctil ftalato, el diisododecil ftalato, y el diisononilftalato. Éstos compuestos en forma pura son líquidos por lo general claros, algunos con olores dulces débiles y unos con el color amarillo débil (121).

Se ha considerado que los ftalatos son importantes contaminantes de los ambientes marinos y terrestres, siendo detectado en suelos, sedimentos y en organismos vivos (122). Sin embargo, algunos reportes en la literatura indican que

estos ésteres pueden presentarse de forma natural, siendo encontrados en plantas, algas marinas, peces, bacterias, hongos (123). Los ftalatos pueden estar presentes a bajas concentraciones en los ambientes, debido a que están expuestos a la degradación fotoquímica y biológica (124).

En el espectro de masas del éster hexadécilico del ácido hexadecanoico, se observa la presencia del ión molecular a una relación m/z de 480, que coincide con la fórmula molecular $C_{32}H_{64}O$. En este espectro de masas se visualizaron las señales de los fragmentos con relaciones m/z de 437, 257 (pico base), 239, 69 y 57. Los patrones de fragmentación de este éster se muestran en la Fig. 35.

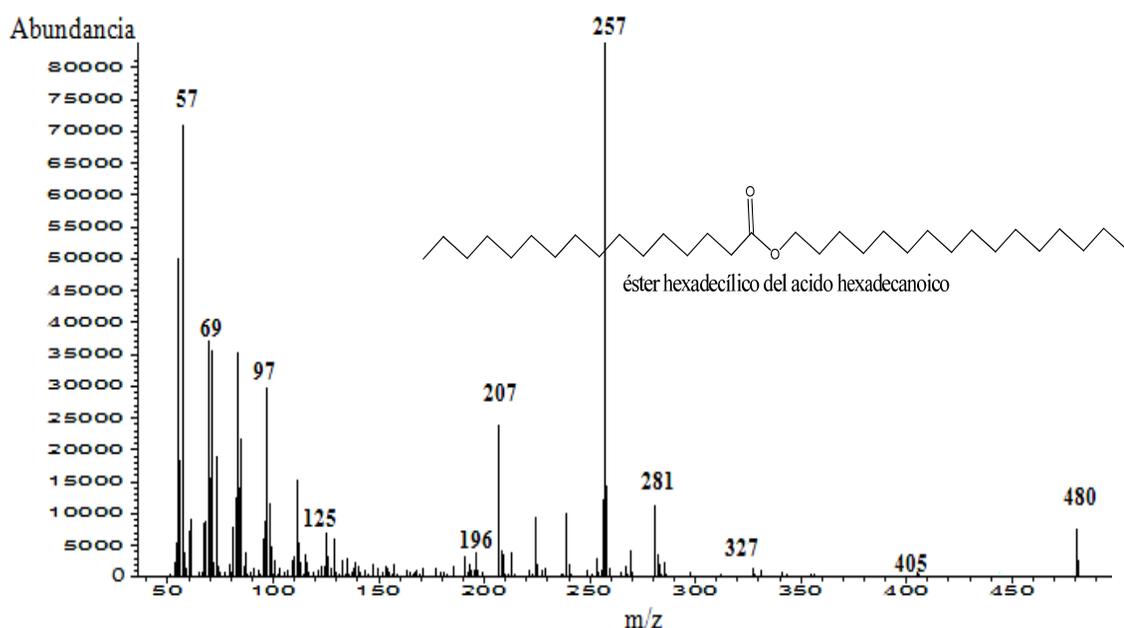


Figura 34. Espectro de masas del éster hexadécilico del ácido hexadecanoico.

Los lípidos incluyen muchos tipos de compuestos que contienen una gran variedad de grupos funcionales, los cuales sirven como reserva energética, estructural, aislamiento y protección de las especies (61, 125). Por ejemplo las ceras, que son ésteres de ácidos grasos de cadena larga, suelen ser los más abundantes en la naturaleza y tienen una gran variedad de funciones en las plantas y en los animales

(61). El *espermaceti* (hexadecanoato de hexadecilo), es el componente principal de una cera suave que se encuentra en la cabeza de las ballenas y probablemente ayuda a regular su flotabilidad cuando se sumergen en las profundidades del océano; además, que también parece servir para ampliar los sonidos de alta frecuencia que transmiten estos cetáceos para la localización de sus presas (61). El éster hexadecílico del ácido hexadecanoico, también fue identificado en el celenterado *Eunicea sp.* recolectado en el Golfo de Cariaco, estado Sucre (126).

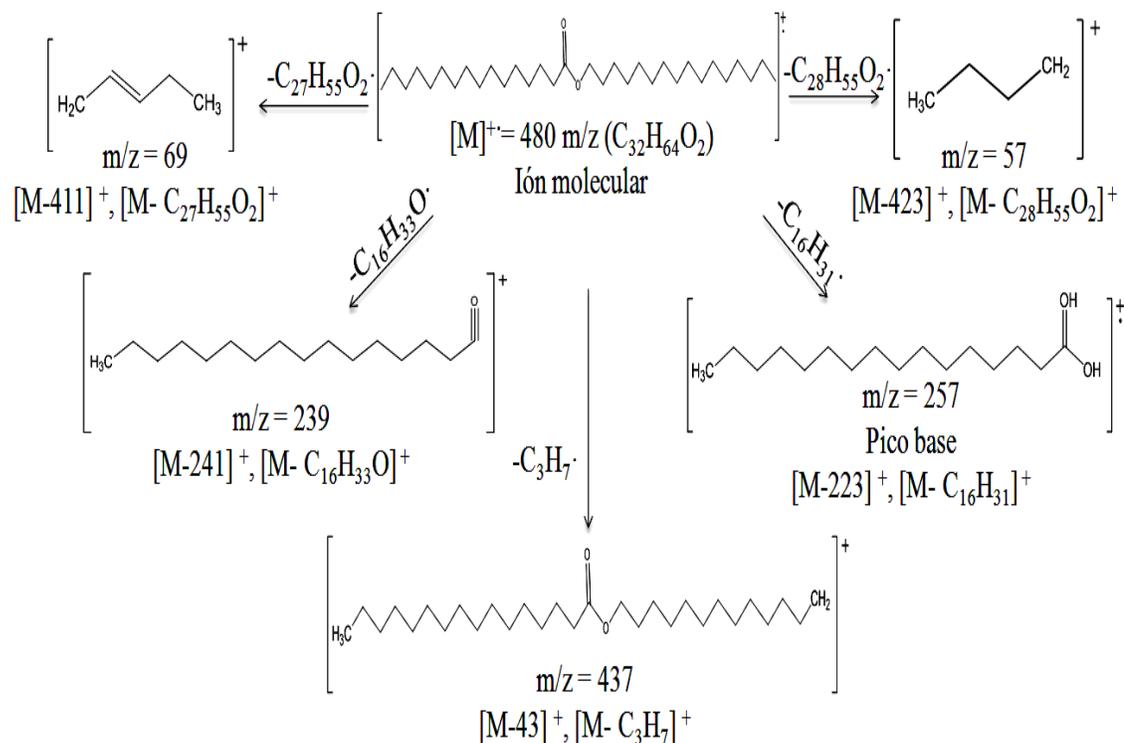


Figura 35. Patrón de fragmentación propuesto para el éster hexadecílico del ácido hexadecanoico.

4.1.3 Fraccionamiento y análisis de la fracción IV

La fracción IV que se obtuvo como un sólido amarillo claro, presentó una mancha continua desde el origen hasta el frente del solvente, al analizarse mediante CCFA, lo cual demostró que ésta estaba compuesta por una mezcla muy compleja.

Esta fracción mostró actividad moderada contra la mayoría de las bacterias ensayadas, actuando débilmente sólo contra el crecimiento de la bacteria Gram positiva *S. aureus subsp aureus* (Apendice A, Tabla A1). Por tal motivo, se le realizó fraccionamiento cromatográfico, usando una bureta de dimensiones 35,2 x 1,4 cm² como columna, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh, empleándose 0,5302 g de muestra y 15,19 g sílica gel en una relación de muestra: sílica de 1:30.

La CC se inició con éter de petróleo al 100% para empaquetar la columna, posteriormente se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con AcOEt al 100%. En esta cromatografía se obtuvieron 39 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizando erlenmeyers de 50 ml de capacidad (Tabla 9).

Tabla 9. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción IV del EEP de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (%V/V)	Eluatos
EP	100	1-2
EP-CHCl ₃	80-20	3-6
EP-CHCl ₃	70-30	7-10
EP-CHCl ₃	50-50	11-16
EP-CHCl ₃	30-70	17-21
CHCl ₃	100	22-25
CHCl ₃ -AcOEt	50-50	26-32
AcOEt	100	33-39

Cada uno de los eluatos fueron analizados por CCFA, aquellos eluatos que al revelarlos con la lámpara UV de onda corta y la solución ácida de molibdato de amonio presentaron iguales valores de R_f, fueron unidos en una misma subfracción. En esta cromatografía se obtuvieron 11 subfracciones, tal como se presenta en la Tabla 10. La masa total recuperada de la fracción IV fue de 0,3851 g, lo que representa el 72,63 % de la cantidad de muestra fraccionada. La diferencia de masa

entre la fracción IV (empleada para la CC) y la recuperada, se debe a la adsorción de compuestos de mayor polaridad en la sílica gel de 35-60 mesh.

Tabla 10. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción IV procedente del EEP.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
IV ₁	1-7	3,90	Sólido amarillo pálido
IV ₂	8-10	40,00	Líquido amarillo pálido
IV ₃	11	24,90	Sólido amarillo claro
IV ₄	12	43,6	Sólido blanco brillante
IV ₅	13	95,20	Sólido marfil
IV ₆	14	64,80	Sólido amarillo claro
IV ₇	15-24	41,70	Sólido amarillo
IV ₈	25-29	61,80	Sólido amarillo transparente
IV ₉	30-37	6,90	Sólido amarillo transparente
IV ₁₀	38-39	2,30	Sólido marrón transparente

4.1.3.1 Análisis de la subfracción IV₃

La subfracción IV₃ (sólido amarillo claro) en el análisis por CCFA mostró una mancha continua la cual presentaba una zona de mayor concentración alrededor de R_f 0,78. La poca cantidad de masa obtenida en esta subfracción (24,90 mg) hizo complicado continuar con el fraccionamiento cromatográfico, por lo tanto a esta muestra se le realizó un análisis por CG/EM, lográndose identificar 3 compuestos, que aparecieron como 3 bandas de mayor abundancia a tiempos de retención 15,5; 18,9 y 20,5 minutos; respectivamente (Fig. 36).

Tal como se muestra en la Tabla 11, el primer pico corresponde al ftalato de dibutilo que presentó un área de 20,05%; seguido del 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido con un área de 7,04%, y por último se identificó el éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico con el mayor porcentaje de área (pico III) con un

46,82%, cuyo compuesto fue detectado en el análisis de la fracción II.

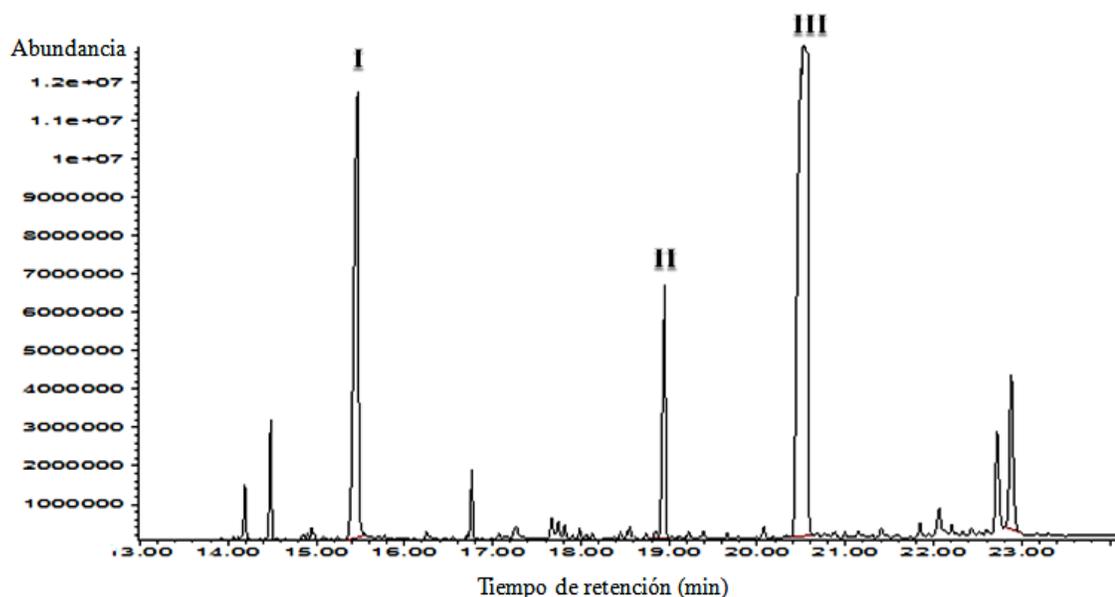


Figura 36. Cromatograma de gases de la subfracción IV₃.

Tabla 11. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la subfracción IV₃, mediante CG/EM.

Pico	Compuesto Identificado	M ⁺ (m/z)	Tr(min)	% P	% Área
I	Ftalato de dibutilo	278	15,47	90	20,05
II	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	324	18,95	98	7,04
III	Éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico	278	20,53	91	46,82

Tr (min): Tiempo de retención en minutos; %P: Porcentaje de probabilidad.

En la Fig. 37, se muestra el espectro de masas del ftalato de dibutilo, que presentó el ión molecular [M⁺] a una relación m/z de 278 que coincide con la fórmula molecular C₁₆H₂₂O₄, el cual no se aprecia con gran claridad en el espectro debido a la inestabilidad de este ión. La ruptura del ftalato de dibutilo originó los fragmentos, que

corresponden a los picos de los iones más abundantes a m/z 223, 205, 149 (pico base), 104, 73, 57; cuyos patrones de fragmentación se muestra en la Fig. 38.

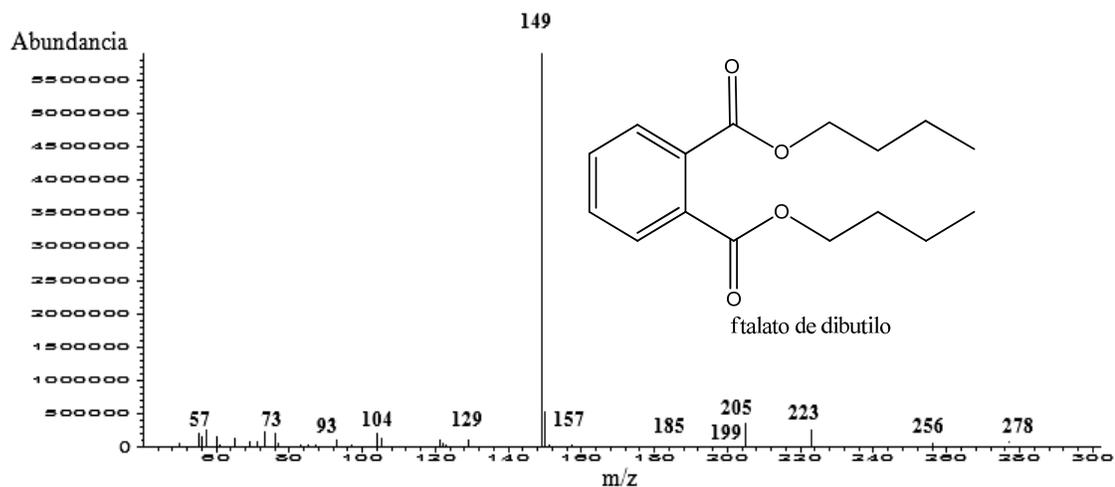


Figura 37. Espectro de masas del ftalato de dibutilo.

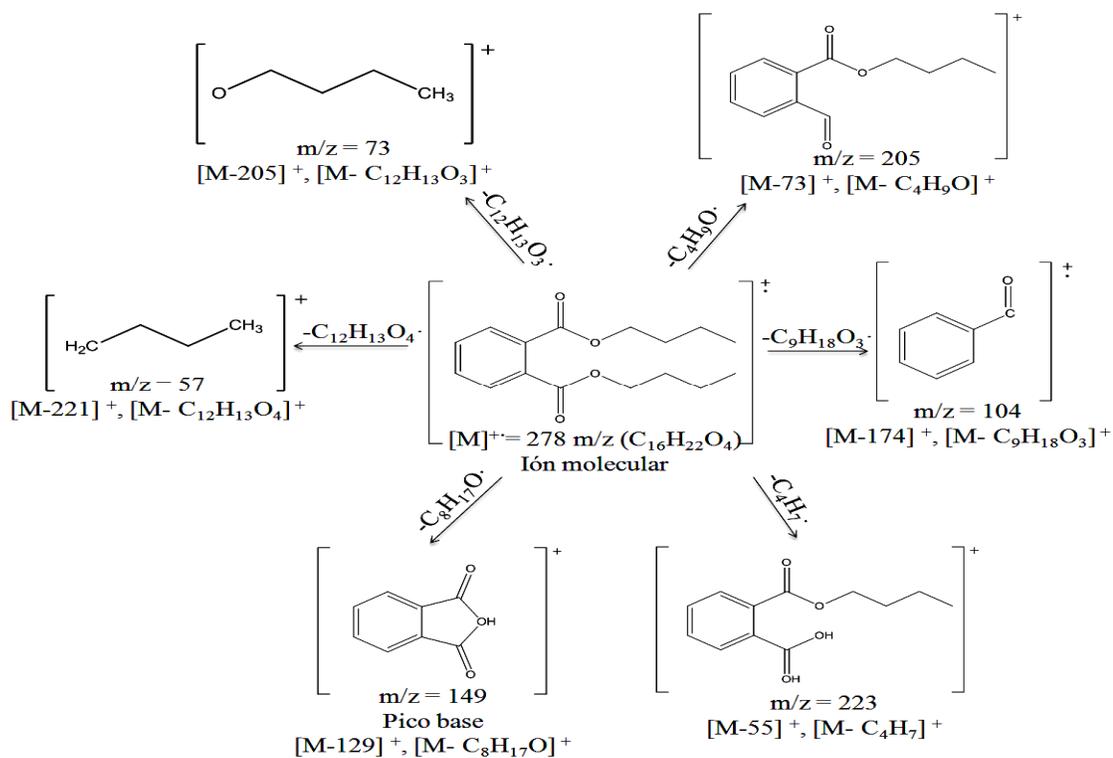


Figura 38. Patrón de fragmentación propuesto para el ftalato de dibutilo.

Estos resultados concuerdan con el estudio del alga *Kappaphycus alvarezii* recolectada en la Isla de Cubagua, donde se identificó el ftalato de dibutilo en esta alga roja (127). Aunque se ha pensado, que los dialquifltalatos como el dibutil ftalato (DBF) pueden estar presentes en los organismos terrestres y marinos producto de la acumulación de contaminantes presentes en el ambiente, se ha demostrado mediante el estudio de la abundancia natural de ^{14}C , que el DBF aislado de las algas marinas *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica* y *Ulva sp.* son originados naturalmente por estas especies recolectadas en Japón (122).

En el espectro de masas del 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido (Fig. 39), se observó la presencia del ión molecular $[\text{M}^+]$ a una relación m/z 324 coincidiendo con la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_2$; en este espectro se logró identificar los picos de los iones de mayor abundancia a m/z 55, 69, 99 (pico base), 114, 151 y 196; cuyo patrón de fragmentación se muestra en la Fig. 40.

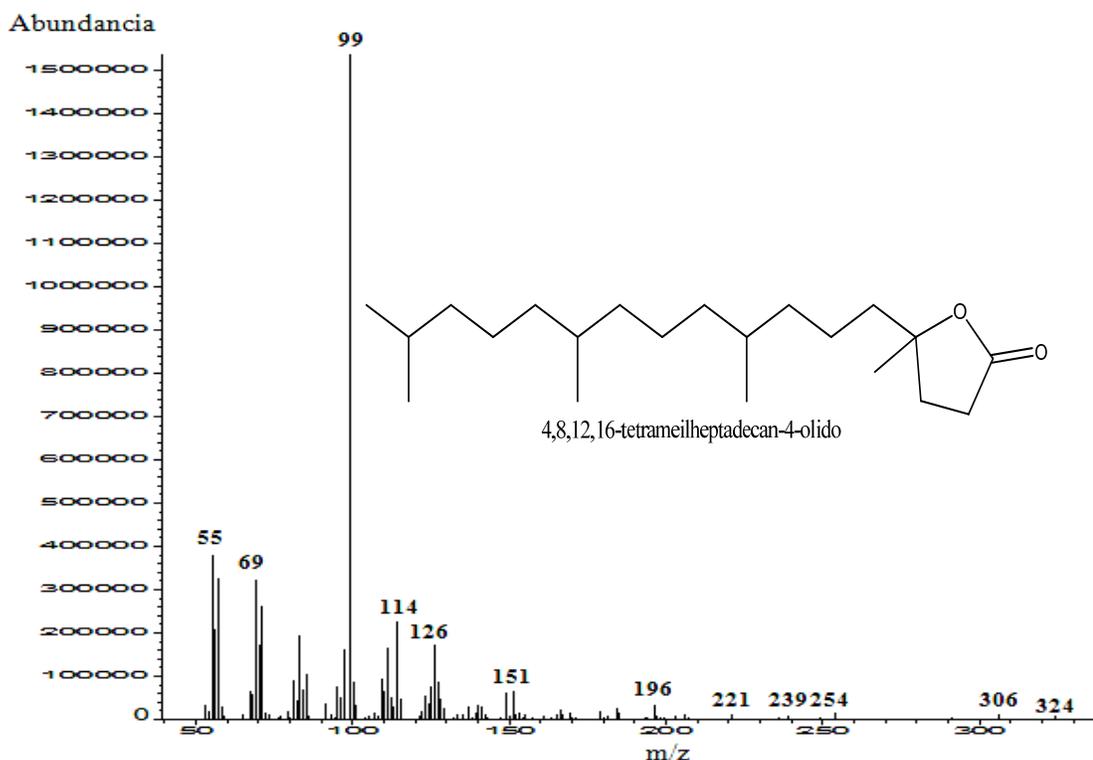


Figura 39. Espectro de masas del 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido.

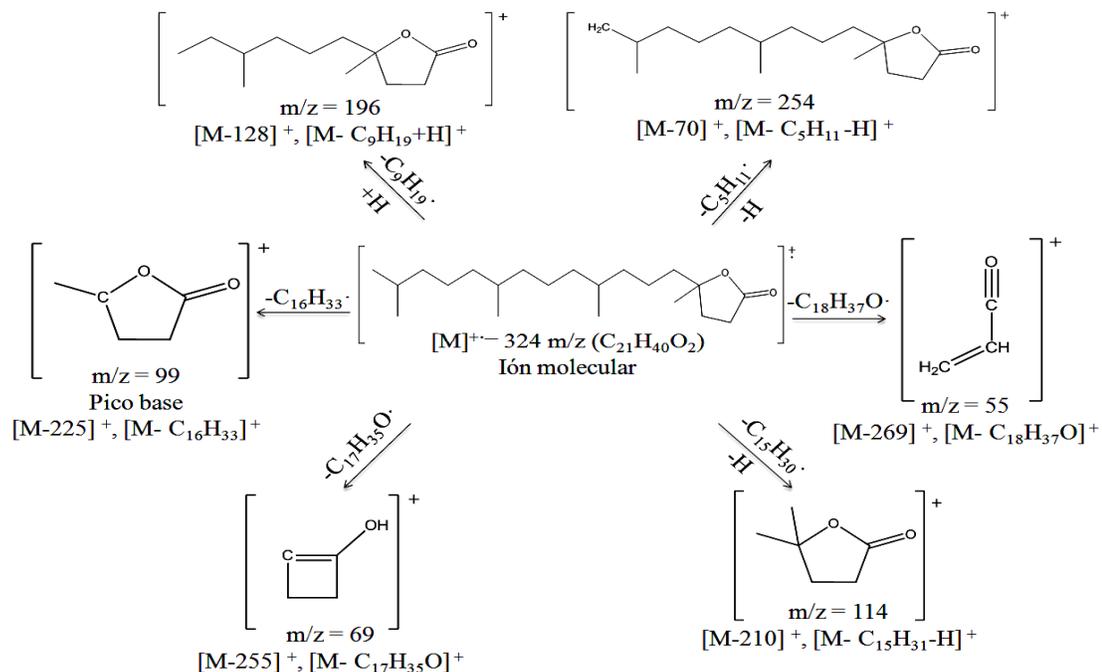


Figura 40. Patrón de fragmentación propuesto para 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido.

4.1.3.2 Fraccionamiento de la subfracción IV₄

La subfracción IV₄ de apariencia sólida blanca brillante, presentó en el análisis de CCFA, la presencia de una estela acompañada por 3 manchas con separaciones cercanas, con valores de R_f iguales a 0,34, 0,38 y 0,43. Esta observación mostró que las manchas podían separarse realizando una cromatografía de capa fina preparativa (CCFP). La CCFP fue realizada empleando sílica gel de 60 mesh (fase estacionaria), la cual fue colocada sobre una placa de vidrio de 20×20 cm² con 1 mm de grosor, como eluyente se empleó CHCl₃ al 100% (fase móvil). Posteriormente, se colocaron los 0,0436 g de la subfracción IV₄. Al culminar el recorrido del solvente, se observaron 4 bandas al revelarse con la luz UV de onda corta, donde las 3 primeras no mostraron una separación considerable entre ellas, por lo tanto se decidió unir estas 3 en una sola, obteniéndose finalmente 2 subfracciones en esta cromatografía (Tabla 12). Para disolver las bandas separadas de la sílica se empleó como disolvente CHCl₃.

Tabla 12. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción IV₄ del EEP.

Subfracciones	R _f	Masa (mg)
IV _{4.1}	0,69	3,3
IV _{4.2}	0,79	9

En este fraccionamiento se recuperaron 0,0123 g de la muestra lo que corresponde al 28,21% del rendimiento de la subfracción IV₄. En la CCFP se obtuvo un rendimiento muy bajo, producto de la adsorción de los componentes de esta subfracción a la sílica gel de 60 mesh. A las subfracciones IV_{4.1} y IV_{4.2} se le realizó una CCFA utilizando como fase móvil CHCl₃ al 100%, en donde se observó que ambas muestras no presentaron una mancha separada, sino que la muestra IV_{4.1} estaba formada por una estela seguida de 2 manchas con valores de R_f muy próximos; y, por su parte la subfracción IV_{4.2} mostró 1 mancha solapada por una estela poco concentrada.

4.1.3.3 Fraccionamiento y análisis de la subfracción IV₅

El análisis por CCFA de la subfracción IV₅ de masa 0,095 g (sólido de color marfil), presentó una banda continua acompañada de una mancha con una buena separación. Para la purificación de esta mancha se empleó CCFP, la cual fue realizada utilizando sílica gel de 60 mesh (fase estacionaria), sobre una placa de vidrio de 20×20 cm² recubiertas con 1 mm de grosor de sílica gel; en esta cromatografía se usó como eluyente una mezcla de CHCl₃-AcOEt en una proporción 2:3. Al visualizar la placa en la lámpara UV de onda corta, se observó 1 banda ancha compuesta por diferentes compuestos y otra formada por una mancha bien definida, las cuales fueron separadas y extraídas con CHCl₃. En esta cromatografía se obtuvieron 2 subfracciones (Tabla 13).

La masa recuperada en esta cromatografía fue de 0,0240 g, lo que representa el 25,26%, este bajo rendimiento se debe al uso de un solvente no adecuado para la extracción de las bandas separadas por CCFP, por lo tanto no se pudo separar

completamente los compuestos contenidos en la sílica gel de 60 mesh. El análisis por CCFA de la subfracción IV_{5,2}, mostró la presencia de una mancha, lográndose purificar la mancha observada en el análisis de CCFA de la fracción IV₅; mientras que la subfracción IV_{5,1} (de mayor masa) presentó una mancha continua, es decir una mezcla compleja.

Tabla 13. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción IV₅ del EEP.

Subfracciones	R _f	Masa (mg)
IV _{5,1}	0,65	21
IV _{5,2}	0,82	3

La muestra IV_{5,2} (sólido beige) que presentó un compuesto puro, se le realizó un análisis por espectroscopia infrarrojo para medir las vibraciones de los enlaces y así determinar los grupos funcionales presentes en el componente de esta muestra; y conjuntamente se empleó la técnica de espectroscopia de RMN de ¹H y ¹³C para caracterizar el compuesto de ésta subfracción.

En el espectro de infrarrojo de la subfracción IV_{5,2} (Fig. 41), se observan cuatro bandas de absorción mayoritarias. La más amplia entre 3020-2849 cm⁻¹, correspondiente a las vibraciones de tensión de C-H del Csp³, la absorción a 1705 cm⁻¹ observada como una tensión intensa, es originada por el doble enlace C=O característico de los compuestos carbonílicos. También, en este espectro se visualiza la absorción de tensión del enlace C-O a 1215 cm⁻¹, pertenecientes a grupos ésteres o hidroxílicos. La señal de absorción a 758 cm⁻¹ se debe a la deformación del enlace C-H, característicos de grupos metilenos (CH₂) continuos mayores a 4. En este espectro se observa una banda ancha (no bien definida) centrada encima de la absorción de tensión C-H, la cual puede ser debida a la tensión de un grupo O-H. El análisis del espectro de infrarrojo de esta subfracción sugiere la presencia de un grupo ácido o éster unido a una cadena alifática.

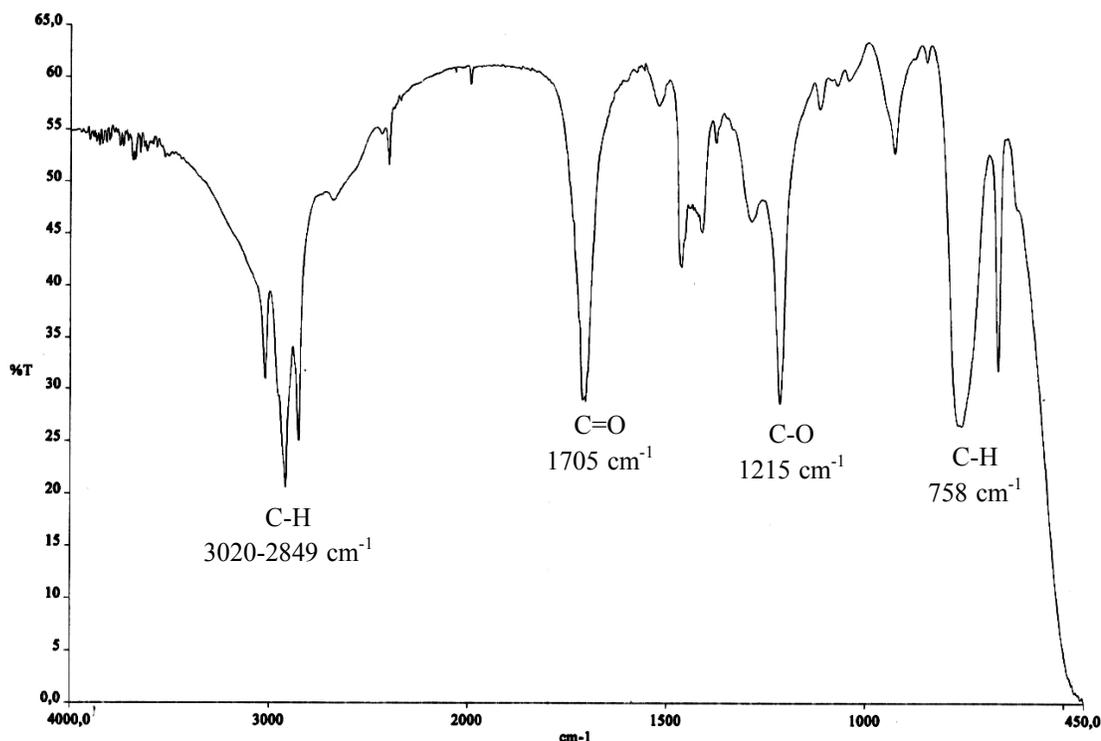


Figura 41. Espectro IR de la subfracción IV_{5.2} del EEP.

En el espectro de RMN ¹H de la subfracción IV_{5.2} (Fig. 42) se observan 4 señales a campo alto y una señal a campo bajo poco distinguible. La primera señal entre δ_H 0,85-0,87 ppm que aparece como un triplete, corresponde a los protones metilos del CH₃ terminal de la molécula [H₁₇]; el segundo desplazamiento entre δ_H 1,24-1,31 ppm [señal de mayor intensidad] fue asignado a un multiplete debido a los protones de grupos metilenos adyacentes CH₂ [H₄-H₁₆], ya que sus desplazamientos químicos se encuentran afectados de forma similar por el grupo carboxílico. A un rango de δ_H 1,58-1,63 ppm aparece un multiplete correspondiente a los protones del grupo metileno [CH₂] en posición β [H₃] con respecto al grupo carboxilo; a campo más bajo aparece un triplete a δ_H 2,31-2,34 ppm, el cual pertenece a los protones del grupo metileno en posición α [H₂]. Por último, se observa un singlete ancho a campo muy bajo [δ_H 11,23 ppm], perteneciente al protón ácido del grupo carboxilo [H₁] (Tabla 14).

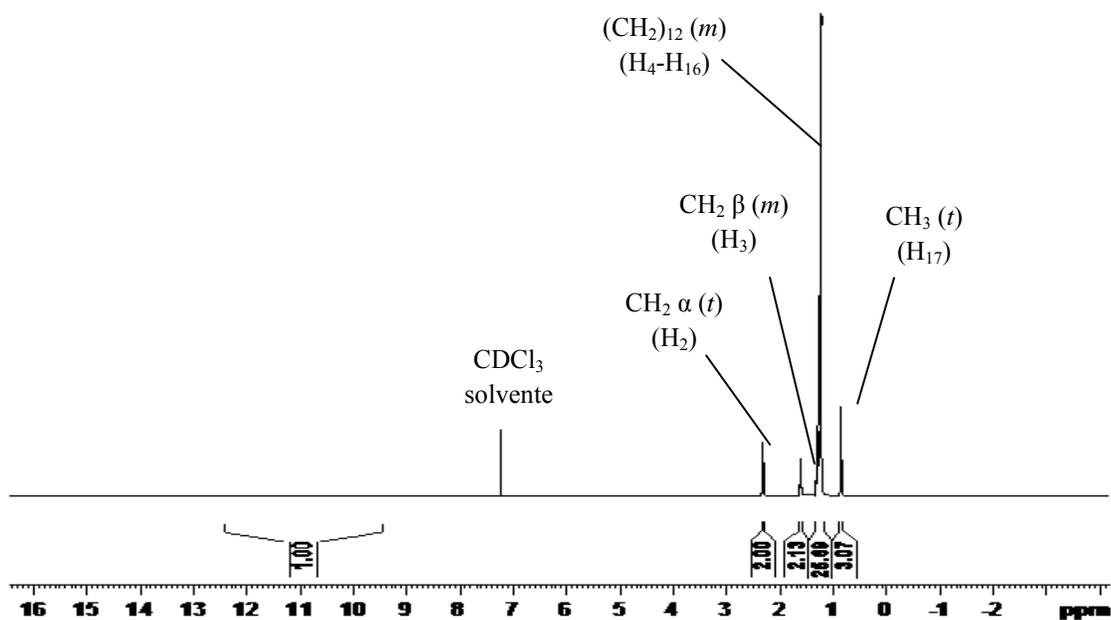


Figura 42. Espectro de RMN de ^1H de la subfracción $\text{IV}_{5.2}$.
(300 MHz; CDCl_3)

En la Fig. 43, se muestran las ampliaciones en diferentes regiones de las señales del espectro de RMN de ^1H , donde se detalla la multiplicidad de cada una de las señales y la señal del protón hidroxilo del grupo carboxílico.

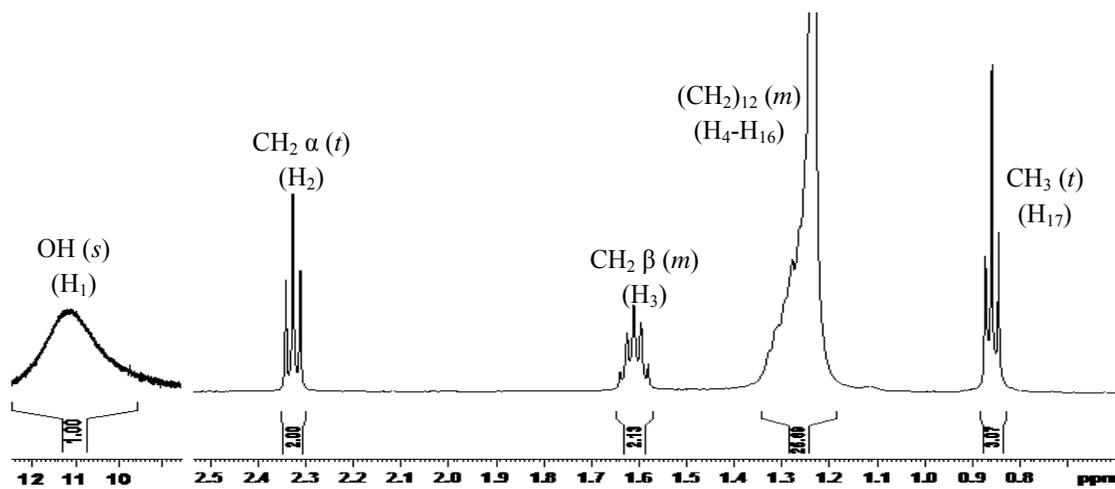


Figura 43. Ampliaciones en diferentes regiones de las señales del espectro de RMN de ^1H de la subfracción $\text{IV}_{5.2}$.

Tabla 14. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ^1H de la subfracción $\text{IV}_{5.2}$.

Señal	δ_{H} (ppm)	Multiplicidad	Tipos de hidrógenos
H ₁	11,23	singlete (<i>s</i>)	O-H
H ₂	2,33	triplete (<i>t</i>)	$\alpha\text{CH}_2\text{-COO-}$
H ₃	1,60	multiplete (<i>m</i>)	$\beta\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$
H ₄ -H ₁₆	1,27	multiplete (<i>m</i>)	$\text{-(CH}_2\text{)}_{13}$
H ₁₇	0,86	triplete (<i>t</i>)	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$

El espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 44) al igual que en el espectro de RMN ^1H , se observa a campo muy bajo a δ_{C} 179,94 ppm, la señal correspondiente al carbono carbonílico (C₁) de los ácidos carboxílicos, seguido de las señales a δ_{C} 34,01 ppm del carbono metilénico en posición α con respecto al carbono carboxílico (C₂) y a δ_{C} 31,91 ppm perteneciente al carbono del grupo metileno (C₁₅). A δ_{C} entre 29,05-29,68 ppm se observa una señal de mayor intensidad que se debe a los grupos metilenos adyacentes de los carbonos en posición C₄-C₁₄; las dos señales a δ_{C} 24,67 y 22,68 ppm pertenecen al carbono metilénico en posición β del carbono carboxílico (C₃) y al C₁₆ adyacente al carbono metílico de la molécula, respectivamente. La señal a campo más bajo que se aprecia a δ_{C} 14,10 ppm, se asignó al carbono metílico presente en este ácido orgánico (Tabla 15).

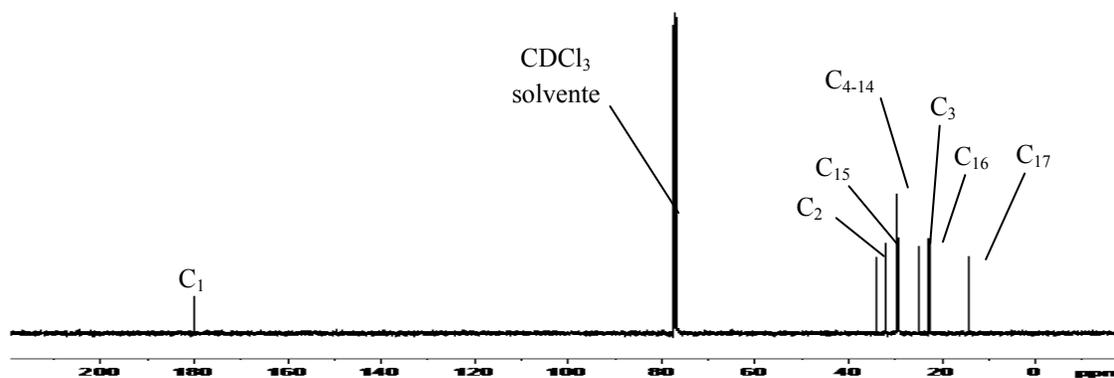


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C de la subfracción $\text{IV}_{5.2}$. (300 MHz; CDCl_3).

Tabla 15. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C de la subfracción IV_{5.2}.

Señal	δ_{C} (ppm)	Tipo de carbono
C ₁	179,94	-C-OOH
C ₂	34,01	- α CH ₂ -COOH
C ₃	24,67	- β CH ₂ -CH ₂ -OOH
C ₄ -C ₁₄	29,05-29,68	-(CH ₂) ₁₀
C ₁₅	31,91	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
C ₁₆	22,68	-CH ₂ -CH ₃
C ₁₇	14,10	-CH ₃

Para determinar las señales de los grupos CH, CH₂ y CH₃ se realizó un análisis DEPT-135, tal como se muestra en la Fig. 45. En este espectro se observan 5 señales en posición negativa característico de grupos metilénicos, mostrando superposición de varias señales debida a los grupos metilenos de una cadena alifática (CH₂)_n y en posición positiva se visualiza una señal correspondiente al grupo metilo observadas también en el espectro de RMN de ^1H y ^{13}C .

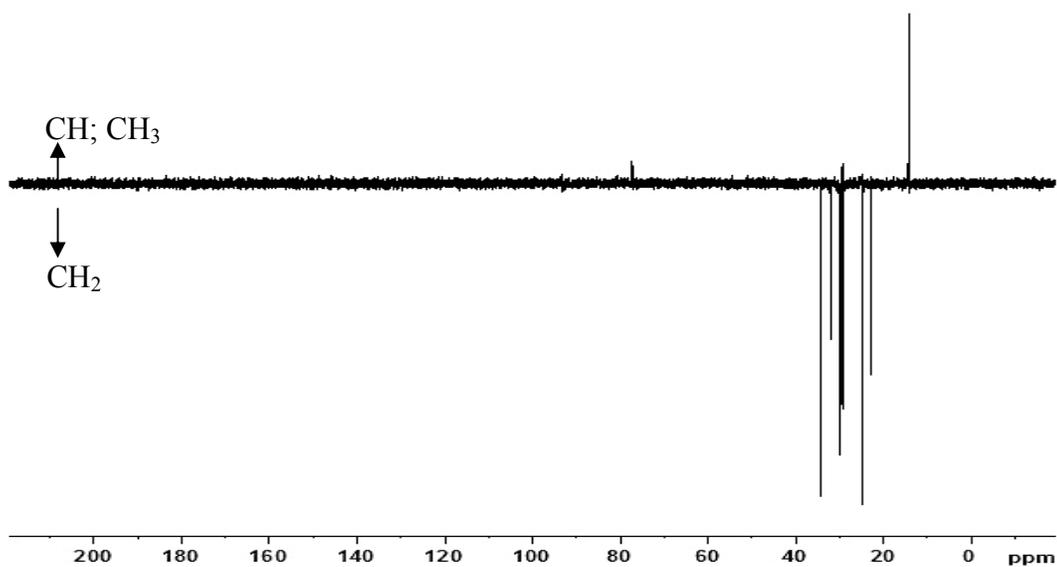


Figura 45. Espectro de RMN DEPT-135 de la subfracción IV_{5.2}.

En la Fig. 46 se muestra una comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y de ^{13}C , los cuales permitieron visualizar de manera clara los tipos de carbonos presente en la estructura confirmándose la exactitud del análisis de RMN de ^{13}C , observándose la señal de un carbono cuaternario perteneciente al grupo carboxílico, el cual no aparece en el DEPT-135. Con el empleo del programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2010, se pudo comparar los desplazamientos químicos teóricos con los análisis realizados a los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de esta subfracción $\text{IV}_{5.2}$, lo que permitió confirmar que el compuesto purificado mediante CCFP de la subfracción IV_5 , es el ácido heptadecanoico (Fig. 47).

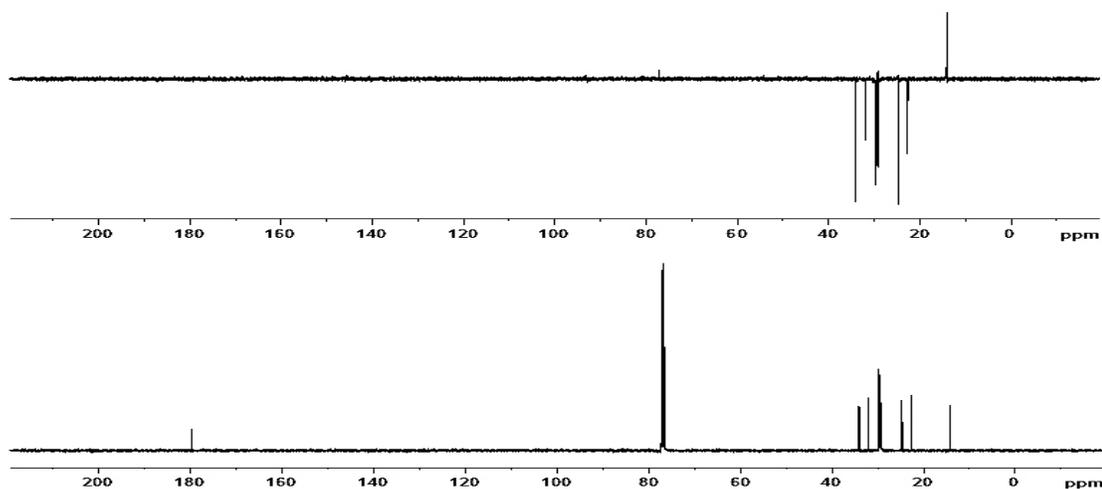


Figura 46. Comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y ^{13}C de la subfracción $\text{IV}_{5.2}$.

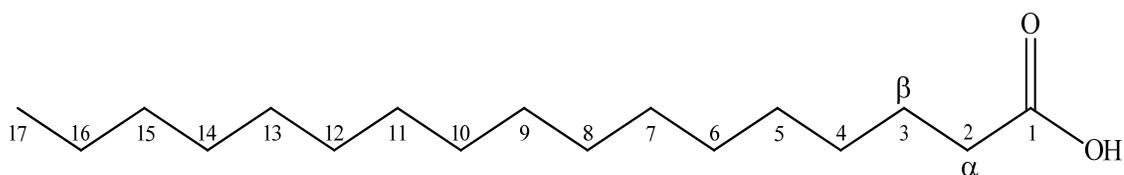


Figura 47. Estructura del ácido heptadecanoico.

Estos resultados concuerda con lo reportado en el estudio del contenido de ácidos grasos de varias especies de algas marinas, donde el alga *Caulerpa verticillata* mostró estar constituida por ácidos grasos saturados de la serie C_{12} hasta C_{18} (128).

Así mismo, el análisis de ácidos grasos del alga roja *Bryothamnion triquetrum* se observó que esta especie presentó mayores cantidades de los ácidos margárico [ácido heptadecanoico] y palmítico [ácido hexadecanoico] (129). La composición de ácidos grasos en las algas marinas varían dependiendo de la división algal y de las condiciones ambientales a las cuales están sometidas; en general, las algas verdes suelen producir en mayor abundancia los ácidos grasos C₁₆ y C₁₈ (119,120).

4.1.3.4 Fraccionamiento y análisis de la subfracción IV₆

La subfracción IV₆ de masa 0,0648 g (sólido amarillo claro), presentó una mancha continua, al analizarse mediante CCFA, lo cual demostró que esta estaba compuesta por una mezcla compleja. Para separar en lo posible algún componente de esta mezcla se le realizó fraccionamiento cromatográfico, empleándose como columna una bureta de 23,8 cm de largo y 0,7 cm de diámetro, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh. Para esta CC se utilizaron 3,2400 g sílica gel en una relación de muestra: sílica de 1:50. La CC se inició con EP-CHCl₃ en una relación 4:1, posteriormente se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con CHCl₃-AcOEt 1:1. En esta cromatografía se obtuvieron 15 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizándose erlenmeyers de 50 ml de capacidad (Tabla 16).

Tabla 16. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción IV₆ del EEP.

Mezcla	Porcentaje (%V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-5
EP-CHCl ₃	70-30	6-9
EP-CHCl ₃	50-50	10-11
CHCl ₃	100	12-13
CHCl ₃ -AcOEt	50-50	14-15

Todos los eluatos fueron analizados por CCFA; aquéllos que al revelarlos con

la lámpara UV de onda corta y la solución ácida de moligdato de amonio presentaron iguales valores de R_f , fueron unidos en una misma subfracción, obteniéndose un total de 4 subfracciones (Tabla 17).

Tabla 17. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la subfracción IV₆.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
IV _{6.1}	1-5	1,00	Sólido transparente amarillo
IV _{6.2}	6-10	33,80	Sólido amarillo
IV _{6.3}	11-13	5,70	Sólido amarillo
IV _{6.4}	14-18	12,40	Aceite sólido amarillo

La muestra recuperada en esta cromatografía fue de 0,0529 g, lo que corresponde al 81,64% del rendimiento de la subfracción IV₆.

La subfracción IV_{6.2} presentó en su análisis por CCFA dos manchas continuas solapadas una encima de la otra, donde una de ellas se observaba menos concentrada, cuyos valores de R_f estaban un poco distantes. El comportamiento observado en esta subfracción, permitió decidir en realizarle CC a esta subfracción.

Para la CC de la subfracción IV_{6.2} se usaron 0,0338 g de muestra y 1,7 g de sílica en una relación muestra: sílica 1:50; utilizándose como columna una bureta de 10,9 cm de alto y 0,6 cm de diámetro. Como eluyente se empleó EP al 100% al inicio de esta cromatografía y posteriormente, se utilizaron mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con CHCl₃-AcOEt 1:1 v/v. Tal como se muestra en la Tabla 18, en esta cromatografía se obtuvieron 14 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 15 ml, utilizando erlenmeyers de 25 ml de capacidad.

Todos los eluatos fueron analizados por CCFA, aquéllos que al revelarlos con la lámpara UV de onda corta y la solución ácida de molibdato de amonio presentaron iguales valores de R_f , fueron unidos en una misma subfracción, obteniéndose un total de 3 subfracciones en esta separación cromatográfica (Tabla 19). La cantidad de masa recuperada fue de 0,0327 g, lo que representa el 96,74% de rendimiento de la

subfracción IV_{6.2}.

Tabla 18. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción IV_{6.2}

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-5
EP-CHCl ₃	70-30	6-9
EP-CHCl ₃	50-50	10-11
CHCl ₃	100	12-13
CHCl ₃ -AcOEt	50-50	14-15

Tabla 19. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción IV_{6.2}.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
IV _{6.2.1}	1-5	9,50	Sólido blanco brillante
IV _{6.2.2}	6-7	19,70	Sólido blanco amarillento
IV _{6.2.3}	8-14	3,50	Sólido amarillo

De las 3 subfracciones obtenidas se decidió estudiar la muestra IV_{6.2.1}, ya en su análisis por CCFA se observó una mancha que podía ser analizada por espectroscopia de IR y CG/EM, para así identificar el o los compuestos en mayor proporción de esta subfracción.

En el espectro de IR se mostraron las vibraciones de los principales grupos funcionales de los componentes en mayor proporción en la subfracción IV_{6.2.1} (Fig. 48). Aproximadamente a 3400 cm⁻¹ se aprecia una banda muy ancha, característico de la tensión de grupos hidroxilos O-H, la absorción entre 2917-2849 cm⁻¹ corresponde a la vibración de tensión C-H de los alcanos, a 1702 cm⁻¹ se visualiza una banda ancha producto de la tensión el doble enlace C=O característico de los compuestos carbonílicos (cetonas, ésteres, aldehídos y ácidos carboxílicos). En la región de la huella dactilar, se observa la absorción a 1463 cm⁻¹ de flexión del enlace

CH₂, además para este mismo enlace se aprecia a 758 cm⁻¹ la deformación de grupos metilenos (mayores a 4) unidos a una cadena alifática; la banda a 1215 cm⁻¹, se debe a la absorción de tensión del enlace C-O característico a grupos ésteres o ácidos.

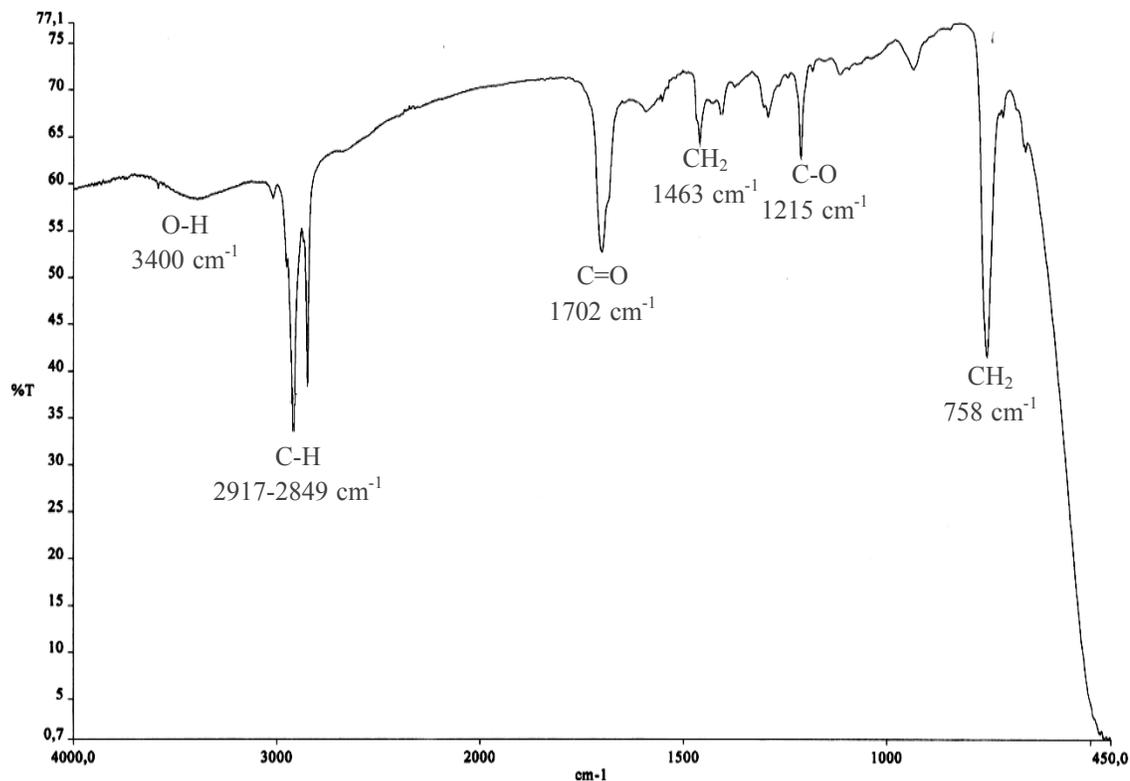


Figura 48. Espectro IR de la subfracción IV_{6.2.1} del EEP.

La Fig. 49 muestra el análisis por CG/EM, el cual permitió identificar un compuesto en mayor abundancia (posiblemente puro). El pico I corresponde al ácido n-hexadecanoico con un porcentaje de área de 95,40%; identificado a un tiempo de retención de 14,93 minutos.

El espectro de masas del ácido n-hexadecanoico (Fig. 50), se visualiza la señal del ión molecular a una relación m/z de 256 al [M⁺] que coincide con la fórmula molecular C₁₆H₃₂O₂. Así mismo, se observan las señales de los fragmentos más abundantes a m/z 60, 73 (pico base), 115, 129, 171 y 213 (Fig. 51).

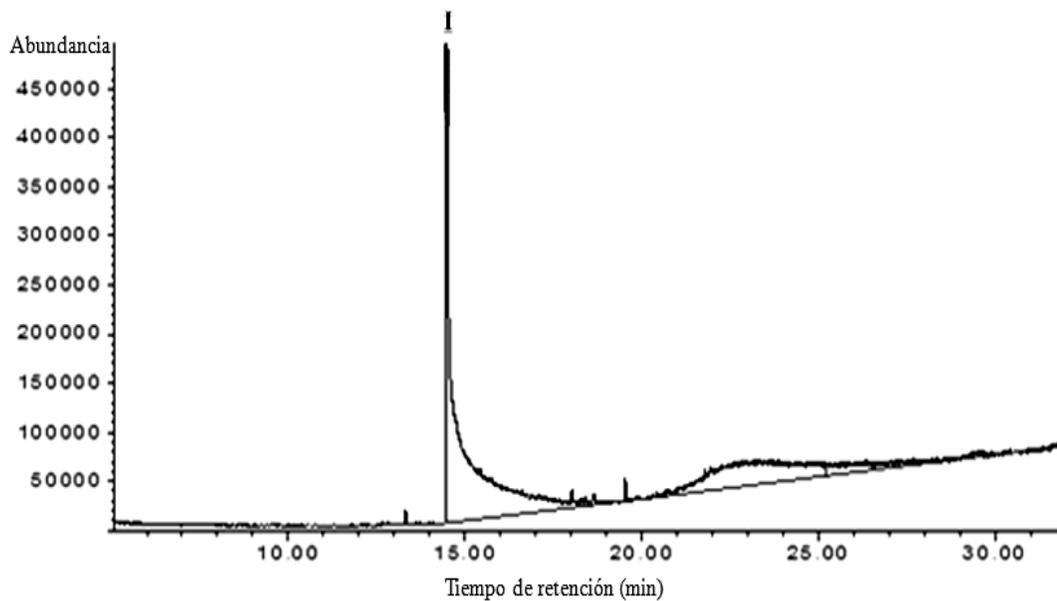


Figura 49. Cromatograma de gases de la subfracción IV_{6.2.1}.

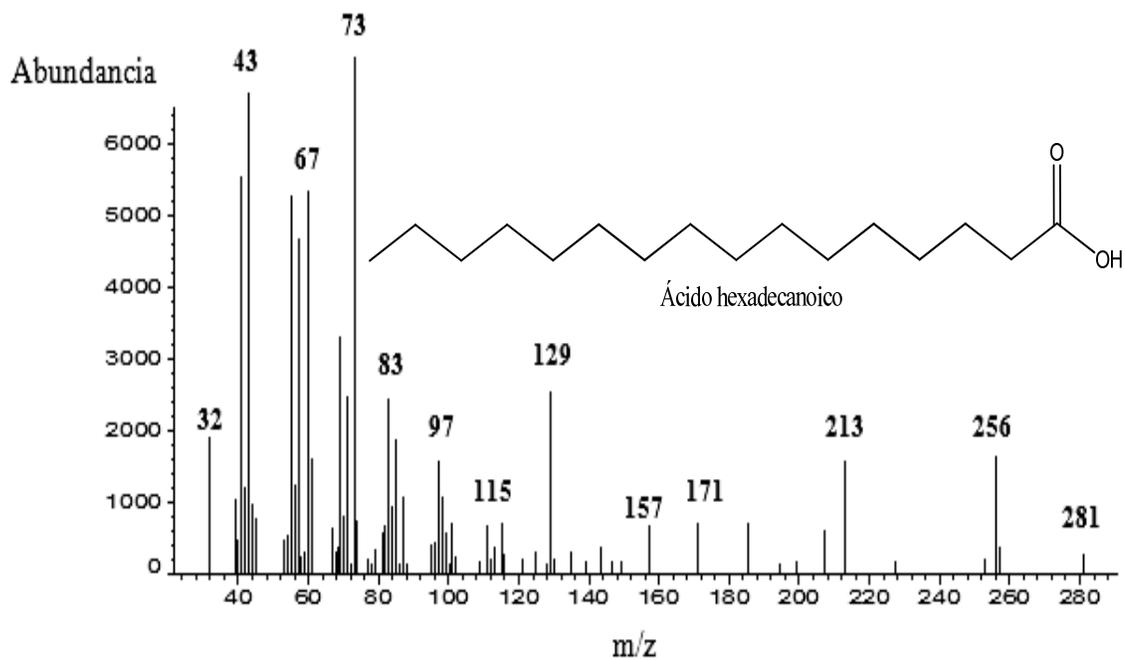


Figura 50. Espectro de masas del ácido n-hexadecanoico.

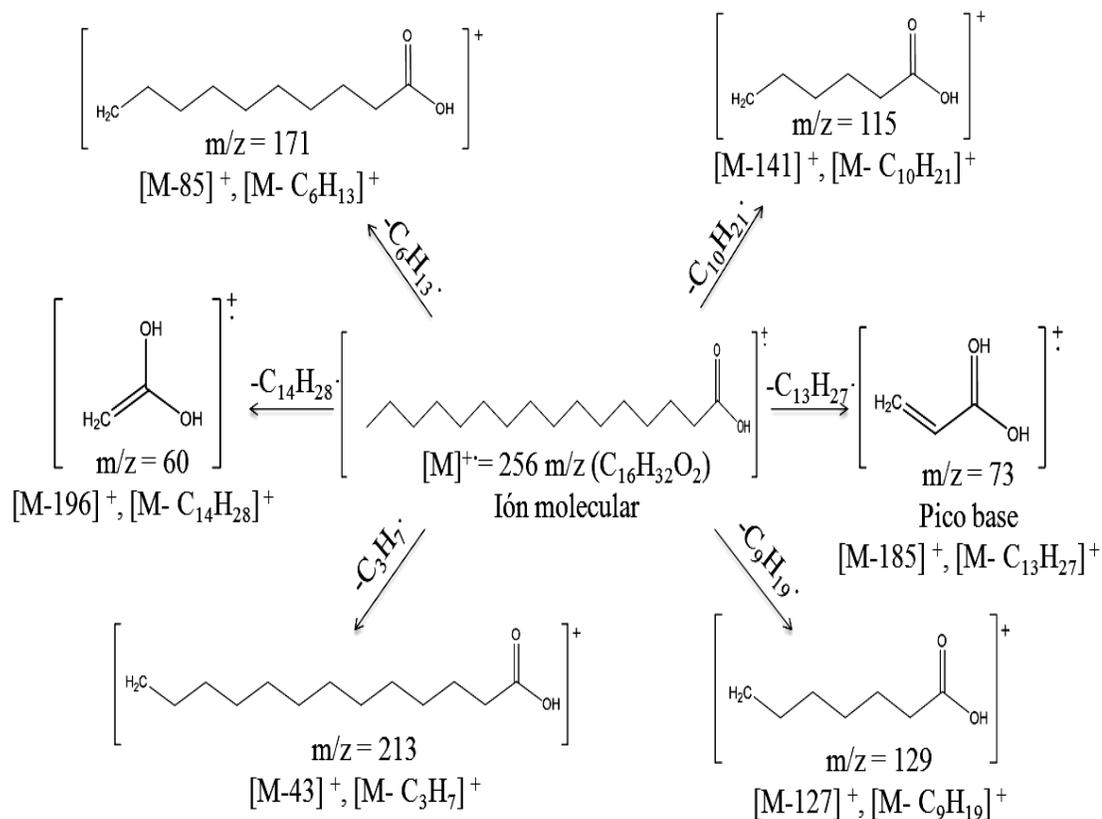


Figura 51. Patrón de fragmentación propuesto para el ácido n-hexadecanoico.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos es debido a la inhibición del transporte de membrana, lo que resulta en una carencia nutricional de las células (130). Algunos autores sugieren que los ácidos grasos son los inhibidores más efectivos frente a las bacterias Gram positivas, entre ellos los ácidos tetradecanoico y hexadecanoico son inhibidores efectivos de estas bacterias (130). Así mismo, se han reportado algunas investigaciones sobre la actividad biológica de ácidos grasos, donde se resalta la actividad antibacteriana y antifúngica de los ácidos oleico, laurico, palmítico y linoleico (120, 131 y 132). El ácido linoleico aislado de la planta *Schotia brachypelata* mostró actividad antibacteriana contra el crecimiento de las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (130). Adicionalmente, al ácido palmítico aislado de otras algas marinas también se le ha atribuido actividad antitumoral (133).

4.1.4 Fraccionamiento y análisis de la fracción V

La fracción V (sólido naranja), presentó una mancha continua al analizarse mediante CCFA. Esta fracción mostró actividad moderada contra la mayoría de las bacterias ensayadas, actuando débilmente sólo contra el crecimiento de la bacteria Gram positiva *E. faecalis* (Apéndice A, Tabla A1). Por tal motivo, se le realizó CC, empleando una bureta de dimensiones $24,7 \times 0,9 \text{ cm}^2$ como columna, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh. Para esta cromatografía se emplearon 0,2518 g de muestra y 7,55 g sílica gel en una relación de muestra: sílica de 1:30. Se utilizó como eluyente inicial EP-CHCl₃ al 90:10 v/v para empaquetar la columna; posteriormente, se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con AcOEt al 100%. En esta cromatografía se obtuvieron 26 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizándose erlenmeyers de 50 ml de capacidad (Tabla 20).

Tabla 20. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción V del EEP de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (%V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-4
EP-CHCl ₃	70-30	5-8
EP-CHCl ₃	50-50	9-11
EP-CHCl ₃	30-70	12-15
CHCl ₃	100	16-19
CHCl ₃ -AcOEt	50-50	20-23
AcOEt	100	24-26

Del fraccionamiento cromatográfico de la fracción V se obtuvieron 26 eluatos, cuyo comportamiento fue evaluado mediante CCFA, empleando como reveladores una lámpara de luz UV de onda corta y la solución ácida de molibdato de amonio; aquéllos eluatos que presentaron iguales valores de R_f se juntaron en una misma subfracción. En esta cromatografía se obtuvieron 8 subfracciones, tal como se

presenta en la Tabla 21. La masa total recuperada de la fracción V fue de 0,2419 g, lo que representa el 96,07 % de la cantidad de muestra fraccionada.

Tabla 21. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción V procedente del EEP.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
V ₁	1-4	1,53	Sólido blanco transparente
V ₂	5	4,20	Sólido blanco transparente
V ₃	6	74,60	Sólido blanco ostra
V ₄	7	73	Sólido blanco-naranja
V ₅	8-10	16,30	Sólido amarillo claro
V ₆	11-16	16,10	Sólido amarillo transparente
V ₇	17-20	29,70	Sólido amarillo
V ₈	21-26	26,50	Sólido amarillo transparente

4.1.4.1 Fraccionamiento y análisis de la subfracción V₃

La subfracción V₃ que presentó la mayor masa de las subfracciones obtenidas de la fracción V (0,0746 g), presentó una mancha continua en el análisis por CCFA, la cual fue fraccionada por CC. Para el fraccionamiento cromatográfico se utilizó 0,0643 g de muestra, empleándose como columna una bureta de dimensiones 22,5×0,6 cm², la cual fue rellena con 3,22 g de sílica gel de 35-70 mesh; la relación muestra: sílica utilizada fue de 1:50. Para empaquetar la columna se usó EP al 100%, y posteriormente, se emplearon mezclas de EP-CHCl₃ de polaridad creciente (Tabla 22).

En esta cromatografía se obtuvieron 14 eluatos, los cuales fueron analizados mediante CCFA. Aquellos eluatos que mostraron comportamientos similares (según sus R_f) fueron agrupados en una misma subfracción, obteniéndose 5 nuevas subfracciones (Tabla 23). La masa recuperada fue de 0,0587 g, lo que representa el 91,29 % del material cromatografiado.

Tabla 22. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción V₃ del EEP.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP	100	1-4
EP-CHCl ₃	90-10	5-6
EP-CHCl ₃	60-40	7-10
EP-CHCl ₃	50-50	11-12
CHCl ₃	100	13-14

Tabla 23. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción V₃ procedente del EEP.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
V _{3.1}	1-5	1	Sólido blanco transparente
V _{3.2}	6	1,30	Sólido blanco
V _{3.3}	7	22,50	Sólido blanco
V _{3.4}	8	31,70	Sólido blanco
V _{3.5}	9-14	2,20	Sólido blanco ostra

Las subfracciones V_{3.3} y V_{3.4} mostraron el mismo comportamiento mediante estudio por CCFA, por lo tanto se decidió unir estas 2 en una sola subfracción, a la cual se le realizó un fraccionamiento por CC, empleándose como columna una bureta de 17,9 cm de alto y 0,9 cm de diámetro. Para esta cromatografía, se utilizaron 0,0542 g de muestra y 2,84 g sílica gel de 35-70 mesh en una relación de muestra: sílica de 1:30. Se usó como eluyente inicial EP-CHCl₃ 90:10 v/v para empaquetar la columna; posteriormente, se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con CHCl₃ al 100%, donde se obtuvieron 20 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizándose erlenmeyers de 50 ml de capacidad (Tabla 24).

El comportamiento de cada uno de los eluatos fue evaluado mediante CCFA, usando como reveladores la solución ácida de molibdato de amonio y una lámpara de

luz ultravioleta de onda corta (100 a 280 nm). Los eluatos que presentaron iguales valores de R_f se juntaron en una misma subfracción, obteniéndose 3 subfracciones, tal como se presenta en la Tabla 25. La masa total recuperada del fraccionamiento de la subfracción $V_{3.3}$ y $V_{3.4}$ fue de 0,0342 g, lo que representa el 63,10 % de la cantidad de muestra fraccionada.

Tabla 24. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción $V_{3.3}$ y $V_{3.4}$ del EEP de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-2
EP-CHCl ₃	70-30	3-6
EP-CHCl ₃	60-40	7-10
EP-CHCl ₃	50-50	11-14
EP-CHCl ₃	30-70	15-18
CHCl ₃	100	19-20

Tabla 25. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción $V_{3.3}$ y $V_{3.4}$.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
$V_{3.3.1}$	1-4	27,6	Sólido blanco brillante
$V_{3.3.2}$	5-7	3,40	Sólido blanco transparente
$V_{3.3.3}$	8-20	3,50	Sólido blanco

La subfracción $V_{3.3.1}$ que presentó la mayor masa (0,0276 g), mostró en su análisis de CCFA una mancha ancha separada del origen acompañado de una pequeña impureza, esta subfracción fue seleccionada para realizarle un análisis de IR y CG/EM para identificar los compuestos presente en esta subfracción.

Tal como se presenta en Fig. 52, el análisis de IR demostró las vibraciones de los principales grupos funcionales en mayor proporción en la subfracción $IV_{3.3.1}$. Aproximadamente a 3400 cm^{-1} , se observa una banda muy ancha de la tensión de

grupos hidroxilos O-H, la absorción entre 2917-2849 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión C-H, a 1705 cm^{-1} se visualiza una banda ancha producto de la tensión el doble enlace C=O característico de los compuestos carbonílicos (cetonas, ésteres, aldehídos y ácidos carboxílicos). A 1463 cm^{-1} se observa la absorción de flexión del enlace CH_2 , además para este mismo enlace se aprecia la absorción a 759 cm^{-1} de la deformación de grupos metilenos mayores a 4 ; la banda a 1215 cm^{-1} se debe a la absorción de tensión del enlace C-O característico a grupos ésteres o ácidos.

El análisis por CG/EM mostró que esta subfracción estaba formada por un compuesto de mayor abundancia (Fig. 53), con un porcentaje de área bajo la curva de 94,79% a un tiempo de retención de 14,71 minutos; el cual fue identificado como el ácido hexadecanoico. Este compuesto ha sido caracterizado en subfracciones anteriores como componente mayoritario, por lo que la actividad antibacteriana (bacterias Gram negativas y positivas) y citotóxica (frente a los huevos del erizo *E. lucunter*) observada tanto en el EEP, así como en sus fracciones, puede ser atribuida en parte a la presencia de este ácido graso.

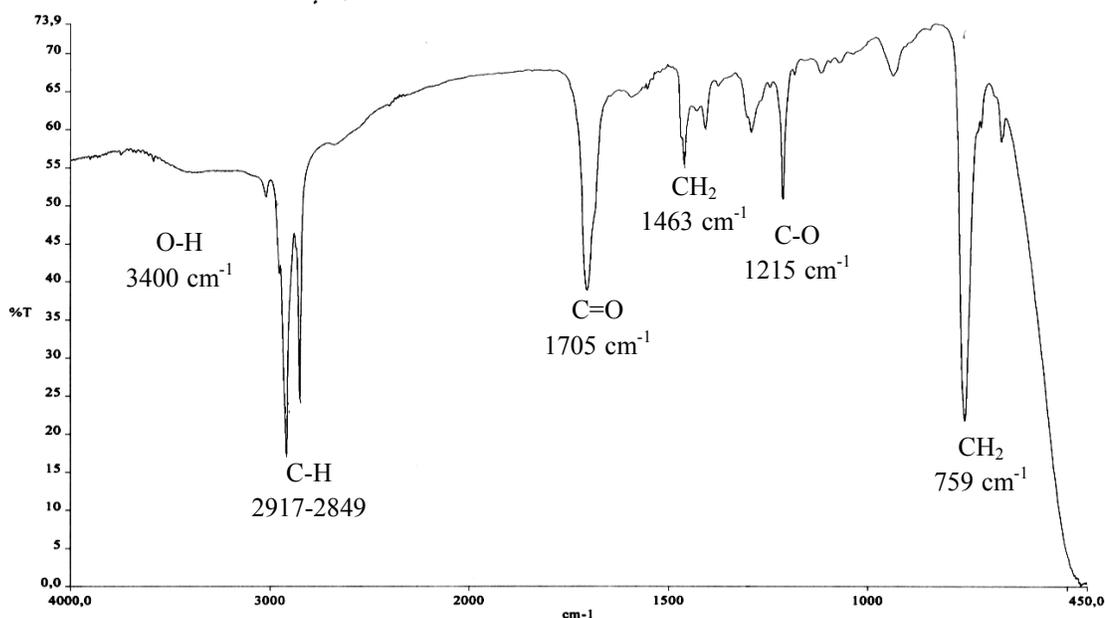


Figura 52. Espectro IR de la subfracción V_{3.3.1}.

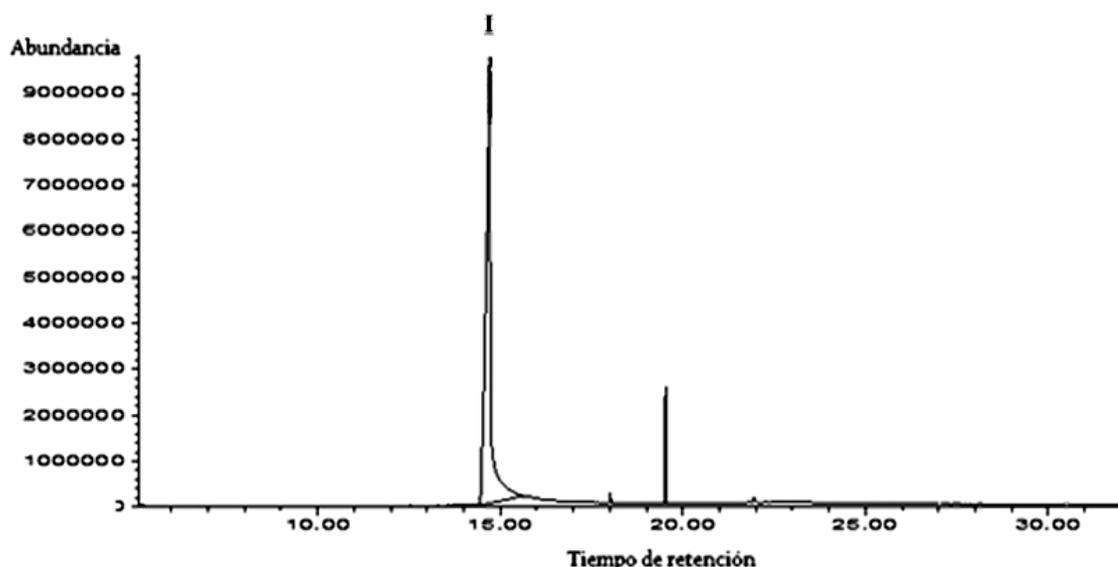


Figura 53. Cromatograma de gases de la subfracción V_{3.3.1}.

4.1.4.2 Fraccionamiento y análisis de la subfracción V₄

La subfracción V₄ fue la segunda muestra con mayor masa de las subfracciones obtenidas de la fracción V (0,0730 g); en el análisis por CCFA, esta subfracción presentó una mancha continua bastante concentrada, por tal motivo, se decidió continuar con su fraccionamiento cromatográfico. Para la CC se usaron 0,0530 g de muestra, utilizándose como columna una bureta de 19 cm de alto y 0,7 cm de diámetro que fue rellena con 2,65 g de sílica gel de 35-70 mesh; la relación muestra: sílica utilizada fue de 1:50. Para empaquetar la columna se usó EP-CHCl₃ en una relación 90:10 v/v y luego, se emplearon mezclas de EP-CHCl₃ en diferentes proporciones, hasta finalizar con CHCl₃ al 100% (Tabla 26).

En esta cromatografía se recolectaron 12 eluatos, los cuales fueron analizados mediante CCFA, los que presentaron iguales valores de R_f se juntaron en una misma subfracción. En la Tabla 27, se muestran las 4 subfracciones en esta cromatografía. La masa recuperada fue de 0,0455 g, lo que representa el 85,85 % del material cromatografiado.

La placa del análisis por CCFA de la subfracción V_{4.2}, presentó una estela

constituida por una mancha concentrada encima de ella. Debido al comportamiento de la subfracción V_{4.2} y además, que presentó la mayor masa, se seleccionó esta muestra para realizarle análisis de IR y CG/EM.

Tabla 26. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción V₄ del EEP.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-4
EP-CHCl ₃	70-30	5-8
EP-CHCl ₃	50-50	9-10
CHCl ₃	100	11-12

Tabla 27. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción V₄ procedente del EEP.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
V _{4.1}	1-4	1,00	Sólido blanco- amarillento
V _{4.2}	5-6	34,90	Sólido blanco ostra
V _{4.3}	7-9	7,20	Sólido amarillo
V _{4.4}	10-12	2,40	Sólido amarillo pálido

En el análisis de IR de la subfracción V_{4.2}, aproximadamente a 3019 cm⁻¹ se observa la absorción de la vibración tensión C-H para grupos olefinicos (*sp*²), asimismo la absorción observada entre 2917-2849 cm⁻¹ corresponde a esta misma tensión pero para alcanos (*sp*³). A 1705 cm⁻¹ se visualiza una banda producto de la tensión el doble enlace C=O característico de los compuestos carbonílicos (ácidos, cetonas, ésteres y aldehídos); a 1466 cm⁻¹ se aprecia la absorción de flexión del enlace CH₂, además para este mismo enlace se observa la absorción a 759 cm⁻¹ de la deformación de grupos metilenos mayores a 4; la banda intensa a 1215 cm⁻¹ fue originada producto de la absorción de tensión del enlace C-O característico de grupos ésteres o ácidos. En la Fig. 54, se muestra el espectro de IR de la subfracción V_{4.2},

donde se detalla cada una de estas señales.

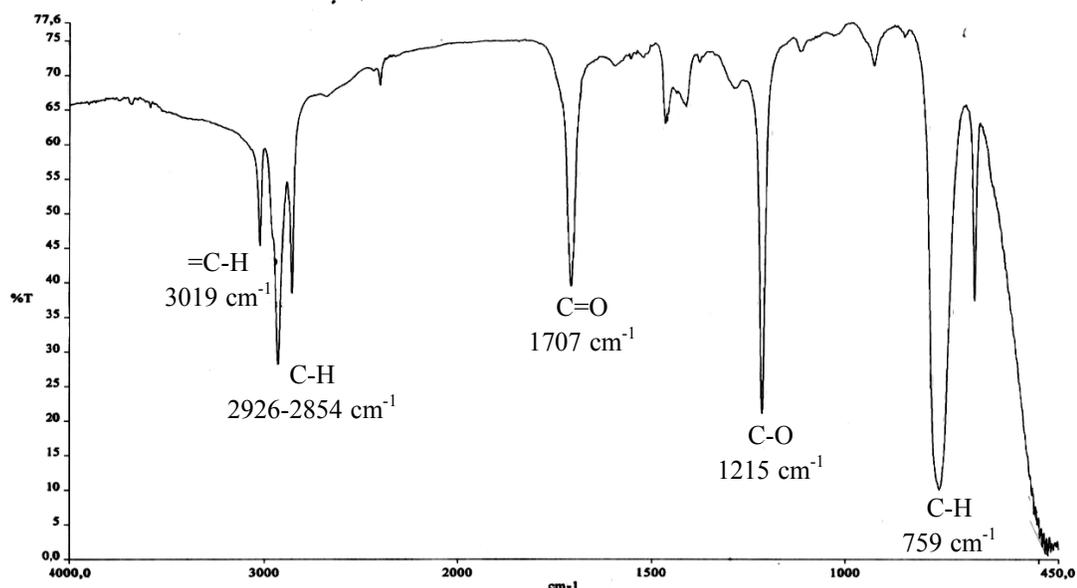


Figura 54. Espectro IR de la subfracción V_{4.2}.

El análisis por CG-EM de la subfracción V_{4.2}, mostró la existencia de un solo compuesto (Fig. 55); siendo identificado el ácido hexadecanoico (probabilidad igual al 99%) con un tiempo de retención de 14,62 minutos y un área de 98,65%. Aunque el análisis de IR reveló la existencia de doble enlace en la subfracción V_{4.2}, en el análisis de CG/EM no se evidenció este grupo funcional, por lo que la banda detectada para grupos olefinicos, pudo ser originada por la presencia de alguna impureza presente en muy poca abundancia.

La identificación de este ácido graso en esta subfracción concuerda con otras investigaciones, donde se ha demostrado que los ácidos grasos de C₁₆ y C₁₈ suele ser los más abundantes en las algas verdes (120). Así mismo, se ha estudiado la actividad antibacteriana de este ácido, el cual ha sido activo contra el crecimiento de bacterias Gram negativas y positivas (113, 120, 131, 132 y 134). Debido a que éste ácido ha sido identificado en la mayoría de las fracciones del EEP, la actividad antibacteriana

observada puede ser atribuida en parte, a la presencia de este compuesto en el extracto. Es importante resaltar que se ha comprobado actividad antileucémica de mezclas de ácidos grasos en células Jurkat (134).

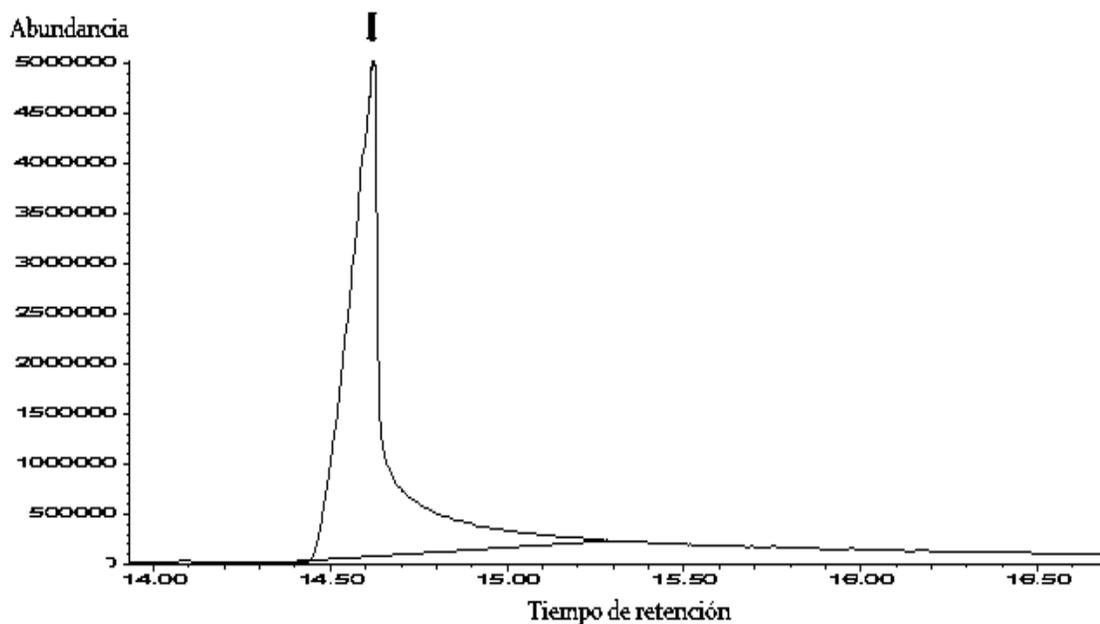


Figura 55. Cromatograma de gases de la subfracción V_{4.2}.

4.1.4.3 Análisis de la subfracción V₅

La subfracción V₅ sólida y de color blanco-amarillento mostró en su placa de análisis por CCFA, una mancha concentrada a un R_f de 0,75 acompañada por una estela en menor concentración, según la coloración mostrada al revelarse con la solución ácida de molibdato de amonio. En esta subfracción se obtuvo una masa de 0,0163 g, por lo que no se le pudo realizar una separación cromatográfica; por tal motivo se le realizó un análisis por CG/EM.

Tal como se presenta en la Fig. 56, en el estudio por CG/EM se lograron identificar una mezcla de ácidos grasos. La señal representada como pico I, se observó a un tiempo de retención de 13,40 min y fue señalado como el ácido tetradecanoico con un área de 3,10%; seguido de una banda de mayor abundancia y

porcentaje de área (94,88%) que fue identificado a un tiempo de retención de 15,79 min, correspondiente al ácido hexadecanoico (Tabla 28).

Tabla 28. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la subfracción V₅, mediante CG/EM.

Pico	Compuesto Identificado	M ⁺ (m/z)	Tr(min)	% P	% Área
I	Ácido tetradecanoico	228	13,40	99	3,10
II	Ácido hexadecanoico	256	15,79	99	94,88

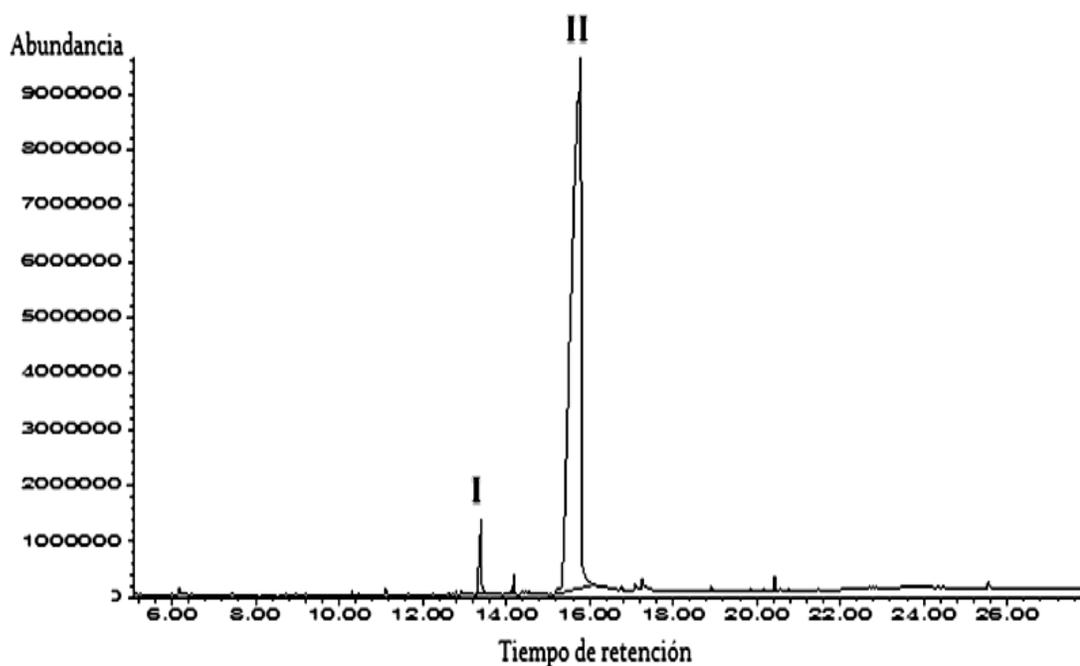


Figura 56. Cromatograma de gases de la subfracción V₅.

4.1.5 Fraccionamiento y análisis de la fracción VI

La fracción VI que se obtuvo como un sólido negro, presentó una mancha continua, al analizarse mediante CCFA, lo cual demostró que ésta estaba era una mezcla muy compleja. Esta fracción mostró actividad moderada contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus subsp aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, siendo inactivas contra el crecimiento de

la bacterias *Yersinia sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Micrococcus luteus* (Apéndice A, Tabla A1); por tal motivo, esta fracción fue seleccionada para realizarle fraccionamiento cromatográfico.

Para la CC, se utilizó una bureta de 35,2 cm de alto y 1,4 cm de diámetro como columna, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh, empleándose 0,5414 g de muestra y 15,19 g sílica gel en una relación de muestra: sílica de 1:30. La CC se inició con EP al 100% para empaquetar la columna; posteriormente, se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con AcOEt-CH₃OH 1:1 v/v. En esta cromatografía se obtuvieron 38 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizándose erlenmeyers de 50 ml de capacidad (Tabla 29).

Tabla 29. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción VI del EEP de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP	100	1-7
EP-CHCl ₃	60-40	8-15
EP-CHCl ₃	50-50	16-20
CHCl ₃	100	21-23
CHCl ₃ -AcOEt	40-60	24-29
AcOEt	100	30-34
AcOEt-CH ₃ OH	50:50	35-38

El comportamiento de los eluatos fue evaluado mediante CCFA, empleándose como reveladores una lámpara de luz UV de onda corta y la solución ácida de molibdato de amonio; aquellos eluatos que presentaron iguales valores de R_f se juntaron en una misma subfracción. En esta cromatografía se obtuvieron 6 subfracciones, tal como se presenta en la Tabla 30. La masa total recuperada de la fracción VI fue de 0,4382 g, lo que representa el 80,94 % de la cantidad de muestra fraccionada.

Tabla 30. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la fracción VI procedente del EEP.

Fracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
VI ₁	1-12	2,80	Sólido amarillo transparente
VI ₂	13-16	14,30	Sólido blanco transparente
VI ₃	17-20	6,10	Sólido naranja
VI ₄	21-24	137,7	Sólido amarillo pálido
VI ₅	25-31	165,5	Sólido marrón claro transparente
VI ₆	32-38	111,80	Sólido marrón oscuro transparente

4.1.5.1 Fraccionamiento de la subfracción VI₄

La subfracción VI₄ (sólido amarillo pálido) de masa 0,1377 g, presentó una mancha continua en el análisis por CCFA, por lo tanto, esta subfracción fue seleccionada para realizarle CC. Para el fraccionamiento cromatográfico se empleó como columna una bureta de dimensiones 20,4×0,8 cm², la cual fue rellena con 3,50 g de sílica gel de 35-70 mesh; la relación muestra: sílica utilizada fue de 1:30. Para empaquetar la columna se usó EP-CHCl₃ en una proporción 90:10 v/v y posteriormente, se utilizaron mezclas de EP-CHCl₃ de polaridad creciente, hasta culminar con una mezcla de CHCl₃-AcOEt 50:50 v/v (Tabla 31).

Tabla 31. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción VI₄ del EEP.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP-CHCl ₃	90-10	1-4
EP-CHCl ₃	70-30	5-8
EP-CHCl ₃	50-50	9-12
EP-CHCl ₃	30-70	13-16
CHCl ₃	100	16-18
CHCl ₃ -AcOEt	50:50	19-20

En la cromatografía se obtuvieron 20 eluatos, los cuales fueron analizados mediante CCFA. Tal como se muestra en la Tabla 32 se obtuvieron 5 subfracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a la similitud de sus R_f . La masa recuperada fue de 0,1210 g, lo que representa el 87,88 % del material cromatografiado.

Tabla 32. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción VI₄ procedente del EEP.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
VI _{4.1}	1-4	35,50	Sólido blanco- amarillento
VI _{4.2}	5-6	71,30	Sólido amarillo brillante
VI _{4.3}	7-9	6,40	Sólido amarillo
VI _{4.4}	10-14	5,20	Sólido amarillo transparente
VI _{4.5}	15-20	2,60	Sólido marrón transparente

Las subfracciones VI_{4.1} y VI_{4.2} mostraron el mismo comportamiento mediante estudio por CCFA, por lo tanto se decidió unir estas 2 en una sola subfracción, a la cual se le realizó un fraccionamiento por CC, empleándose como columna una bureta de 22,7 cm de alto y 0,6 cm de diámetro. Para esta cromatografía, se utilizaron 0,1068 g de muestra y 3,20 g sílica gel de 35-70 mesh en una relación de muestra: sílica de 1:30. Se usó como eluyente inicial EP al 100%, posteriormente se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con CHCl₃ al 100%, donde se obtuvieron 22 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 15 ml, utilizándose erlenmeyers de 25 ml de capacidad (Tabla 33).

El comportamiento de cada uno de los eluatos fue evaluado mediante CCFA, usando como reveladores la solución ácida de molibdato de amonio y una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (100 a 280 nm). Los eluatos que presentaron iguales valores de R_f se unieron en una misma fracción, obteniéndose 6 subfracciones del fraccionamiento de la subfracción VI_{4.1} y VI_{4.2} (Tabla 34). La masa total recuperada de dicho fraccionamiento fue de 0,0816 g, lo que representa el 76,40 % de la cantidad

de muestra fraccionada.

Tabla 33. Fraccionamiento cromatográfico de la subfracción VI_{4.1} y VI_{4.2} del EEP de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP	100	1-4
EP-CHCl ₃	90-10	5-10
EP-CHCl ₃	60-40	11-16
EP-CHCl ₃	40-60	17-20
CHCl ₃	100	21-22

Tabla 34. Subfracciones obtenidas de la separación cromatográfica de la subfracción VI_{4.1} y VI_{4.2}.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
VI _{4.1.1}	1-5	1	Sólido blanco transparente
VI _{4.1.2}	6-10	1,80	Sólido blanco transparente
VI _{4.1.3}	11	14,20	Sólido blanco ostra
VI _{4.1.4}	12	30,90	Sólido blanco perlado brillante
VI _{4.1.5}	13	23,20	Sólido amarillo claro brillante
VI _{4.1.6}	14-22	10,50	Sólido beige

La subfracción VI_{4.1.3} mostró en su análisis por CCFA, una estela poco concentrada que al finalizar su recorrido a un R_f de 0,21; se concentraba una mancha mas acentuada justo en el borde de ella (según revelado con la solución ácida de molibdato de amonio), también se visualizó una mancha a un R_f de 0,86 que podía ser purificada. A esta subfracción se le realizó CCFP para lograr separar algunas de las manchas observadas.

La CCFP fue realizada empleando sílica gel de 60 mesh, la cual fue colocada sobre una placa de vidrio de 20×20 cm² con 1 mm de grosor, como eluyente se empleó una mezcla de EP-CHCl₃ en una proporción 10:90 v/v. Posteriormente, se

colocó los 0,0142 g de la subfracción VI_{4.1.3} disuelta en CHCl₃. En esta cromatografía se observaron 5 bandas en la lámpara UV de onda corta, donde una de ellas se mostraba con mayor intensidad a un R_f de 0,65. La banda más concentrada fue separada de la sílica y las demás fueron unidas en una misma subfracción, obteniéndose finalmente 2 subfracciones en esta cromatografía (Tabla 35).

Tabla 35. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción VI_{4.1.3} del EEP.

Subfracciones	R _f	Masa (mg)
VI _{4.1.3.1}	0,65	1
VI _{4.1.3.2}	0,89	2,3

La masa recuperada en esta cromatografía fue de 0,0033 g, lo que representa el 23,24% del rendimiento. El análisis por CCFA de la subfracción VI_{4.1.3.1} mostró una mancha purificada, pero esta no fue estudiada por RMN ya que no poseía la masa requerida para la realización de éste análisis.

La subfracción VI_{4.1.4} mostró en su análisis por CCFA una estela poco concentrada, seguido de 2 manchas separadas con R_f 0,52 y 0,59, las cuales que podían ser purificadas; por tal motivo, a esta subfracción se le realizó CCFP. Para esta separación cromatográfica se utilizó sílica gel de 60 mesh, la cual fue colocada sobre una placa de vidrio de 20×20 cm² con 1 mm de grosor, como eluyente se empleó una mezcla de EP-CHCl₃ en una proporción 10:90 v/v. Posteriormente, se colocó los 0,0309 g de la subfracción VI_{4.1.4} disuelta en CHCl₃. En esta cromatografía se observaron 4 bandas en la lámpara UV de onda corta, donde una de ellas se mostraba con mayor intensidad a un R_f de 0,37. La banda más concentrada fue separada de la sílica y las demás se unieron en una misma subfracción, obteniéndose finalmente 2 subfracciones en esta cromatografía (Tabla 36).

La masa recuperada en esta cromatografía fue de 0,003 g, lo que representa el 9,70% del rendimiento; este bajo rendimiento se debe al uso de un solvente no adecuado para la extracción de las bandas separadas por CCFP, por lo tanto no se

pudo separar completamente los compuestos contenidos en la sílica gel de 60 mesh. El análisis por CCFA de las subfracciones VI_{4.1.4.1} y VI_{4.1.4.2} mostró una mezcla, pero no fue realizado un análisis por CG/EM, ya que no poseía la masa requerida para la realización de este estudio.

Tabla 36. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción VI_{4.1.4} del EEP.

Subfracciones	R _f	Masa (mg)
VI _{4.1.4.1}	0,65	1,30
VI _{4.1.4.2}	0,89	1,70

Por su parte la subfracción VI_{4.1.5} (sólido amarillo brillante), en su estudio por exhibió en la CCFA una mancha continua que solapaba 5 bandas separadas a R_f 0,23; 0,26; 0,38; 0,45 y 0,63. Por lo tanto, a esta subfracción de masa 0,0232 se le realizó un análisis por CG/EM, donde se lograron identificar 4 señales de mayor intensidad a tiempos de retención 9,96; 13,28; 14,56 y 18,01 minutos (Fig. 57).

El pico I con un área de 3,22% corresponde al terpenoide 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona, seguido del 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona con un área de 1,66%, esta cetona también fue identificada en la fracción II. Con el mayor porcentaje de área (79,58%) se identificó el ácido hexadecanoico (pico III), cuyo compuesto ha sido caracterizado en la mayoría de las fracciones provenientes del EEP; y por último, se identificó el 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido, que también fue detectado en la subfracción IV₃ (Tabla 37).

En el espectro de masas del 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona (Fig. 58), se observa la señal del ión molecular [M⁺] a una relación m/z 180, que coincide con la fórmula molecular C₁₁H₁₆O₂, lográndose identificar los picos de los iones de mayor abundancia a m/z 43, 67, 95, 111 (pico base), 124 y 137.

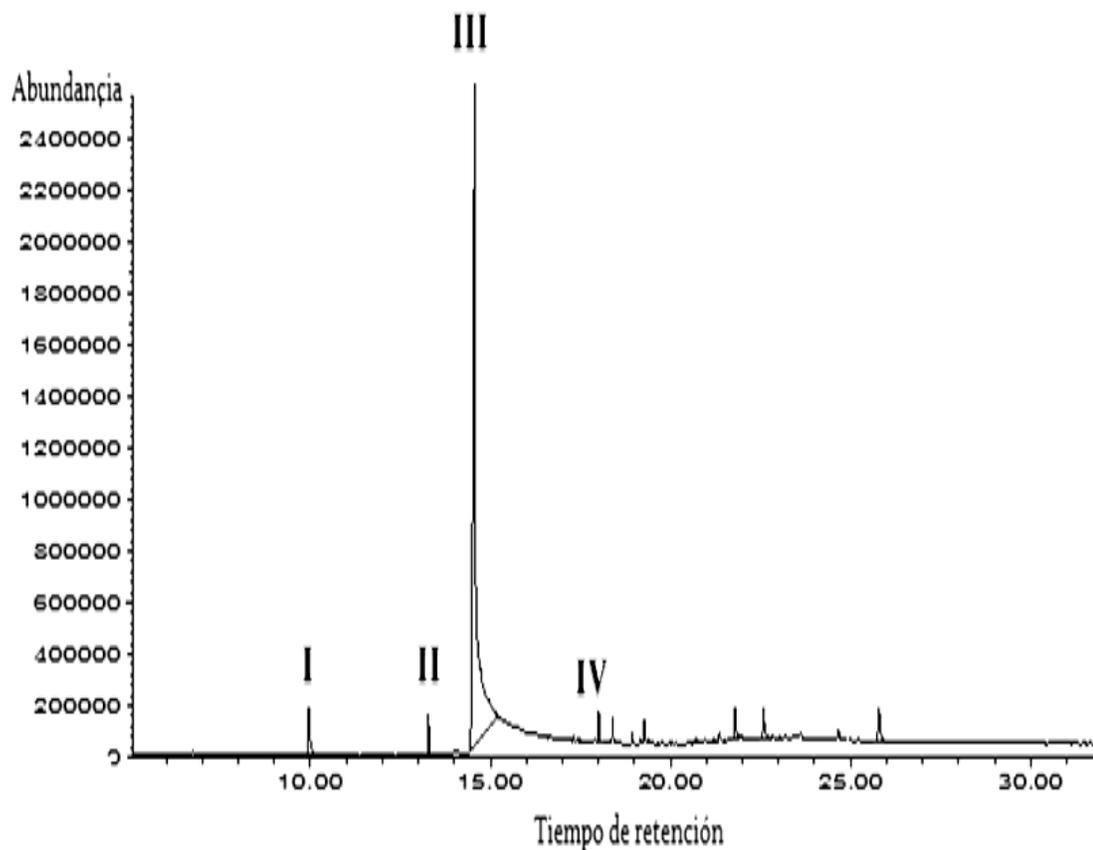


Figura 57. Cromatograma de gases de la subfracción VI_{4.1.5}.

Tabla 37. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la subfracción VI_{4.1.5}, mediante CG/EM.

Pic o	Compuesto Identificado	M ⁺ (m/z)	Tr(min)	% P	% Área
I	4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro- 2(4H)-benzofuranona	180	9,96	98	3,22
II	6,10,14-tetrametil-2- pentadecanona	268	13,28	91	1,66
III	Ácido hexadecanoico	256	14,56	99	79,58
IV	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4- olido	324	18,01	91	1,24

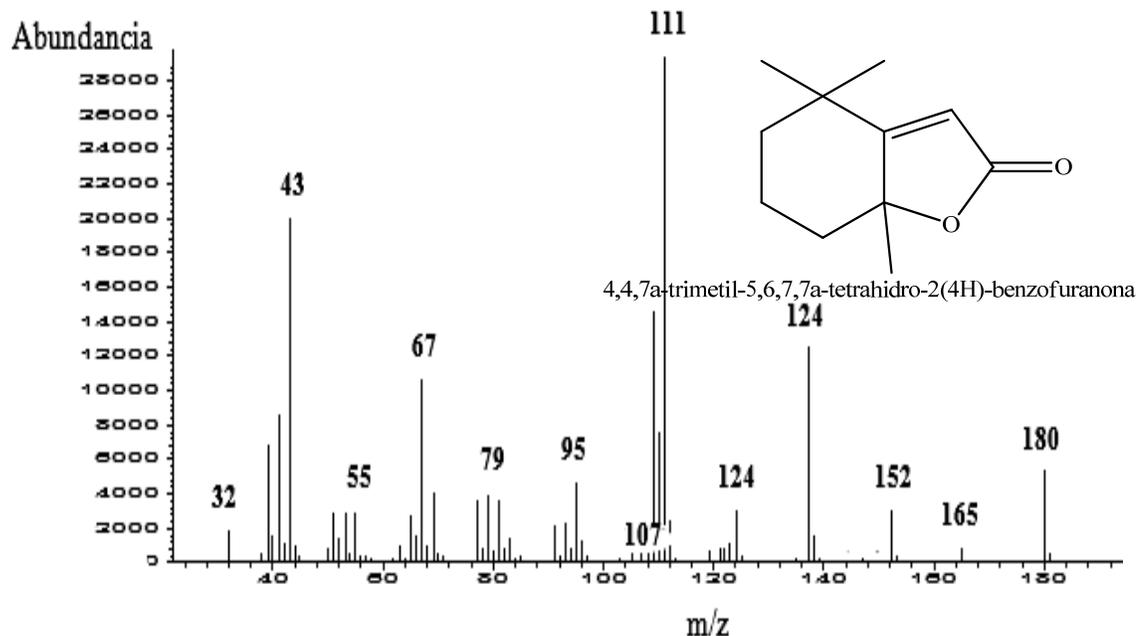


Figura 58. Espectro de masas del 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona.

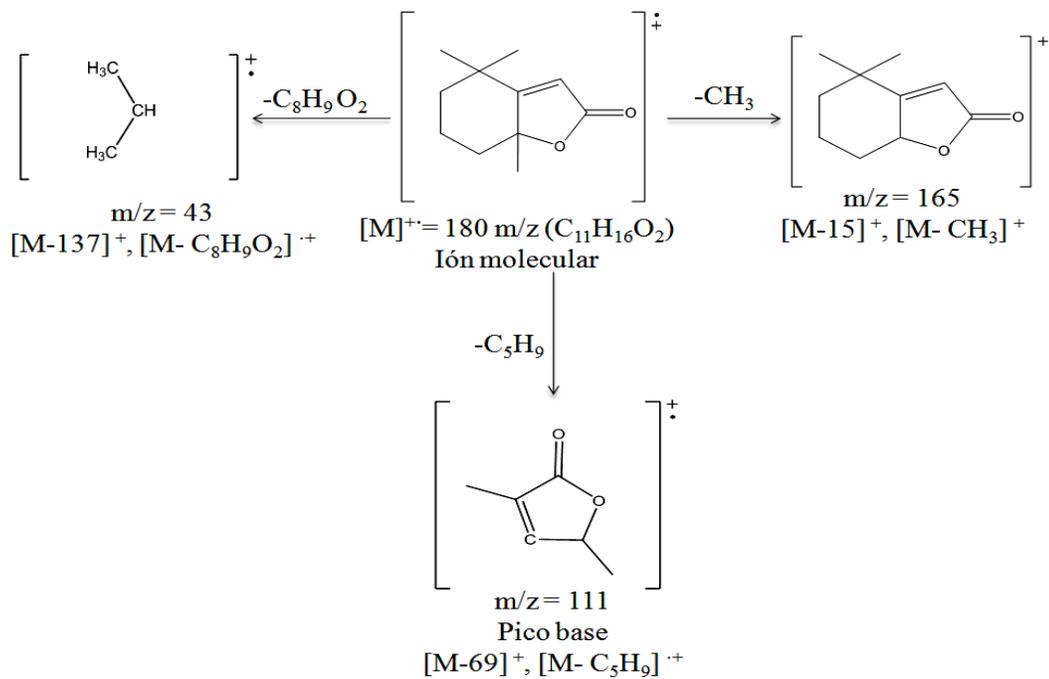


Figura 59. Patrón de fragmentación propuesto para 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona.

Los carotenoides son el grupo de pigmentos más ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo identificados en organismos fotosintéticos y no fotosintéticos como: plantas, algas, hongos, bacterias, y al menos en una especie de cada forma de vida de animal. Por ejemplo las Chlorophytas se caracterizan por sintetizar carotenoides acetilénicos, como aloxantina, monodoxantina y crocoxantina (135).

El dihidroactinidiolido (4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona) es un carotenoide volátil, perteneciente a la familia de los terpenos (136). Este compuesto ha sido identificado en los aceites esenciales de las plantas *Nepeta cataria*, *N. nepetella*, *Actinidia polygama*, en el alga *Cladophora vagabunda*, y en las secreciones defensivas de algunas hormigas y escarabajos; además que se demostró que este compuesto parece ser uno de los responsables de la atracción de los gatos a la planta *Actinidia macrosperma* (137). Aunque los terpenoides suelen encontrarse en bajas concentraciones en las algas, el dihidroactinidiolido fue identificado como uno de los componentes volátiles de las fracciones del alga *Corallina mediterránea* recolectada en el Mar Negro (136). Así mismo, el alga roja *Delisea pulchra* ha demostrado producir algunas 2(5H)-furanonas que inhiben el asentamiento y colonización de micro y macroorganismos del encrustamiento de estas especies en su superficie (138).

Los iones originados de la ruptura del compuesto 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona se muestra en la Fig. 59, donde se detalla la formación de los fragmentos de los picos más abundantes.

4.2 Aislamiento y análisis de los principales constituyentes químicos del extracto obtenido en acetato de etilo

El fraccionamiento cromatográfico del extracto obtenido acetato de etilo, fue realizado por cromatografía de columna (CC), utilizando una columna de vidrio de dimensiones 42 cm de largo y 2 cm de diámetro, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh. Se emplearon 2,20 g de EAE y 110,00 g de sílica gel en una relación

de muestra: sílica de 1:50. La cromatografía se inició con éter de petróleo al 100%; posteriormente, se emplearon como eluyentes, mezclas de solventes de polaridad ascendente, en diferentes proporciones de volúmenes EP-AcOEt, AcOEt, AcOEt-CH₃OH y por último CH₃OH. En esta cromatografía se obtuvieron 40 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 75 ml en erlenmeyers de 125 ml de capacidad para cada eluato (Tabla 38).

Tabla 38. Fraccionamiento cromatográfico del EAE de *C. racemosa*.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
EP	90-10	1-5
EP-AcOEt	70-30	6-12
EP-AcOEt	50-50	13-23
AcOEt	100	24-30
AcOEt-CH ₃ OH	50-50	31-36
CH ₃ OH	100	37-40

El comportamiento de cada uno de los eluatos, se analizó por CCFA, usando como eluyentes los mismos solventes utilizados en la cromatografía de columna. Como reveladores, se utilizaron una solución ácida de molibdato de amonio y una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (100 a 280 nm). Los eluatos que presentaron iguales valores de R_f se unieron en una sola fracción, obteniéndose 8 fracciones en esta cromatografía, tal como se muestra en la Tabla 39. La cantidad de muestra orgánica recuperada, fue de 2,01 g; lo que corresponde a un 91,36% de rendimiento del material cromatografiado.

Las fracciones resultantes en esta cromatografía, fueron analizadas por CCFA para observar el comportamiento de los componentes químicos presentes en cada una de ellas. De todas las fracciones obtenidas del EAE, solo las fracciones A, B, C, D y E fueron seleccionadas para continuar con su fraccionamiento cromatográfico (Fig. 60), ya que éstas presentaron manchas definidas con valores de R_f distantes en las

placas de CCFA.

Tabla 39. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto en acetato de etilo.

Fracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
A	1-7	106,70	Aceite marrón claro
B	8	66,80	Sólido marrón claro
C	9-14	710,80	Sólido negro
D	15-20	355,90	Sólido verde oscuro
E	21-27	280,33	Sólido verde oscuro
F	28-30	77,20	Sólido marrón
G	31-34	287,20	Sólido marrón oscuro
H	35-40	128,30	Sólido verde oscuro

Para llevar a cabo un fraccionamiento biodirigido a las fracciones A, B, C y D se le realizó pruebas de actividad antibacteriana y letalidad en *A. salina*. La citotoxicidad en huevos de erizo de mar *Lytechinus variegatus* sólo fue evaluado en las fracciones A, B y C. Tal como se muestra en el Apéndice B, Tabla B1; en el bioensayo de letalidad solo la fracción D presentó actividad tóxica frente a este crustáceo a las 24 horas, con un CL_{50} de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; sin embargo, a las 48 horas de exposición todas las fracciones mostraron letalidad, siendo las fracciones C y D las que mostraron mayor actividad, con un CL_{50} de $0,00$ y $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente.

La actividad citotóxica de las fracciones A, B y C frente a los huevos del erizo de mar *L. variegatus*, fue evaluada desde la formación del cigoto hasta su desarrollo a 16 blastómeros, donde se obtuvo una capacidad de fertilización en un 98% (control) (Apéndice B, Figura B1). Todas las fracciones evaluadas, permitieron la formación de la membrana de fecundación alrededor de un 97%; es decir no afectó la formación del cigoto. En el transcurso del desarrollo embrionario del erizo, se observaron malformaciones y divisiones mitóticas incompletas; tales como, desincronización en la división celular, deformación en la membrana celular, divisiones mitóticas

alteradas y células con blastómeras poco redondeadas (Apéndice B, Figura B2). Ninguna de las fracciones ensayadas presentó actividad antibacteriana.

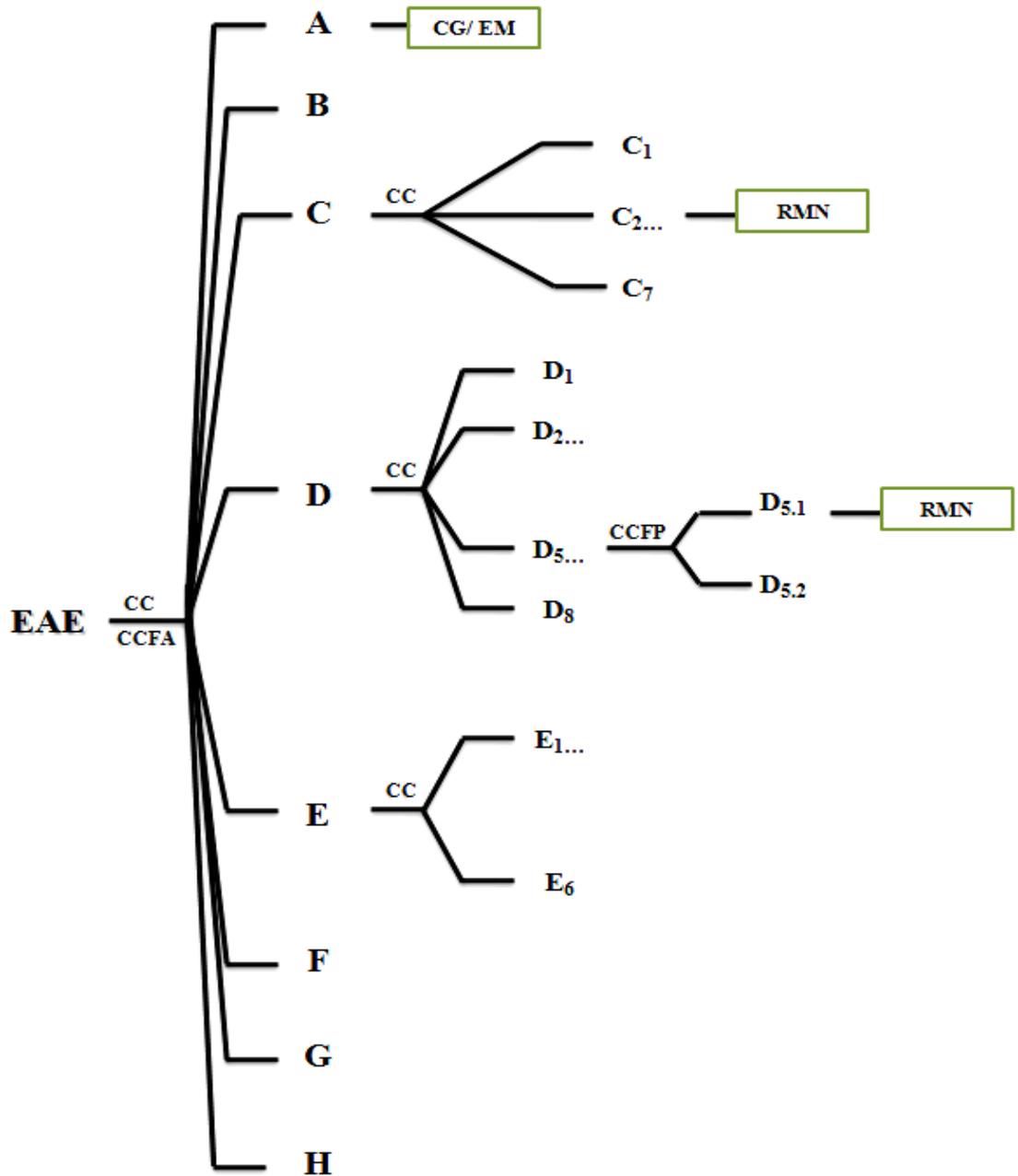


Figura 60. Esquema de fraccionamiento y análisis de los compuestos químicos del extracto obtenido en acetato de etilo del alga *C. racemosa*.

4.2.1 Análisis de la fracción A

La fracción A (aceite marrón claro) en su análisis por CCFA, presentó una mancha bien concentrada acompañada de una estela en menor concentración, según el revelador de molibdato de amonio. Para evitar la pérdida de masa del componente mayoritario observado en la placa de CCFA, se decidió analizar esta fracción por CG/EM para lograr caracterizar en lo posible los compuestos presentes en ella.

El análisis por CG/EM de la fracción A, mostró la existencia de una serie de compuestos; siendo identificado como componentes mayoritarios una mezcla de ésteres, perteneciente a los grupos de los ftalatos y un éster de ácido graso (Fig. 61).

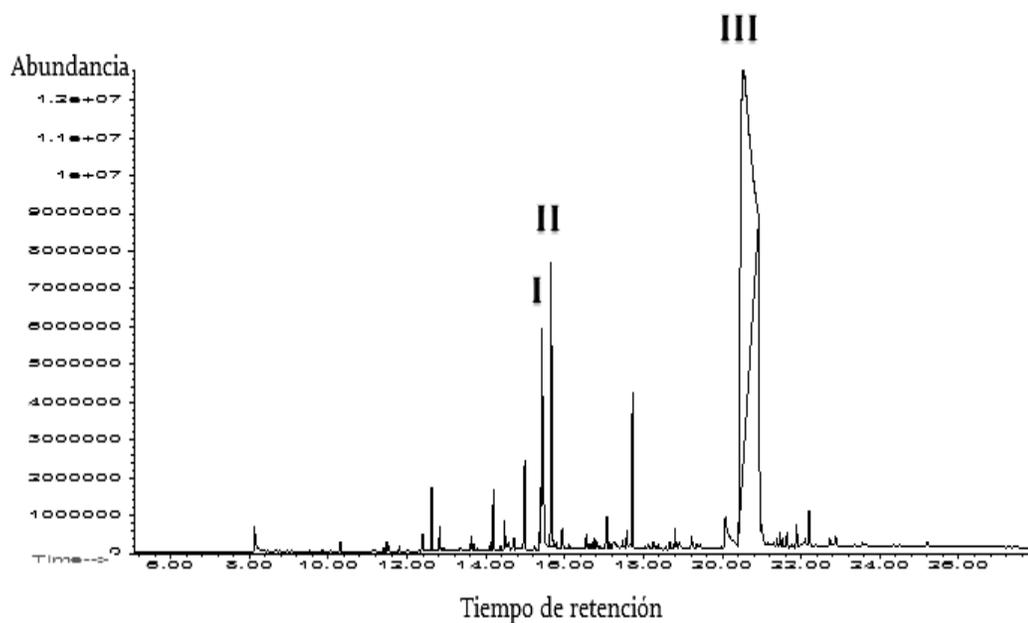


Figura 61. Cromatograma de gases de la fracción A.

El primer compuesto de este cromatograma representado como pico I, fue identificado como el ftalato de dibutilo a un tiempo de retención de 15,43 minutos y con un área de 3,28 %. La segunda señal de este cromatograma (pico II), corresponde al éster etílico del ácido hexadecanoico, el cual fue caracterizado a un tiempo de retención de 15,68 minutos y de área 4,98%. El pico III que presentó el mayor

porcentaje de abundancia y área (40,98%) de todos los compuestos identificados, corresponde al éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencendicarboxílico (Tabla 40).

Tabla 40. Compuestos identificados con mayor porcentaje de abundancia en la fracción A, mediante CG/EM.

Pico	Compuesto Identificado	M ⁺ (m/z)	Tr(min)	% P	% Área
I	Ftalato de dibutilo	278	15,43	95	3,28
II	Éster etílico del ácido hexadecanoico	284	15,68	97	4,98
III	Éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico	278	20,54	91	40,98

Tr (min): Tiempo de retención en minutos; %P: Porcentaje de probabilidad.

En la Fig. 62, se muestra el espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico, en el cual se observa la señal del ión molecular a una relación m/z de 284, que concuerda con la fórmula molecular C₁₈H₃₆O₂ y cuya ruptura originó los picos de los fragmentos más abundantes a m/z 241, 157, 115, 88 (pico base), 73.

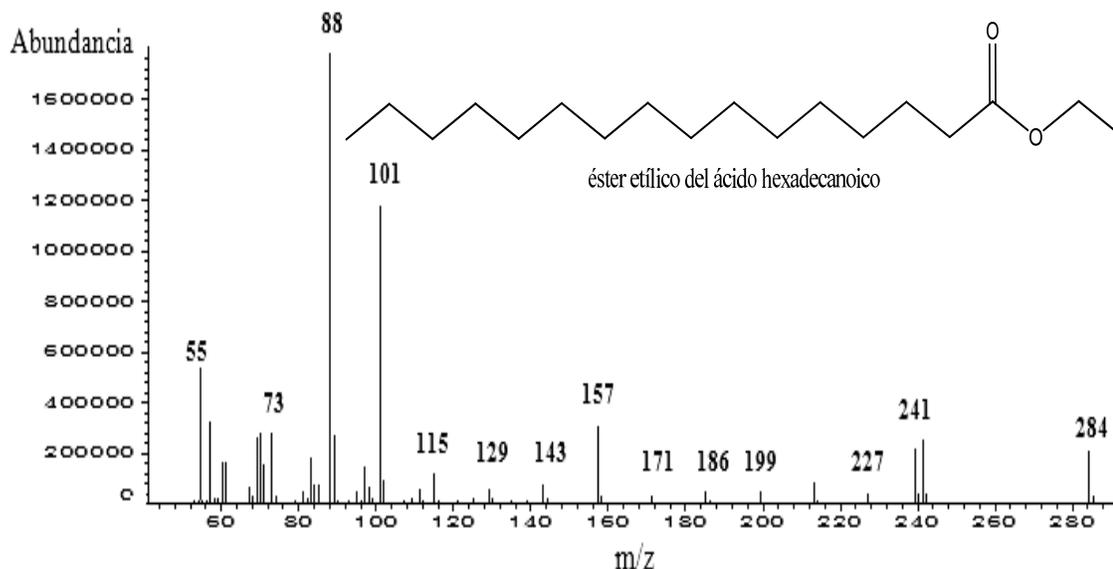


Figura 62. Espectro de masas del éster etílico del ácido hexadecanoico.

En la Fig. 63 se muestra el patrón de fragmentación característico del compuesto éster etílico del ácido hexadecanoico.

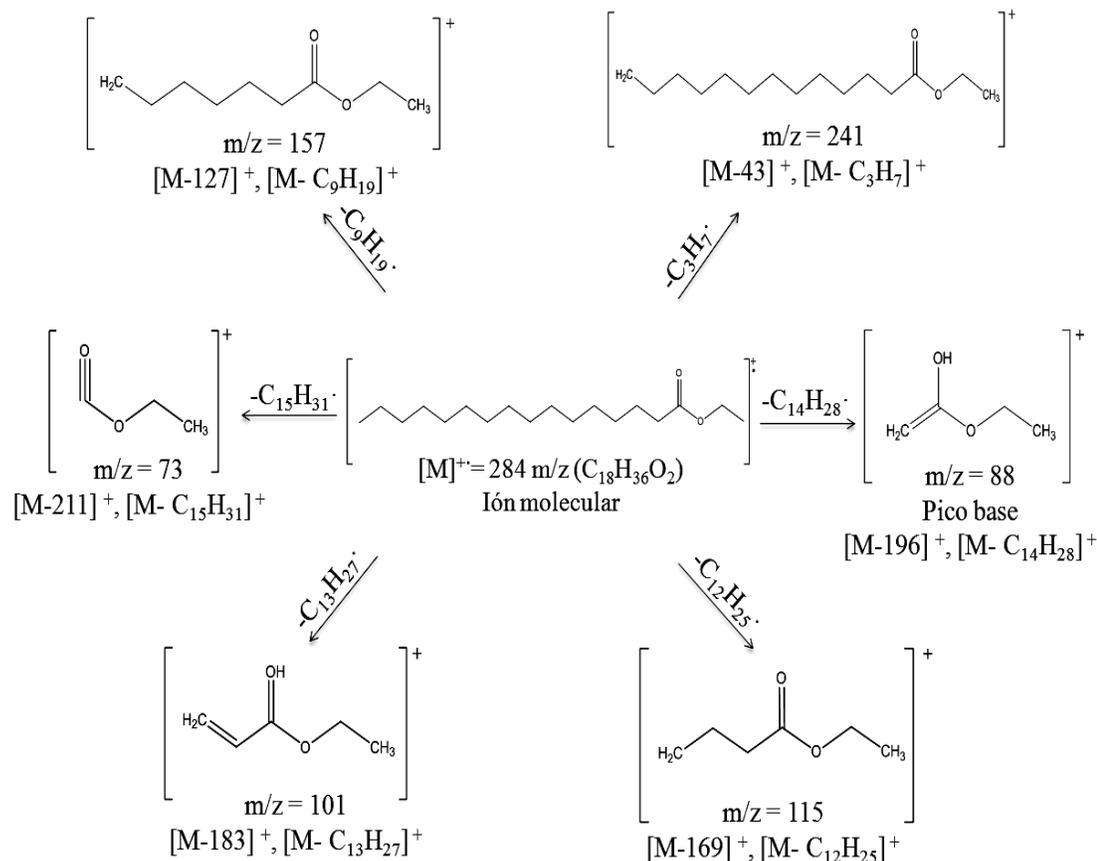


Figura 63. Patrón de fragmentación propuesto para éster etílico del ácido hexadecanoico.

La presencia de ésteres de ácidos grasos en las algas marinas, puede estar asociado a posibles funciones defensivas de estas algas, cuyo comportamiento ocurre entre las plantas y los insectos (136). Los ácidos grasos al igual que sus ésteres metílicos, pudieran ser los responsables de la actividad antibacteriana observada en los extractos y fracciones. Sin embargo se ha demostrado que la esterificación de los ácidos grasos insaturados causaba la pérdida de la actividad inhibitoria de los ácidos grasos. La baja actividad antibacteriana de los ésteres de ácidos grasos se debe, a que

el grupo carbonilo libre es necesario para dicha actividad; además que está relacionada con el tipo de bacteria (139). La acción antimicrobiana de los componentes de los extractos vegetales y de los aceites esenciales se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales. La actividad de los componentes de los aceites esenciales en orden decreciente va desde los fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos (140).

4.2.2 Fraccionamiento y análisis de la fracción C

La fracción C (sólido negro) presentó la mayor actividad letal frente a los nauplios de *A. salina* luego de las 48 horas de exposición. Esta fracción mostró en la placa de CCFA una mancha continua bien concentrada, por lo que se podían separar los compuestos de esta muestra por cromatografía de columna, ya que se contaba con la masa suficiente para continuar con el fraccionamiento cromatográfico. Para esta cromatografía se empleó una columna de vidrio de 41,9 cm de alto y 1,2 cm de diámetro, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh, empleándose 0,6443 g de muestra y 19,33 g sílica gel, en una relación muestra: sílica de 1:30.

La CC se inició con una mezcla de hexano-AcOEt en una proporción 90:10 v/v y posteriormente, se emplearon mezclas de solventes de polaridad ascendente hasta culminar con CH₃OH al 100%. En esta cromatografía se obtuvieron 46 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizándose erlenmeyers de 50 ml de capacidad (Tabla 41).

Los eluatos fueron analizados por CCFA, aquellos eluatos que al revelarlos con la lámpara UV de onda corta y la solución ácida de molibdato de amonio presentaron iguales valores de R_f, fueron unidos en una misma subfracción, obteniéndose 7 subfracciones en esta cromatografía, tal como se presenta en la Tabla 42. La masa total recuperada de la fracción C fue de 0,5237 g, lo que representa el 81,28 % de la cantidad de muestra fraccionada. La diferencia de masa entre la

fracción C (empleada para la CC) y la recuperada, se debe a la adsorción de compuestos de mayor polaridad en la sílica gel de 35-60 mesh.

Tabla 41. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción C del EAE.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
Hexano-AcOEt	90-10	1-8
Hexano-AcOEt	70-30	9-16
Hexano-AcOEt	50-50	17-22
Hexano-AcOEt	30-70	23-28
Hexano-AcOEt	10-90	29-34
AcOEt	100	35-40
AcOEt-CH ₃ OH	50-50	41-44
CH ₃ OH	100	45-46

Tabla 42. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción C del EAE.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
C ₁	1	1,50	Sólido blanco
C ₂	2	106,10	Aceite amarillo pálido
C ₃	3-6	205,60	Sólido amarillo claro
C ₄	7-8	34,50	Sólido amarillo
C ₅	9-16	112,70	Sólido verde oscuro
C ₆	17-30	56,30	Sólido marrón oscuro
C ₇	31-48	7,00	Sólido marrón oscuro

4.2.3.1 Análisis de la subfracción C₂

La subfracción C₂ que fue separada como un aceite de color amarillo pálido, en su análisis de CCFA presentó una sola mancha bien concentrada a 0,80 R_f, lo que indicó la presencia de un compuesto puro. Por lo tanto, se decidió realizarle un análisis por espectroscopia de RMN de ¹H, ¹³C y DEPT-135, para caracterizar el

compuesto presente en la subfracción C₂.

En el espectro de RMN de ¹H de esta subfracción aplicando un campo de 300 MHz (Fig. 64), se observan tres señales a campo bajo, una a campo intermedio y tres señales a campo alto. En la región de los aromáticos, se identificaron 2 cuádrupletes simétricos con desplazamientos químicos a δ_H 7,68-7,70 ppm y 7,49-7,52 ppm; cuyas señales corresponden a los protones de un anillo aromático disustituido. El siguiente desplazamiento químico, entre δ_H 4,16-4,26 ppm se observa como un multiplete, originado por un grupo metileno desapantallado por la unión a un átomo de oxígeno. La señal a campo más alto a δ_H 1,64-1,69 ppm fue asignada a un metino enlazado a un grupo metileno; a δ_H 1,21-1,43 ppm, se visualiza otra señal correspondiente a protones metilenos adyacentes de una cadena carbonada. La última señal a campo más alto a δ_H 0,83-0,91 ppm, es debida a grupos metilos terminales (Tabla 43).

En la Fig. 65, se muestran ampliaciones del espectro de RMN de ¹H, donde se detalla la multiplicidad de cada una de las señales.

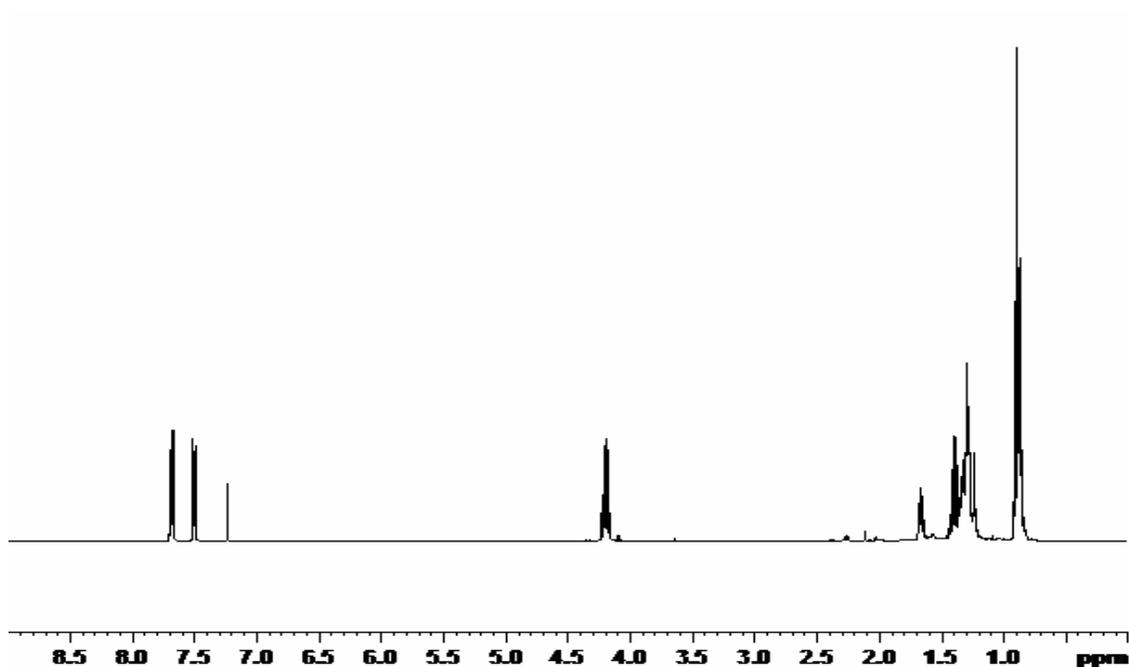


Figura 64. Espectro de RMN de ¹H de la subfracción C₂.
(300MHz; CDCl₃)

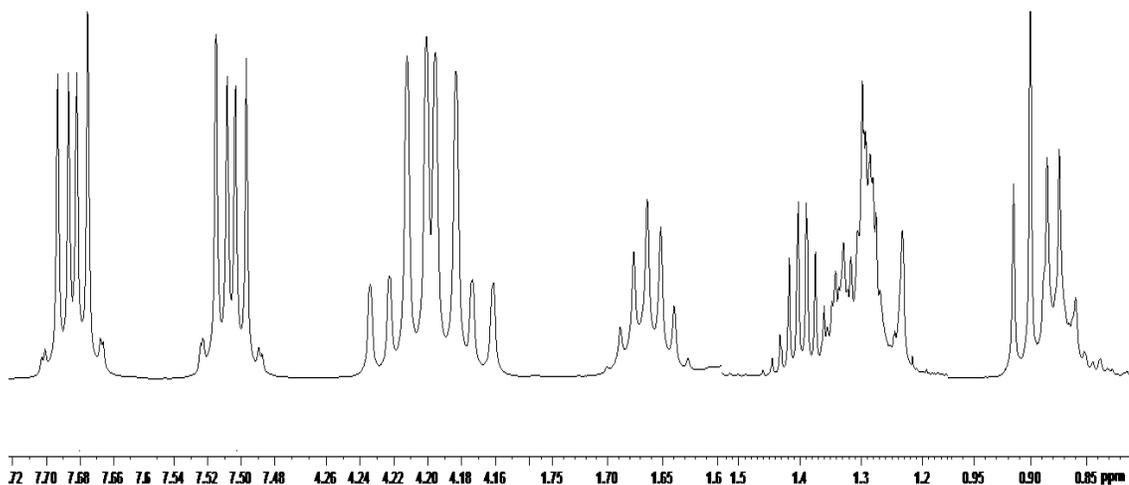
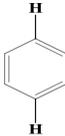


Figura 65. Ampliaciones en diferentes regiones del espectro de RMN ^1H de la subfracción C_2 .

Tabla 43. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ^1H de la subfracción C_2 .

Señal	δ_{H} (ppm)	Multiplicidad	Tipos de hidrógenos
H_6' y H_9'	0,83-0,91	triplete (<i>t</i>)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
H_8' y $\text{H}_3'-\text{H}_5'$	1,21-1,43	multiplete (<i>m</i>)	$-(\text{CH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
H_2'	1,64-1,69	multiplete (<i>m</i>)	$\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
H_1'	4,16-4,26	multiplete (<i>m</i>)	$\text{O}-\text{CH}_2$
H_3	7,49-7,52	cuadruplete (<i>c</i>)	
H_2	7,67-,7,70	cuadruplete (<i>c</i>)	

En el espectro de RMN de ^{13}C de esta subfracción (Fig. 66), se pudo identificar una señal a campo muy bajo correspondiente a la absorción del grupo carbonilo a δ_{C} 167,75 ppm; seguidamente, se observaron tres señales a campo bajo a δ_{C} 132,48; 130,87; y 128,81 ppm, la primera corresponde a un carbono del anillo aromático y las otras dos señales próximas se debe a los carbono del anillo aromático

ubicados en posición *orto* o *para* respecto a los grupos carbonilos, ya que éste se encuentra disustituido. La señal a δ_C 68,16 ppm, pertenece a un grupo metilénico unido a un átomo de oxígeno. A δ_C 38,75 ppm se debe al carbono metínico de una cadena ramificada; así mismo, a campo alto se observan las señales a δ_C 30,38; 28,94; 23,76 y 22,99 ppm correspondientes a las señales de carbonos metilenos adyacentes ubicados en una cadena lineal. Las dos señales visualizadas a campo más alto (δ_C 14,05 y 10,96 ppm), se asignaron a carbonos metílicos terminales (Tabla 44).

El análisis de RMN DEPT-135, fue realizado con la finalidad de identificar los grupos metilos, metilenos y metinos de esta molécula; y así corroborar las asignaciones de las señales observadas en los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H . En la Fig. 67, se observan 3 señales pertenecientes a grupos metinos en posición positiva e igualmente se visualizan otras 2 señales de grupos metilos. En posición negativa se observan 5 señales correspondientes a grupos metilénicos.

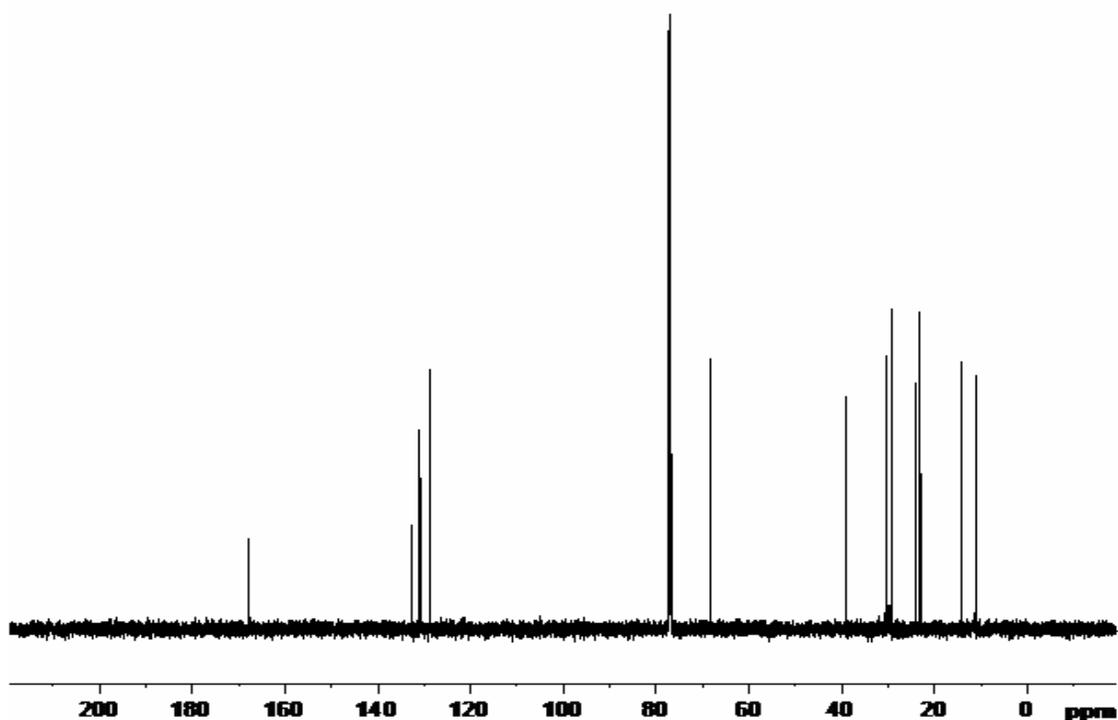
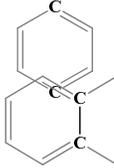
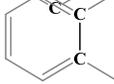


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C de la subfracción C_2 .

Tabla 44. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C de la subfracción C_2 .

Señal	δ_{C} (ppm)	Tipo de carbono
C_9'	10,96	$-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_6'	14,05	$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_5'	22,99	$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_8'	23,76	$-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_4'	28,94	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_3'	30,38	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_2'	38,75	$-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C_1'	68,16	$-\text{O}-\text{CH}_2$
C_3	128,81	
C_2	130,87	
C_1	132,48	
C_7'	167,75	$\text{C}=\text{O}$

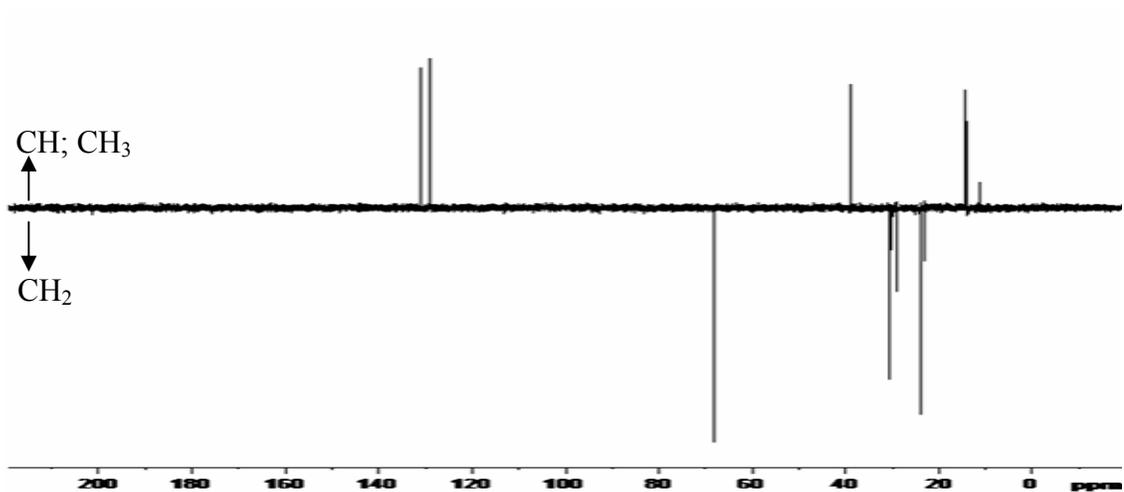


Figura 67. Espectro RMN DEPT-135 de la subfracción C_2 .

Al comparar el espectro de RMN DEPT-135 y ^{13}C , se pudo obtener una visión más clara de los diferentes grupos presentes en la estructura de acuerdo al análisis realizado. En la Fig. 68, se puede ver que las 2 señales que aparecen a campo más bajo en el espectro de RMN ^{13}C , pertenecen a carbonos cuaternarios, siendo la de mayor desplazamiento químico la del grupo carbonilo y la otra señal pertenece a un carbono cuaternario de un anillo aromático. Igualmente se corroboró que las señales analizadas en el espectro ^{13}C , estaban bien identificadas, ya que tenía relación con el análisis de RMN DEPT-135.

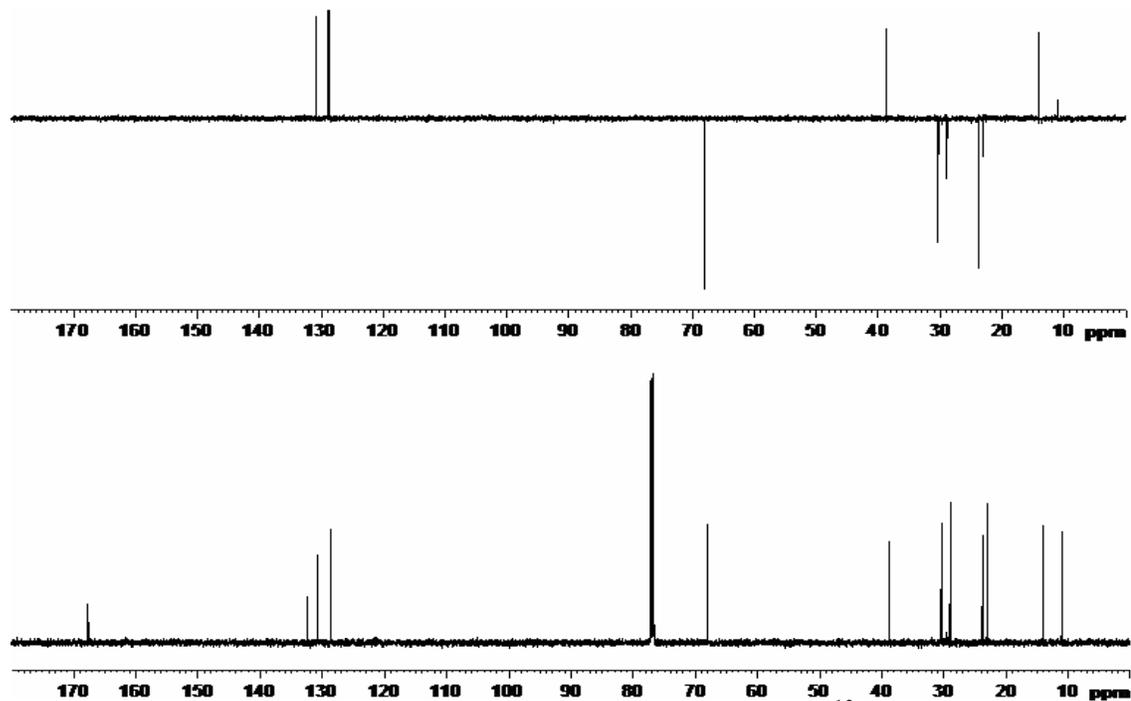


Figura 68. Comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y ^{13}C de la subfracción C_2 .

Con la ayuda del Programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2010, se pudo comparar los desplazamientos químicos teóricos con los obtenidos experimentalmente de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la subfracción C_2 , lo que permitió establecer que el compuesto purificado de la fracción C mediante CC, posiblemente sea el éster di-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico (Fig. 69).

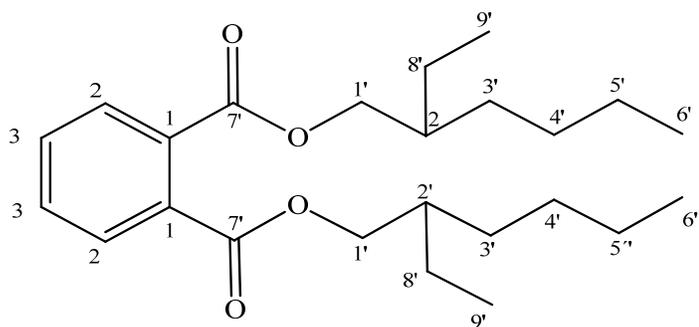


Figura 69. Estructura del éster di-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico.

El di-(2-etilhexil) ftalato es un compuesto orgánico semivolátil, de alta masa molecular. Este compuesto es un plastificante bien conocido, y se ha reportado de su presencia en algunas plantas como: *Alchornea cordifolia*, *Aloe vera*, *Euphorbia cyparissias*, *Euphorbia seguieriana* y *Mallotus tetracoccus* (124 y 141). A pesar que se considera a este compuesto como un contaminante, se ha demostrado que su origen puede ser natural (122), hallándose en una amplia variedad de plantas y alimentos grasos como: leche, mantequilla, y carnes. El éster di-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico ha sido aislado del alga marina, *Sargassum weightii*, y aparte de su capacidad como plastificante, también ha mostrado el efecto antibacteriano en un número de bacterias (124); demostrando así, actividad antibacteriana frente las bacterias Gram positiva *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Sarcina lutea*; y en las Gram negativa *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga* y *Shigella dysenteriae* (141)

4.2.3 Fraccionamiento y análisis de la fracción D

La fracción D (sólido negro) que presentó la mayor actividad letal frente a los nauplios de *A. salina* a las 24 y 48 horas de exposición, fue fraccionada por cromatografía de columna. En esta cromatografía se empleó una columna de vidrio de 32 cm de alto y 1,2 cm de diámetro, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh, empleándose 0,3103 g de muestra y 15,52 g sílica gel en una relación de

muestra: sílica de 1:50. La cromatografía de columna se inició con una mezcla de hexano- AcOEt en una proporción 90:10 v/v, seguidamente se emplearon como eluyentes, mezclas de solventes de polaridad ascendente, hasta culminar con CH₃OH al 100%. En esta separación se obtuvieron 43 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml en erlenmeyers de 75 ml de capacidad para cada eluato (Tabla 45).

Tabla 45. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción D del EAE.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
Hexano-AcOEt	90-10	1-8
Hexano-AcOEt	60-40	9-16
Hexano-AcOEt	40-60	17-24
Hexano-AcOEt	10-90	25-32
AcOEt	100	33-37
AcOEt-CH ₃ OH	50-50	38-41
CH ₃ OH	100	42-43

Tabla 46. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción D del EAE.

Subfracción	Eluatos	Masa (mg)	Característica
D ₁	1	2,10	Sólido blanco opaco
D ₂	2	84,50	Aceite transparente
D ₃	3	20,70	Sólido verde
D ₄	4-9	55,50	Sólido verde oscuro
D ₅	10-16	56,50	Sólido verde oscuro
D ₆	17-30	48,10	Sólido verde oscuro
D ₇	31-37	11,20	Sólido verde oscuro
D ₈	38-43	8,90	Sólido verde oscuro

Todos los eluatos fueron analizados por CCFA, aquéllos que al ser revelados

con la lámpara UV de onda corta y la solución ácida de molibdato de amonio presentaron iguales valores de R_f , fueron unidos en una misma subfracción (Tabla 46). La masa total recuperada de la fracción C fue de 0,2875 g, lo que representa el 92,65 % de la cantidad de muestra fraccionada.

4.2.3.1 Fraccionamiento de la subfracción D₅

La subfracción D₅ de apariencia sólida y color verde oscuro, en su análisis por CCFA mostró una mancha continua de color verde, seguido de una de color rosada con un valor de R_f 0,93 (próximo al frente del solvente) que podía ser fácilmente visualizada en el rango visible, cuya mancha podía ser separada por CCFP.

Para esta cromatografía se utilizó una placa de vidrio de 20×20 cm², la cual fue recubierta con sílica gel de 60 mesh (fase estacionaria) con 1 mm de grosor; como eluyente se empleó una mezcla de hexano-AcOEt en una proporción 3:2. Al visualizar la placa en la lámpara UV de onda corta, se pudo observar 3 manchas, de las cuales solo fue separada la banda de color rosada, las otras 2 manchas se unieron en una sola subfracción, las cuales fueron extraídas con una mezcla de CHCl₃-AcOEt en una proporción 3:2 v/v, obteniéndose finalmente 2 subfracciones de esta cromatografía (Tabla 47). La masa recuperada en esta cromatografía fue de 0,0268 g, lo que representa el 47,43% de la muestra fraccionada.

Tabla 47. Subfracciones obtenidas en la CCFP de la subfracción D₅ del EAE.

Subfracciones	R_f	Masa (mg)	Característica
D _{5,1}	0,90	3,3	Sólido rosado
D _{5,2}	0,97	23,5	Sólido verde

La mancha coloreada purificada en la subfracción D_{5,1}, fue analizada por espectroscopia de RMN de ¹H, ¹³C y DEPT-135 para caracterizar la posible estructura del compuesto aislado. En el espectro de RMN de ¹H (Fig. 70 y 71) se pueden observar 6 señales. A campo muy bajo, se observa un singlete a δ_H 8,03 ppm,

correspondiente a un protón unido a un anillo aromático posiblemente ubicado próximo a un grupo carbonílico, ya que se encuentra desapantallado. Las siguientes dos señales a δ_H entre 7,40-7,42 y 7,28-7,29 ppm (campo bajo) se visualizan como dobletes, asignadas a protones de un anillo aromático. A δ_H entre 7,15-7,18 y 7,06-7,09 se observan 2 dobletes de tripletes pertenecientes a los hidrógenos de un benceno. La señal a δ_H 3,89 ppm, a un campo más alto, fue asignada a un metilo enlazado a un átomo de oxígeno. A δ_H 2,28 ppm se visualiza una última señal a campo alto, perteneciente a un metilo terminal. En la Tabla 48, se muestra detalladamente cada una de las señales observadas con sus respectivas asignaciones.

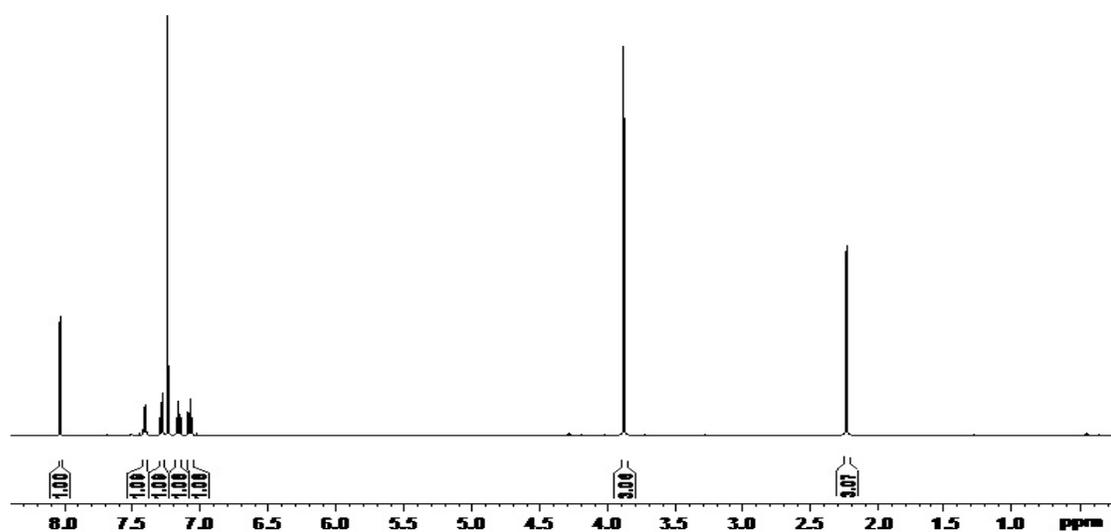


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H de la subfracción $\text{D}_{5.1}$.
(300 MHz; CDCl_3)

Las constantes de acoplamiento (J) de las señales en la región de los protones del anillo aromático se muestra en la Tabla 48, donde las constantes de acoplamiento a 7,93 Hz del doblete y doblete de triplete de los protones H_5 y H_6 , sugiere que ambos protones acoplados magnéticamente están en posición *orto* uno respecto al otro; cuyo valor teórico de la constante de acoplamiento para protones aromáticos en *orto* se encuentra a una J aproximada entre 6-9 Hz. Asimismo, las constantes de

acoplamiento a 8,15 Hz de las señales de doblete de triplete y doblete de los protones H₇ y H₈, sugiere que estos protones se encuentran unidos a átomos de carbonos adyacentes en posición *orto*. Cabe destacar que la multiplicidad observada en las señales de los protones H₆ y H₇, es también originada por el acoplamiento magnético entre ellos, lo cual se puede ver por la inclinación ascendente que sufren ambos dobletes de tripletes hacia los protones responsables de su desdoblamiento.

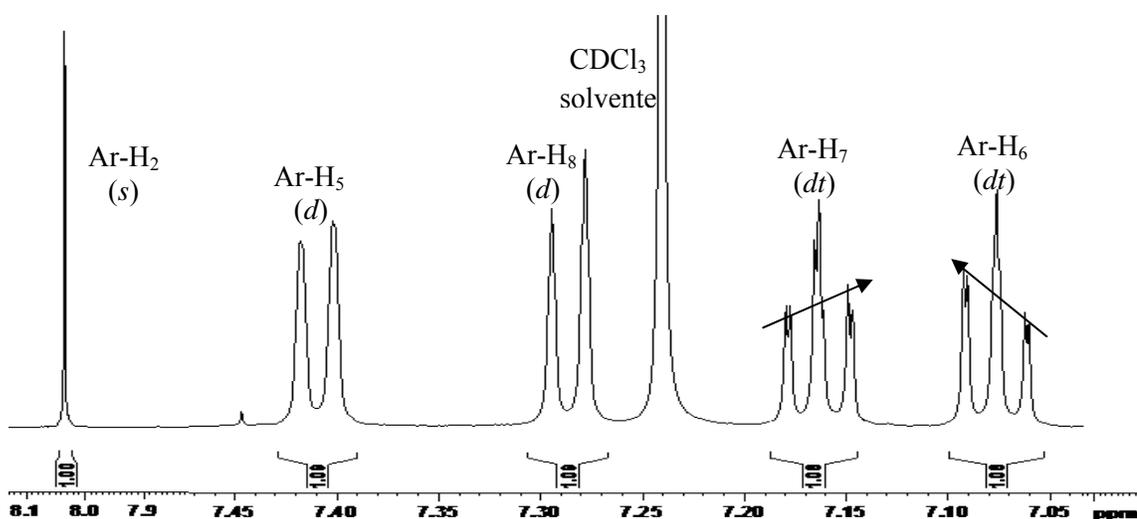
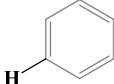
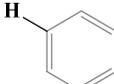
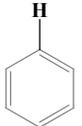
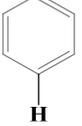
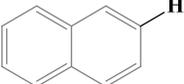


Figura 71. Ampliaciones de las regiones de las señales los protones del anillo aromático (Ar) del espectro de RMN ¹H de la subfracción D_{5.1}.

En el espectro de RMN de ¹³C (Fig. 72), se observa una señal a campo muy bajo correspondiente a la absorción del grupo carbonilo a δ_C 166,89 ppm; seguidamente, se observa una señal a campo bajo a δ_C 143,09 ppm, correspondiente al carbono de un grupo metino perteneciente a un anillo aromático. En el mismo campo, se visualiza cuatro señales; la primera a δ_C 138,05 originada por un carbono de un anillo aromático enlazado a un grupo metoxi; las siguientes dos señales a δ_C 133,01 y 128,53 ppm, son debida a los carbonos cuaternarios de los anillos aromáticos fusionados, y la última señal a δ_C 125,73 ppm, pertenece al carbono del anillo aromático enlazado al carbono del grupo carbonilo. Las señales de los carbonos metínicos de los anillos aromáticos fueron observadas a δ_C 123,77; 120,97; 118,17 y

112,85 ppm. A δ_C 111,92 se visualiza la señal de un carbono cuaternario enlazado a un metilo. La señal a δ_C 52,64 ppm fue asignada la señal del carbono del metilo unido a un oxígeno; y por último, se observa la señal de un carbono metílico a δ_C 16,32 ppm (Tabla 49).

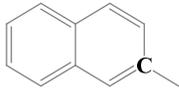
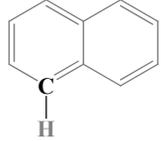
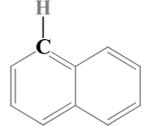
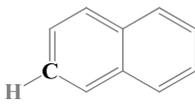
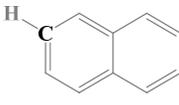
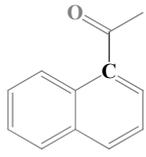
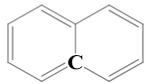
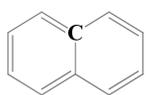
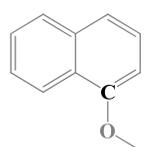
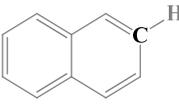
Tabla 48. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de las señales observadas en el espectro de RMN 1H de la subfracción D_{5,1}.

Señal	δ_H (ppm)	J(Hz)	Multiplicidad	Tipos de hidrógenos
H ₁₄	2,28	-	singlete (<i>s</i>)	-CH ₃
H ₁₂ y H ₁₃	3,89	-	singlete (<i>s</i>)	CH ₃ -O
H ₆	7,06-7,09	7,93	doblete de triplete (<i>dt</i>)	
H ₇	7,15-7,18	8,15	doblete de triplete (<i>dt</i>)	
H ₈	7,28-7,29	8,15	doblete (<i>d</i>)	
H ₅	7,40-7,42	7,93	doblete (<i>d</i>)	
H ₂	8,03	-	singlete (<i>s</i>)	

-: no está acoplado magnéticamente

En el espectro de RMN DEPT-135 (Fig. 73), se identificó algunas de las señales de los tipos de carbonos presentes en el compuesto aislado en la subfracción D_{5,1}. En este espectro, se visualizan 6 señales a campo bajo, 5 de ellas pertenecientes a los carbonos metínicos de los anillos aromáticos fusionados, y así mismo, se identificó a campo alto, la señal de los grupos metoxi y el carbono metilo presente en el compuesto purificado en la subfracción D_{5,1}.

Tabla 49. Desplazamientos químicos de las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C de la subfracción D_{5.1}.

Señal	δ_{C} (ppm)	Tipo de carbono
C ₁₄	16,32	-CH ₃
C ₁₂ y C ₁₃	52,64	-O-CH ₃
C ₃	111,92	
C ₅	112,85	
C ₈	118,17	
C ₆	120,97	
C ₇	123,77	
C ₁	125,73	
C ₁₀	128,53	
C ₉	133,01	
C ₄	138,05	
C ₂	143,09	
C ₁₁	166,89	

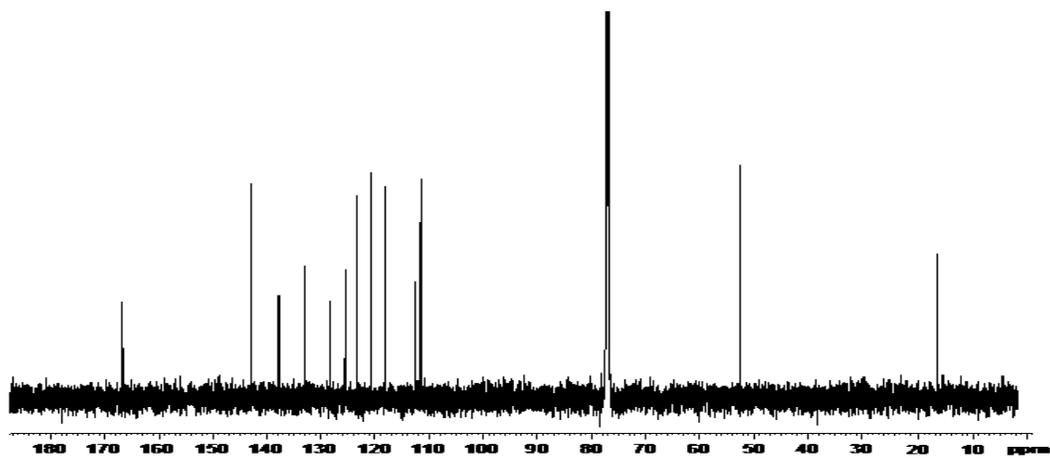


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C de la subfracción $D_{5.1}$.

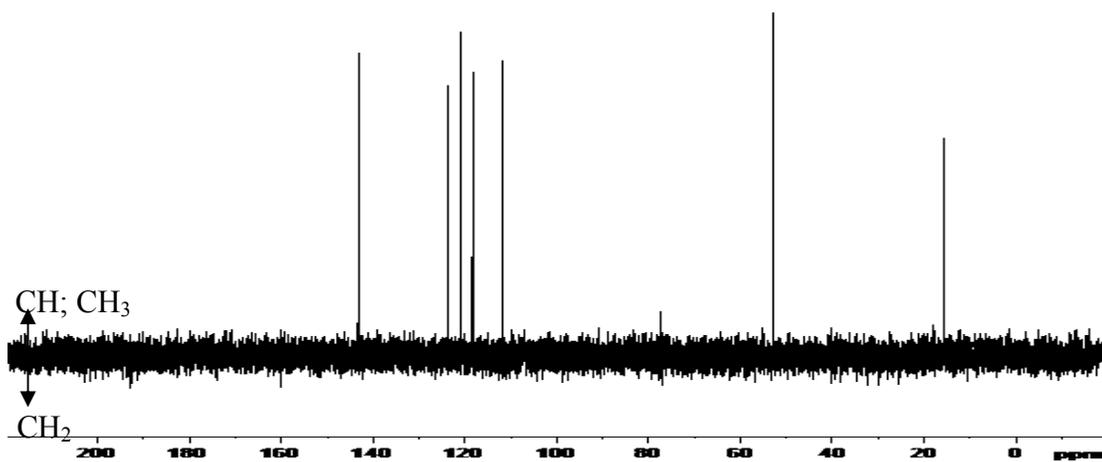


Figura 73. Espectro de RMN DEPT-135 de la subfracción $D_{5.1}$.

En la Fig. 74, se muestra la comparación de los espectros DEPT-135 y RMN ^{13}C , donde se pudo identificar y confirmar los tipos de carbonos presentes en la estructura del compuesto aislado en esta subfracción. De las once señales visualizadas a campo bajo en el espectro de RMN ^{13}C , se estableció que cinco de ellas pertenecen a los carbonos cuaternarios de los anillos aromáticos fusionados y una asignada al carbono del grupo carboxílico presente en la estructura. Así mismo, se constataron las 5 señales de los carbonos metínicos del núcleo bencénico, de igual manera se confirmó que la señal observada en la zona alifática corresponde a un grupo metílico.

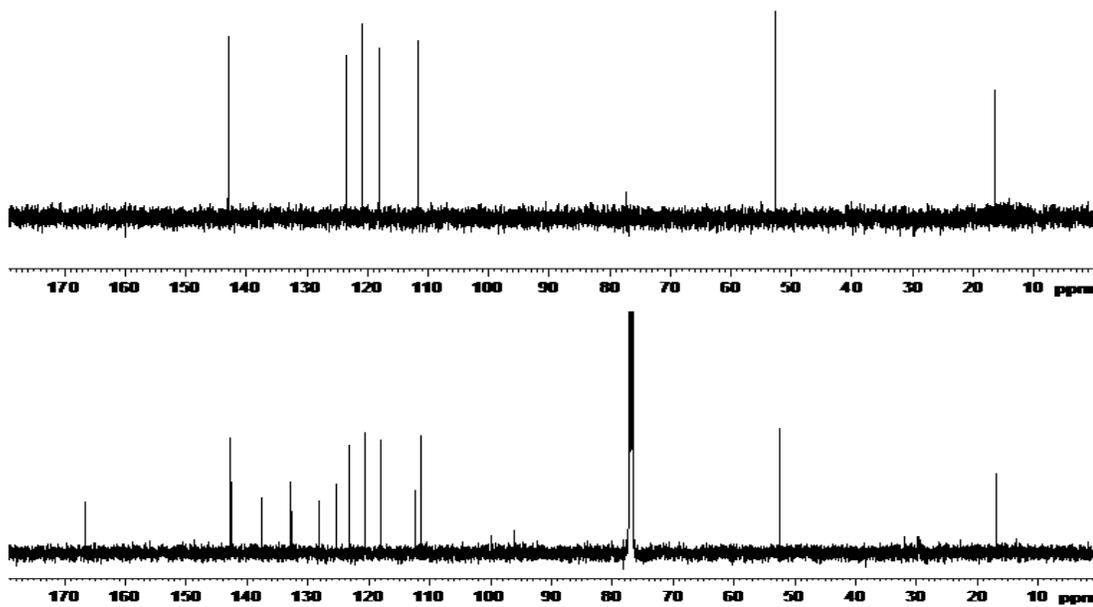


Figura 74. Comparación de los espectros de RMN DEPT-135 y ^{13}C de la subfracción $\text{D}_{5.1}$.

Con el empleo del programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2010 y con la información obtenida de los análisis de RMN de ^1H , ^{13}C y DEPT-135, se pudo constatar la presencia de las señales observadas a campo alto y bajo en esta muestra, estableciéndose la posible estructura del compuesto aislado en la subfracción $\text{D}_{5.1}$, como el 4-metoxi-3-metil-1-naftoato de metilo (Fig. 75).

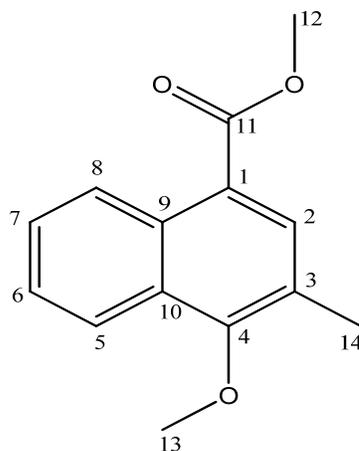


Figura 75. Posible estructura propuesta para la subfracción $\text{D}_{5.1}$.

A pesar de que en los análisis de RMN unidimensional se identificaron los desplazamientos químicos de los H y C presentes en la estructura, no se pudo establecer con exactitud la estructura del compuesto aislado en la subfracción D_{5.1}, ya que para su elucidación se requieren de análisis RMN bidimensional y CG/EM para obtener mayor información de esta molécula y así, establecer la estructura de este compuesto. Sin embargo, se puede resaltar que esta sustancia purificada posee como esqueleto principal anillos aromáticos fusionados (naftaleno), el cual se asemeja al compuesto 4-metoxi-3-metil-1-naftoato de metilo.

Aunque, se ha demostrado que la presencia de los derivados del ácido 1,2 bencenodicarboxílico puede originarse de forma natural (122), no se puede descartar que la aparición de los ftalatos en algunas fracciones del alga *C. racemosa*, puede ser debida a la presencia de estos compuestos en algunos de los materiales empleados para la separación de los constituyentes de los extractos, así como también en la bomba de vacío.

4.2.4 Fraccionamiento y análisis de la fracción E

La fracción E (sólido verde oscuro) en su análisis por CCFA, presentó una mancha continua bien concentrada, según el revelado con molibdato de amonio. Debido a la cantidad de masa que se obtuvo de esta fracción, se realizó un fraccionamiento cromatográfico para separar los componentes de esta muestra.

Para esta cromatografía, se empleó una columna de vidrio de 25,2 cm de alto y 0,9 cm de diámetro, la cual fue rellena con sílica gel de 35-70 mesh, empleándose 0,2516 g de muestra y 7,56 g sílica gel en una relación de muestra: sílica de 1:30. Al igual que en las fracciones anteriores la CC, se inició con una mezcla de hexano-AcOEt en una proporción 90:10 v/v, y posteriormente, se emplearon mezclas de solventes de polaridad creciente hasta culminar con una mezcla de AcOEt-CH₃OH 50:50 v/v. En esta cromatografía se obtuvieron 28 eluatos, los cuales fueron recogidos en volúmenes de 25 ml, utilizándose erlenmeyers de 50 ml de capacidad

(Tabla 50).

Tabla 50. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción E del EAE.

Mezcla	Porcentaje (% V/V)	Eluatos
Hexano-AcOEt	90-10	1-8
Hexano-AcOEt	60-40	9-14
Hexano-AcOEt	40-60	15-18
Hexano-AcOEt	10-90	19-22
AcOEt	100	23-26
AcOEt-CH ₃ OH	50-50	27-28

El comportamiento de cada uno de los eluatos, se analizó por cromatografía de capa fina analítica (CCFA) y para ello se utilizaron como reveladores una solución ácida de molibdato de amonio y una lámpara de luz ultravioleta de onda corta (100 a 280 nm). Los eluatos que presentaron valores similares en sus R_f , fueron unidos en una sola subfracción, obteniéndose 6 subfracciones en esta cromatografía (Tabla 51). La masa total recuperada de la fracción E fue de 0,2443 g, lo que representa el 97,10 % de la cantidad de muestra fraccionada.

Tabla 51. Subfracciones obtenidas del fraccionamiento de la fracción E.

Subfracciones	Eluatos	Masa (mg)	Característica
E ₁	1	52,00	Aceite amarillo pálido
E ₂	2-8	22,20	Sólido marrón con sólido rojo
E ₃	9-14	39,50	Sólido marron oscuro con sólido rojo
E ₄	15-21	62,20	Sólido marrón con sólido rojo
E ₅	22-25	31,40	Sólido marrón oscuro transparente
E ₆	26-28	37,00	Sólido marrón oscuro

CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios detectados en la especie *C. racemosa* recolectada en la Isla de Cubagua, tales como: cumarinas, alcaloides, esteroides insaturados, polifenoles y glicósidos cardiotónicos, desempeñan diferentes funciones fisiológicas de gran importancia, en el control y protección de múltiples enfermedades que afectan a los mamíferos y seres humanos.

Aunque ninguno de los extractos crudos ensayados en esta investigación ejercieron actividad letal contra el crustáceo *A. salina*, algunas fracciones del EAE presentaron actividad tóxica frente este organismo, lo cual indica que el alga *C. racemosa* recolectada en las costas venezolanas, es posible candidata para la obtención de compuestos con actividad anticancerosa, debido a que la toxicidad observada sobre este crustáceo tiene una correlación positiva con diferentes líneas cancerígenas.

Los extractos de menor polaridad (EEP y EAE) presentaron actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, observándose un espectro de acción más amplio y una mayor eficacia en algunas fracciones del EEP para la mayoría de las cepas ensayadas, lo cual puede ser atribuido a la presencia de compuestos con potencial antibacteriano en la especie *C. racemosa*.

El incremento de actividad antibacteriana y letal mostrada por las fracciones de los EEP y EAE, obedecen al efecto sinérgico del conjunto de compuestos presentes en estas fracciones, ya que al realizar un fraccionamiento cromatográfico sus principios activos están presentes en mayor concentración, y por lo tanto, pueden ejercer su actividad biológica con mayor efectividad.

Los extractos y algunas fracciones del EAE analizadas, originaron ciertas alteraciones en las funciones celulares básicas durante el desarrollo embrionario del

erizo de mar *E. lucunter*, cuyo resultado demuestra que esta especie produce compuestos que pueden generar efectos citotóxicos en organismos patógenos; así como, en células tumorales.

La técnica de CG/EM permitió identificar una mezcla de hidrocarburos en la fracción I del EEP, cuyos constituyentes son: los alquenos, Z-5 nonadeceno y 8-heptadeceno; y los alcanos, nonadecano y heptadecano, los cuales son de gran utilidad en diversos procesos a nivel industrial (Ej. biocombustibles)

En la fracción II, mediante CG/EM, se pudieron caracterizar los compuestos: 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, ácido tetradecanoico, éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico, éster hexadecílico del ácido hexadecanoico y el heptadecano.

En el análisis por CG/EM de la subfracción IV₃, se identificó el ftalato de dibutilo y el 4,8,12,16-tetrametilheptadecano-4-olido como compuestos de esta subfracción.

Las técnicas espectroscópicas de IR y, RMN de ¹H, ¹³C y DEPT-135 realizado a la subfracción IV_{5,2}, además de la comparación de estos resultados con los valores teóricos proporcionados por el programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2010, se logró identificar como el posible compuesto al ácido heptadecanoico.

La aplicación de las técnicas de IR y CG/EM a la subfracciones IV_{6,2,1}; V_{3,3,1} y V_{4,2}, permitió identificar como componente mayoritario, al ácido hexadecanoico.

Con el empleo de CG/EM se caracterizaron los ácidos hexadecanoico y tetradecanoico, como los componentes mayoritarios de la subfracción V₅.

En el análisis por CG/EM de la subfracción VI_{4.1.5}, se identificó al 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona como uno de los compuestos contenidos en esta subfracción.

El éster etílico del ácido hexadecanoico fue identificado como uno de los compuestos presentes en la fracción A del EAE.

Los análisis de RMN de ¹H, ¹³C y DEPT-135 realizado a la subfracción C₂, y posterior comparación de los valores experimentales con los teóricos proporcionados por el programa Predictor ChemBioDraw Ultra 2010, se pudo establecer al éster di-(etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico, como el posible compuesto purificado en esta muestra.

Los análisis de RMN unidimensional no permitieron determinar con exactitud la estructura definitiva del compuesto aislado en la subfracción D_{5.1}, ya que es necesario realizarle análisis de RMN bidimensional y EM para obtener mas información acerca de la disposición de los diversos átomos presentes en esta sustancia; sin embargo, se pudo establecer que este metabolito posee un esqueleto parecido al del 4-metoxi-3-metil-1-naftoato de metilo.

Las distintas familias químicas (terpenos, esteres, acidos grasos, hidrocarburos, lactonas y cetonas) identificadas en las fracciones y subfracciones de los EEP y EAE, pueden ser los responsables, de las diferentes actividades biológicas observadas en los extractos, siendo atribuido mayormente en el EEP a la presencia de ácidos grasos.

Los estudios sobre las actividades biológicas observadas en la especie *C. racemosa* proveniente de la Isla de Cubagua, Venezuela, demuestran que esta alga tiene un gran potencial para la producción de compuestos útiles en la industria

farmacéutica en el tratamiento de diversas patologías.

Esta investigación es el primer aporte al conocimiento de la bioactividad y estudio fitoquímico de la especie *C. racemosa* proveniente de las costas venezolanas, así como también en otras lalitudes latinoamericanas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez, J. 2003. Productos naturales de origen marino, una perspectiva en la búsqueda de nuevos fármacos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2: 5-13.
2. Jaspars, M. y Houssen, W. 2006. Isolation of marine natural products. In: *Natural Products Isolation*. Sarker, S.; Latif, Z. y Gray, A. (eds) 2006. Segunda edición. Editorial Humana Press Inc. New Jersey.
3. Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 74 (1): 151-170.
4. Avedaño, M. 2010. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión en conjunto. <<http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1150/1196>> (23/07/2011).
5. De La Calle, F. 2007. Fármacos de origen marino. *Treballs de la SCB*, 58: 141-155.
6. Menéndez, J. 2005. Nuevos antitumorales de origen marino. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 71 (2): 341-363.
7. Ray, G. y Grassele, J. 1991. Marine biological diversity. *Bioscience*, 41: 453-461.
8. Houssen, W. y Jaspars, M. 2006. Isolation of Marine Natural Products. Segunda edición. Editorial Humana Press Inc. New Jersey.
9. Ordaz, G.; D'Armas, H.; Yáñez, D.; Hernández, J. y Camacho, A. 2010. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58 (2): 677-688.
10. Jiménez, J.; Marfil, M.; Francesch, A.; Cuevas, C.; Alvarez, M. y Albericio, F. 2007. Productos naturales de origen marino. *Investigación y Ciencia*, 365: 75-83.
11. Charzeddine, L. y Fariñas, M. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del nororiente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela Universidad de Oriente*, 40: 49-54.

12. Valdés, O.; Pérez, R. y Colom, Y. 2010. Actividad antitumoral de los organismos marinos. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, 10 (19): 1-6. < <http://ama.redciencia.cu/articulos/19.04.pdf> > (23/07/2011).
13. Moo-Puc, R.; Robledo, D. y Freile, Y. 2009. *In vitro* cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias marinas*, 35 (4): 345-358.
14. Oraday, M. 1998. Componentes químicos de algas del estado Tamaulipas y su aplicación en la farmacología. Tesis de grado. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
15. Cubas, P. 2008. Algas eucariotas. < www.aulados.net > (23/07/2011).
16. Freile, Y. 2001. Algas en la "botica". *Avance y perspectiva*, 20: 283-292.
17. Bhakuni, D. y Rawat, D. 2005. *Bioactive marine natural products*. Editorial Anamaya. India.
18. Jiménez, R. 1983. Diatomeas y silicoflagelados del fitoplacton del Golfo de Guayaquil II. *Acta Oceanográfica del Pacífico*, 2 (2): 193-281.
19. Alfonzo, Y. y Blanco, M. 2008. Algas, aliadas en el pasado y sustento para el futuro. *Tecnología Química*, 28 (3): 46-50.
20. Jiménez, A. y Goñi, I. 1999. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 49 (2): 114-120.
21. Blunt, J.; Coop, B.; Munro, M.; Northcote, P. y Prinsep, M. 2006. Marine natural products. *Journal of Natural Products*, 23: 26-78.
22. Carlucci, M.; Scolaro, L. y Damonte. 1999. Inhibitory action of natural carrageenans on *Herpes simplex* virus infection of mouse *Astrocytes*. *Chemotherapy*, 45: 429-436.
23. Plougemé, E.; Deslanes, E.; Véron, B. y Stiger-Pouvreau, V. 2008. Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Gratelupia turuturu* and *Sargassum muticum*. *Botanica Marina*, 51: 202-208.
24. Lozano, R. 1991. ¿Qué tan secundarios son los metabolitos secundarios? *Hidrobiológica*, 1 (2): 45-57.

25. Pensando, D. 1990. *Introduction to Applied Psychology*. Akatsuka ed, Holanda.
26. Valdés-Iglesias, 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.
27. Patra, J.; Patra, A.; Mahapatra, N.; Thatoi, H.; Das, S.; Sahu, R. y Swain, G. 2009. Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5 (2):128-131.
28. Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215 (4534): 923-928.
29. Faulkner, D. y Fenical, W. (Eds). 1977. *Marine Natural Products Chemistry*. Plenum Press, New York. USA.
30. Castro, M. 1997. Actividad antibacteriana de *Sargassum sinicola* (Sargassaceae, Phaeophyta) y *Laurencia johnstonii* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) de Bahía de la Paz, México. Tesis de grado. Departamento de Desarrollo de Tecnología. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México.
31. Lima-Filho, J.; Carvalho, A.; Freitas, S. y Melo, V. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 311-313.
32. Salvador, N.; Gómez, A.; Lavelli, L. y Ribera, M. 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*, 71 (1): 101-113.
33. Bhakuni, D. y Silva, M. 1974. Biodynamic substances from marine flora. *Botanica Marina*, 27: 40-51.
34. Carvalho, L. y Roque, N. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Quimica Nova*, 23 (6): 757-763.
35. 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.
36. Fenical, W. 1975. Halogenation in the Rhodophyta: A review. *Journal of Phycology*, 11: 245-259.

37. Pereira, R.; Da Gama, B.; Teixeira, V. y Yoneshigue-Valentin, Y. 2003. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 63: 665-672.
38. Villarreal-Gómez, L.; Soria-Mercado, I.; Guerra-Rivas, G. y Ayala-Sánchez. 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45 (2): 267-275.
39. Vidotti, E. y Rollemberg, M. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, 27 (1): 139-145.
40. Martínez, N.; Casillas, C.; Rodríguez, L.; Rodríguez, J. y Torres, L. 1966. Antibiotic properties of marine algae. *Botanica Marina*, 9: 21-26.
41. Fenical, W. 1981. Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical marine brown algae *Styopodium zonale*. *Journal of Organic Chemistry*, 46: 22-27.
42. Martínez, A.; Arias, L.; Rueda, J.; Díaz, M. y Bula-Meyer, G. 2002. Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de algunas macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 9 (2): 49-55.
43. El Gamal, A. 2010. Biological importance of marine algae: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 1-25.
44. Fenical, W. y Paul, V. 1986. Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. *Marine Ecology progress Series*, 34: 157-169.
45. Jousson, O.; Pawlowski, J.; Zaninetti, L.; Meinesz, A. y Boudouresque, C. 1998. Molecular evidence for the aquarium origin of the green alga *Caulerpa taxifolia* introduced to the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 172: 275-280.
46. Capon, R.; Ghisalberti, E. y Jefferies, P. 1983. Metabolites of the algae, *Caulerpa* species. *Phytochemistry*, 22 (6): 1465-1467.
47. Centeno, A. 2008. Ecología de Caulerpales: fauna y biomarcadores. Tesis Doctoral. Programa de doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, España.

48. Sureda, A.; Box, A.; Enseñat, M.; Alou, E.; Tauler, P.; Deudero, S. y Pons, A. 2006. Enzymatic antioxidant response of a labrid fish (*Coris julis*) liver to environmental caulerpenyne. *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte C*: 1-6.
49. Paul, V.; Arthur, K.; Ritson-Williams, R.; Ross, C. y Sharp, K. 2007. Chemical defense: from compounds to communities. *Marine Biological Laboratory*, 213: 226-251.
50. Paul, V.; Littler, M.; Littler, D. y Fenical, W. 1987. Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta): isolation of new bioactive sesquiterpenoids. *Journal of Chemical Ecology*, 13 (5): 1171-1185.
51. Schwede, J.; Cardellina, J.; Grode, S.; James, T. y Blackman, A. 1987. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. *Phytochemistry*, 26 (1): 155-158.
52. Güven, K.; Percot, A. y Sezik, E. 2010. Alkaloids in Marine Algae: In review. *Marine Drugs*, 8: 269-284.
53. Walhström, N.; Stensland, B. y Bergman, J. 2004. Synthesis of the marine alkaloid caulersin. *Tetrahedron*, 60: 2147-2153.
54. Nielsen, P.; Carlé, J. y Christophersen, C. 1982. Final structure of caulerpicin, a toxin mixture from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 21 (7): 1643-1645.
55. Hernández, M. y Hernández, M. 2005. Bioactivos marinos: Una revisión. *Saber*, 17 (2): 188-194.
56. 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.
57. Segnini, M.; Brito, L.; Neyra, M.; D'Armas, H. y Barrios, J. 2011. Evaluación toxicológica del alga *Kappaphycus alvarezii* en la región Oriental de Venezuela. *Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura, III*: 341-350.
58. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Litopar. Venezuela.

59. Murillo, E. y Méndez, J. 2007. Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Tolima, Colombia.
60. Gros, E.; Pomilio, A.; Seldes, A. y Burton, G. 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Monografía N° 30. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C.-USA.
61. Wade, L. 2004. *Química Orgánica*. Quinta edición. Pearson Educación, S. A. Madrid.
62. Skoog, D.; Holler, J. y Nieman, T. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición. McGraw-Hill. Madrid.
63. 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.
64. Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC₅₀. En: *American Society for testing and Material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation*. Mayer, F. y Hamelink, J. (eds). Philadelphia, Pennsylvania. Pág.6.
65. Díaz, M.; Bula-Meyer, G.; Zea, S. y Martínez, A. 2006. Ensayos de actividad biológica y ecología química de extractos orgánicos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Boletín de Invesigaciones Marinas y Costeras*, 35: 241-247.
66. Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathol*, 45 (4): 493-496.
67. Maschek, J. y Baker, B. 2008. The chemistry of algal secondary metabolism. In: *Algal chemical ecology*. Amsler, C. D. (ed). Springer, Germany. Págs: 1-24.
68. Carvajal, L.; Hata, Y.; Sierra, N. y Rueda, D. 2009. Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombiana Forestal*, 12: 161-170.
69. Santizo, I. 2004. Identificación de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Trabajo de pregrado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

70. Arango, G. 2010. Metabolismo secundario: compuestos derivados del ácido shikímico. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia.
71. Casamayor, E. 2007. Estudio fitoquímico y aproximación genética en especies de la sección *Plinthine* del género *Arenaria* (*Caryophyllaceae*). Tesis doctoral. Departamento de Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.
72. Pérez-Rodríguez, E.; Aguilera, J. y Figueroa, F. 2003. Tissue localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role. *Journal of Experimental Botany*, 54 (384): 1093-1100.
73. Baker, B y Kerr, R. (eds). 1993. *Marine Natural Products-Diversity and Biosynthesis*. Springer, Germany.
74. Bhat, S.; Nagasampagi, B. y Sivakumar, M. (eds). 2005. *Chemistry of Natural Products*. Editorial Narosa Publishing House, New Delhi. India.
75. Batista, A.; Charles, M.; Mancini-Filho, J y Novoa, A. 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14 (2): 1-18.
76. Novoa, A.; Motidome, M.; Mancini-Filho, J.; Linares, F.; Tanae, M.; Brandao, L. y Lapa, A. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Glemin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37 (3): 372-382.
77. Ávalos, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de planta. *Serie de Fisiología Vegetal*, 2 (3): 119-145.
78. Araujo, L.; Carao, G.; Perez, J. y Cova, J. 2004. Efecto tóxico del extracto del alga roja *Gracilaria mammillaris* en células mononucleares humanas de sangre periférica. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 46 (1): 47-50.
79. Castellanos, M.; León, A. y Gonzalez, A. 2003. Caracterización química de la agarófita *Gracilaria blodgettii* Harvey en la Bahía de Cienfuegos, Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*, 24 (3): 185-192.
80. Handayani, D.; Ranova, R. y Bakhtiar, A. 2009. Preliminary studies on cytotoxic agent isolated from algae *Tydemania expeditions*. *Journal of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 4: 87-89.

81. Srivastava, N.; Saurav, K.; Mahanasrinivasan, V.; Kannabiran, K. y Singh, M. 2010. Antibacterial potential of macroalgae collected from the Madapam coast, India. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 1 (2): 72-76.
82. Souza, E.; De Queiroz, A.; Miranda, G.; Lorenzo, V.; Da Silva, E.; Freire-Dias, T.; Cupertino-Silva, Y.; Melo, G.; Santos, B.; Chaves, M. y Alexandre-Moreira, M. 2009. Anticonceptive activities of crude methanolic extract and phases, *n*-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). *Revista Brasileira de Farmaconogia*, 19 (1A): 115-120.
83. Valle-Zapata, H.; Ospina-Guerrero, S.; Galeano-Jaramillo, E.; Martínez-Martínez, A.; Márquez-Fernández, M. y López-Ortiz, J. 2009. Obtención de una fracción antimitótica del extracto etanólico de la macroalga *Digenia simplex*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38 (2): 109-117.
84. Pérez, P. 2001. Evaluación y estandarización de diferentes bioensayos para detectar citotoxicidad en productos naturales marinos. Trabajo de Maestría. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
85. Pino, O. y Lazo, F. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22 (1): 34-43.
86. Mc Laughlin, J. y Rogers, L. 1998. The use of biological assay to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-524.
87. Vinayak, R.; Appukuttan, S. y Chatterji, A. 2011. Bio-screening of a few green seaweeds from India for their cytotoxic and antioxidant potential. *Research Article*, 91: 2471-2476.
88. Ibrahim, A.; Mostafa, M.; El-Masry, M. y El-Naggar, M. 2005. Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31 (1): 146-155.
89. Manilal, A.; Sujith, S.; Kiran, G.; Selvin, J.; Shakir, C.; Gandhimathi, R. y Nataraja, M. 2009. *Journal of Marine Science and Technology*, 17 (1): 67-73.
90. Ara, J. 2001. Studies on bioactivity in some seaweeds from Karachi coast. Tesis doctoral. Department of Biochemistry. University of Karachi, Pakistán.

91. Morales, T.; Cubero, J.; Lanz, S.; Gomez-Guiñan, Y. y Segnini-Bravo, M. 2000. Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae). *Revista de Biología Tropical*, 48 (1): 199-206.
92. Hewitt, W. y Vincent, S. 1989. *Theory and Application of Microbiological Assay*. Academic Press, Inc, California.
93. Monks, N., Lerner, C.; Henriques, A.; Farias, F.; Schapoval, E.; Suyenaga, E.; Da Rocha, A.; Schwartzmann, G. y Mothes, B. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 281: 1-12.
94. Oraday, M.; Verde, M.; Martínez-Lozano, S. y Waksman, N. 2004. Active fractions from four species of marine algae. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 53: 165-170.
95. Tüney, I.; Cardici, B.; Unal, D. y Sukatar, A. 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal Biology*, 30: 171-175
96. 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.
97. Kandhasamy, M y Arunachalam, K. 2008. Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology*, 7 (12): 1958-1961.
98. Emmanuel, J.; Rosemary, S.; Elaiyaraja, S.; Sivaraman, K.; Lakshmikandan, M.; Murugan, A. y Raja, P. 2011. Potential antibacterial activity of selected green and red seaweeds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5 (14): 1-7.
99. Flores, M.; D'Armas, H. y Herrera, H. 2007. Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. *Ciencia*, 15: 1-12.
100. Hernández, M.; Hernández, M. y Troccoli, L. 2008. Actividad antibacteriana y antimicótica de *Spirobranchus giganteus giganteus* (Serpulidae: Polychaeta) de

Guayacán, Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. *Saber*, 20 (3): 283-288.

101. Arencibia, D.; Rosario, L. y Curveco, D. 2009. Principales bioensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su actividad. *Revista de Toxicología en Línea*, 1: 40-52.
< http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf > (17/03/2012).
102. Martínez, M.; Fernández, N.; Lloret, J.; Marín, A. y Martínez, C. 2006. Ejercicio interlaboratorio con bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros III. Bioensayo con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. *Ciencias Marinas*, 32 (1B): 139-147.
103. Mora-Cristancho, J.; Zea, S.; Santos-Acevedo, M. y Newmark-Umbreit, F. 2007. Capacidad antimitótica de extractos de esponjas marinas del Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 36: 167-179.
104. Pensando, D.; Huitorel, P.; Dolcini, V.; Amade, P. y Girard, J. 1998. Caulerpenyne interferes with microtubule dependent events during the first mitotic cycle of sea urchin eggs. *European Journal of Cell Biology*, 77 (1): 19-26.
105. Pensando, D.; Huitorel, P.; Dolcini, V.; Amade, P. y Girard, J. 1996. Effects of caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage. *Aquatic Toxicology*, 35 (3-4): 139-155.
106. Parent-Massin, D.; Fournier, V.; Amade, P.; Lemee, R.; Durandclement, M.; Delescluse, C. y Pensando, D. 1996. Evaluation of the toxicological risk to humans of caulerpenyne using human hematopoietic progenitors, melanocytes and keratinocytes in culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 47: 47-59.
107. Barbier, P.; Guise, S.; Huitorel, P.; Amade, P.; Pensando, D.; Briandand, C. y Peyrot, V. 2001. Caulerpenyne from *Caulerpa taxifolia* has an antiproliferative activity on tumor cell line SK-N-SH and modifies the microtubule network. *Life Sciences*, 70: 415-429.
108. Ghosh, P.; Adhikari, U.; Ghosal, P.; Pujol, C.; Carlucci, M.; Damonte, C. y Ray, B. 2004. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 65: 3151-3157.
109. Cavas, L.; Baskin, Y.; Yurdakoc, K. y Olgun, N. Antiproliferative and newly attributed apoptotic activities from an invasive marine alga: *Caulerpa*

- racemosa* var. *cylindracea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 339 (1): 111-119.
110. Bakker, M. y Alvarado, P. 2006. Alcanos lineales de la cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides* (Salicaceae), *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae), *Ulmus pumila* (Ulmaceae) y *Fraxinus americana* (Oleaceae) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana*, 44 (1): 58-63.
 111. Erakın, S. y Güven, K. 2008. The Volatile Petroleum Hydrocarbons in Marine Algae around Turkish Coasts. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 50: 167-182.
 112. Mironov, G.; Shchekaturina, T y Tsimbal, I. 1981. Saturated Hydrocarbons in Marine Organisms. *Marine Ecology Progress Series*, 5: 303-309.
 113. Injoon, Y.; Jieun, J.; Yunju, C.; Jiwon, H.; Ho-Sung, Y.; Sung, H.; y Sunghwan, K. 2011. Characterization and comparison of biodiesels made from korean freshwater algae. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32 (8): 2830-2832.
 114. Carlson, L.; Oje, C.; Xu, A. y Lee, M. 2010. Algae to alkanes. Department of Chemical & Biomolecular Engineering, University of Pennsylvania, Philadelphia.
 115. Duran, L. 2009. Estudio de la actividad frente a bacterias patógenas de cinco especies algales: pros y contras del protocolo de aislamiento guiado por bioensayo. Trabajo de maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional, México.
 116. Jeyanthi, L.; Dhanalakshmi, V. y Shekhar, C. 2012. Antibacterial activity of *Sargassum ilicifolium* and *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4 (1): 700-705.
 117. Sarma, N.; Krishna, M. y Pasha, S. 2006. Marine algal natural products: contributions from India in the global context. *Indian Journal of Chemistry*, 45B: 433-449.
 118. Georgina, L. y Torres, R. 2008. Macroalgas y pasto marino, útiles bioindicadores de contaminación por hidrocarburos fósiles en sistemas acuáticos. *Revista ContactoS*, 68: 38-46.
 119. Frikha, F.; Kammoun, M.; Hammami, N.; Mchirgui, R.; Belbahri, L.; Gargouri, Y.; Miled, N. y Ben-Rebah, F. 2011. Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez. *Ciencias Marinas*, 37 (2): 113-124.

120. Goecke, F.; Hernández, V.; Bittner, M.; González, M.; Becerra, J. y Silva, M. 2010. Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45 (2): 325-330.
121. Waliszewski, S.; Szymczynski, G.; Serafin, Z.; Infanzon, R. y Siliceo, J. 2002. Ésteres de ftalatos-factor orquidotóxico. *Revista Internacional de Contaminación ambiental*, 18 (2): 91-105.
122. Namikoshi, M.; Fujiwara, T.; Nishikawa, T. y Ukai, K. 2006. Natural abundance ^{14}C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. *Marine Drugs*, 4: 290-297.
123. Lyutskanova, D.; Ivanova, V.; Stoilova-Disheva, M.; Kolarova, M.; Aleksieva, K. y Peltekova, V. 2009. Isolation and characterization of a psychrotolerant *Streptomyces* strain from permafrost soil in Spitsbergen, producing phthalic acid ester. *Journal Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23 (2): 1220-1224.
124. Ramalakshmi, S. y Muthuchelian, K. 2011. Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Mallotus tetracoccus* (roxb.) Kurz, by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2 (6): 1449-1454.
125. Sosa, A.; Montero, M. y Juárez, F. 2009. Contenido de ácidos grasos y conjugados del ácido linoleico en carne de bovinos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10 (10): 1-84.
<<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100919.pdf>>
(10/06/2012).
126. Ordaz, G. 2007. Obtención y caracterización de algunos metabolitos secundarios del celenterado *Eunicea sp.* y su bioactividad. Trabajo de grado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Venezuela.
127. Neyra, M. 2011. Evaluación química, posible letalidad y citotoxicidad del alga invasora *Kappaphycus alvarezii*. Trabajo de grado. Departamento de Química. Universidad de Oriente, Venezuela.
128. Ferreira, L.; Casanova, I.; Peoporine, N.; Guaratini, T.; Colepicolo, P.; Oliveira, E. y Clapis, R. 2012. Apolar compounds in seaweeds from Fernando de Noronha Archipelago (northeastern coast of Brazil). *International Journal of Analytical Chemistry*, 1:1-5.

129. Vidal, A.; Fallarero, A.; Silva, E.; De Oliveira, A.; De Lima, A.; Pavan, R.; Vuorela, P. y Mancini-Filho, J. 2006. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42 (4): 489-600.
130. Castillo, D; Lanza, J. y Crescente, O. 2010. Identificación preliminar de algunos constituyentes del tallo de *Paullinia fuscescens* (Sapindaceae) y actividad biológica. *Avances en Química*, 5 (1): 57-61.
131. Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu, V. y Hsu, M. 2007. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 739-742.
132. Manilal, A.; Sujith, S.; Seghal Kiran, G.; Selvin, J. y Shakir, C. 2009. Biopotentials of mangroves collected from the southwest coast of India. *Global Journal of Biotechnology y Biochemistry*, 4 (1): 59-65.
133. Huang, H.; Wu, S.; Liao, H.; Jiang, C.; Huang, R. y Chen Y. 2005. Induction of apoptosis by three marine algae through generation of reactive oxygen species in human leukemic cell Lines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53: 1776-1781.
134. Otton, R. y Curi, R. 2005. Toxicity of a mixture of fatty acids on human blood lymphocytes and leukaemia cell lines. *Toxicology in vitro*, 19: 749-755.
135. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, R. y Paredes-Lopez, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3): 173-289.
136. De Rosa, S.; Kamenarska, Z.; Stefanov, K.; Dimitrova-Konaklieva, S.; Najdenski, C.; Tzvetkova, I.; Ninova, V. y Popov, S. 2003. Chemical composition of *Corallina mediterranea* Areschoug and *Corallina granifera* Ell. et Soland. *Z. Naturforsch*, 58 (c): 325-332.
137. Yun-peng, Z.; Xiao-yun, W.; Zhi-can, W.; Yin, L.; Cheng-xin, F. y Shao-yuan, C. 2006. Essential oil of *Actinidia macrosperma*, a catnip response kiwi endemic to China. *Journal of Zhejiang University, Science B*, 7 (9): 708-712.
138. Cronin G. 2001. Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories. In: *Marine chemical*

ecology. McClintock, B. y Baker, B. (eds). Editorial CRC press. New York. USA.

139. Zheng, C.; Jung-Sung, Y.; Tae-Gyu, L.; Hee-Young, C.; Young-Ho, K. y Won-Gon, K. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *Federation of European Biochemical Societies*, 579: 5157-5162.
140. Kalembe, D. y Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10): 813-29.
141. Rowshanu, M. y Rezaul, M. 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) phthalate and anhydrosophoradiol-3-acetate isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) flower. *Mycobiology*, 37 (1): 31-36.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Resultados de la actividad antibacteriana de algunas fracciones del extracto soluble en éter de petróleo.

Tabla A1. Actividad antibacteriana mostrada por algunas fracciones del EEP del alga *C. racemosa*.

Bacterias	IV	V	VI	X	XIII
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	12	14	14	11
<i>Yersinia sp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	10	15	13	9
<i>Staphylococcus aureus subsp aureus</i>	8	12	12	14	11
<i>Escherichia coli</i>	14	11	14	14	11
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	12	13	15	15	14

(+++) Actividad fuerte (diámetro del halo > 16 mm); (++) Actividad moderada (diámetro del halo entre 11-16 mm); (+) Actividad débil (diámetro del halo entre 7-11 mm); (-) sin actividad
Diámetro del disco: 10 mm; Concentración: 40 mg·ml⁻¹; Discos dosificados con 25 µl.

APÉNDICE B

Resultados de la actividad letal y citotóxica de algunas fracciones del extracto soluble en acetato de etilo.

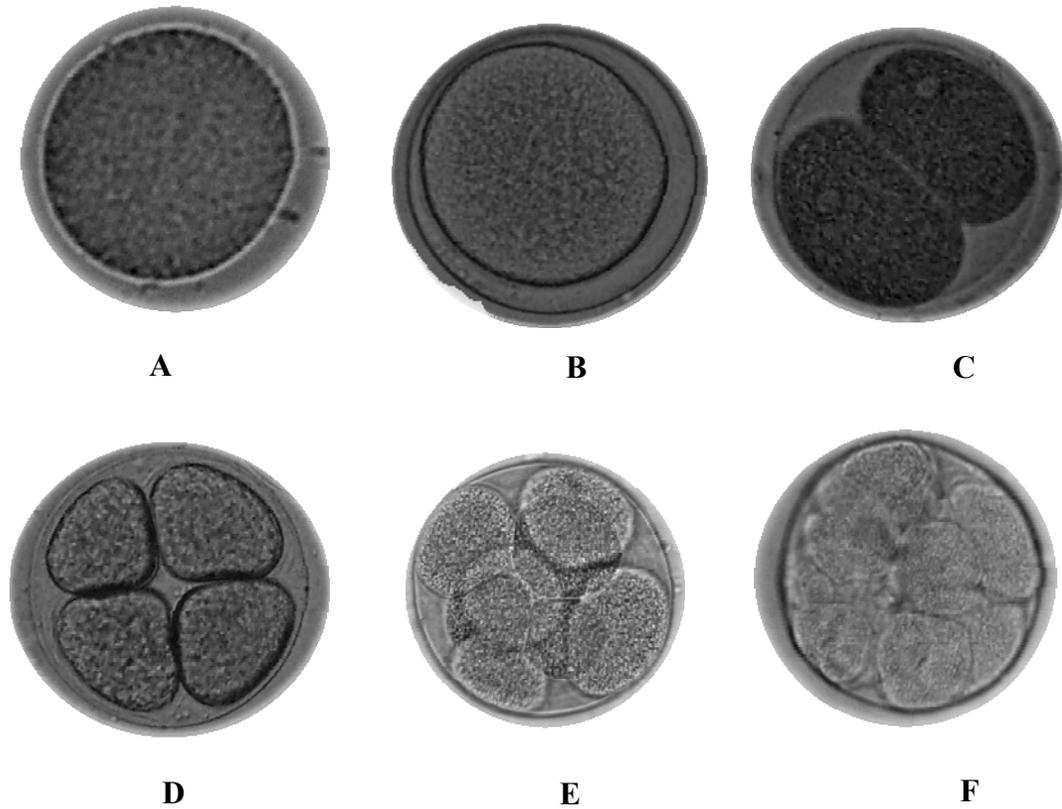


Figura B1. Etapas del desarrollo embrionario del erizo de mar *Lytechinus variegatus*. Control del bioensayo de citotoxicidad. **A**: óvulo fecundado; **B**: formación de la membrana de fecundación. Estados del desarrollo embrionario del erizo de mar: **C**: huevo dividido en 2 blastómeros; **D**: formación de 4 blastómeros; **E**: segmentación del núcleo en 8 blastómeros y **F**: división del cigoto en 16 blastómeros.

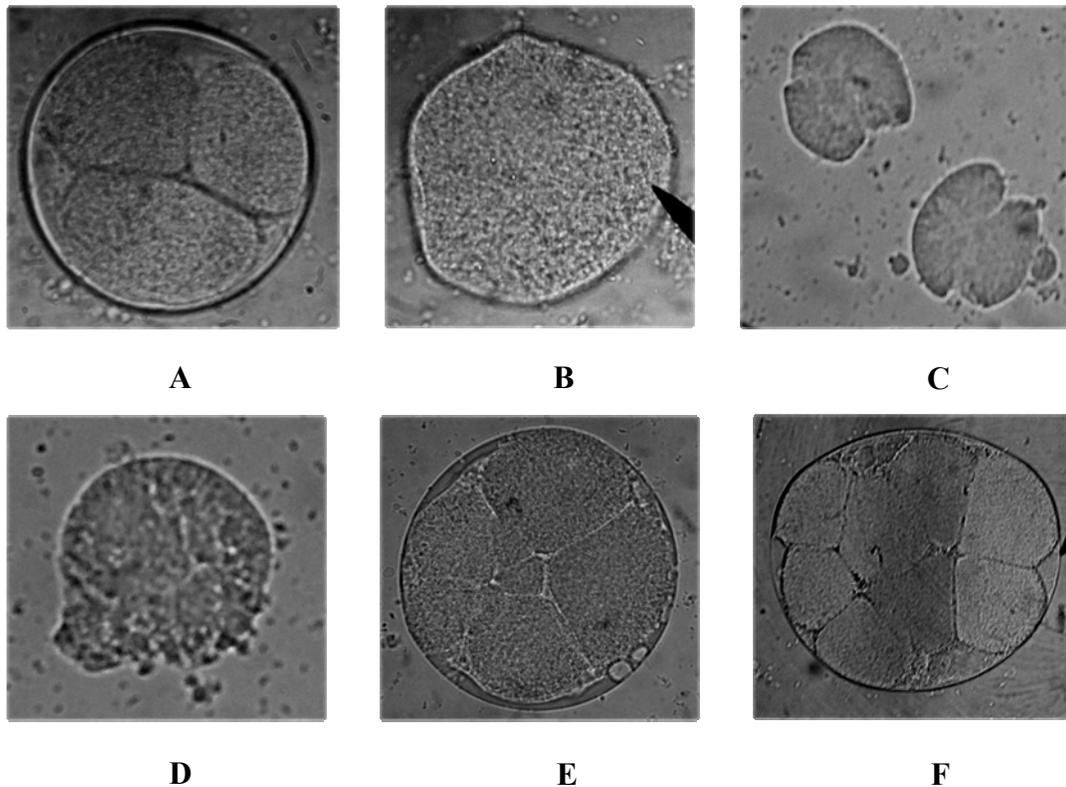


Figura B2. Efectos citotóxicos originado por las fracciones A, B y C del EAE, en el desarrollo embrionario de *L. variegatus*. **A:** desincronización en la división celular; **B:** deformación de la membrana celular; **C-E:** división mitótica alterada y **F:** célula con blastómeras poco redondeadas.

Tabla B1. Actividad letal mostrada por algunas fracciones del EAE frente al crustáceo *A. salina*.

Fracciones	CL ₅₀ (µg·ml ⁻¹)		Método estadístico
	24 horas	48 horas	
A	N.A	3,25	Probit
B	1000	0,52	Probit
C	1000	0,00	Probit
D	100	0,03	Moving average

N.A: no activo.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Evaluación De Los Metabolitos Secundarios Y La Actividad Biológica Del Alga Invasora <i>Caulerpa racemosa</i>
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Martínez S., Laurenis Del V.	CVLAC	18.112.665
	e-mail	laurenismartinez@gmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Alga verde
Bioactividad
Metabolitos secundarios

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química

A el alga *Caulerpa racemosa* (recolectada en la Isla de Cubagua), se le realizaron extracciones exhaustivas con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol. A cada uno de los extractos se le realizó análisis fitoquímico, así como pruebas de actividad antibacteriana, citotoxicidad con huevos de erizo de mar *Echinometra lucunter* y letalidad contra el crustáceo *Artemia salina*. El análisis químico demostró la presencia de cumarinas, alcaloides, esteroides insaturados, polifenoles y glicósidos cardiotónicos. El EEP mostró actividad antibacteriana débil (diámetro del halo entre 7-11 mm) contra las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia sp.*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*; mientras que EAE, solo fue activo contra la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus*. Asimismo, algunas fracciones del EEP mostraron actividad débil y moderada (diámetro del halo entre 11-16 mm) contra el crecimiento de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* y *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*. Aunque ninguno de los extractos mostraron actividad letal frente al crustáceo *A. salina*, algunas fracciones del EAE mostraron actividad fuerte a las 48 horas de exposición con CL_{50} menor a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Los tres extractos ensayados y algunas fracciones del EAE, originaron efectos citotóxicos de gran importancia en el desarrollo embrionario del erizo de mar *E. lucunter* con un porcentaje de anomalías entre 50-70%. Después de realizar el fraccionamiento cromatográfico continuo en el EEP, mediante CG/EM se logró caracterizar los compuestos mayoritarios de algunas fracciones y subfracciones: 4,4,7a-trimetil-5,6,7,7a-tetrahidro-2(4H)-benzofuranona, nonadecano, Z-5 nonadeceno, 8-heptadeceno, heptadecano, ácido tetradecanoico, 6,10,14-tetrametil-2-pentadecanona, éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico, éster hexadecílico del ácido hexadecanoico, ftalato de dibutilo, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido y ácido hexadecanoico. Los análisis de IR, RMN de ^1H , ^{13}C y DEPT-135, permitieron caracterizar el ácido heptadecanoico en la subfracción IV_{5.2}. En el EAE, se identificaron mediante CG/EM, los compuestos éster etílico del ácido hexadecanoico, éster mono-(2-etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico y ftalato de dibutilo; y a través de los análisis de RMN unidimensional, se pudieron caracterizar los compuestos éster di-(etilhexil) del ácido 1,2 bencenodicarboxílico y el 4-metoxi-3-metil-1-naftoato de metilo.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

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	4.297.804
	e-mail	htrinidad86@hotmail.com
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
Campos Santaella, Ysabel	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
Henriquez G., Willian C.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.249.952
	e-mail	whenriquez66@gmail.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2012	11	23

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-martínezl.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: NACIONAL (Opcional)

Temporal: TEMPORAL (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIATURA

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 – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUMPEL
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

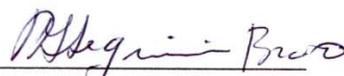
JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.



Haydelba D'Armas, PhD
Asesora



Dra. Mary Isabel Segnini
Coasesora



Laurenis V. Martínez Sánchez