

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



“Estudio Ficoquímico del Alga Roja *Gracilaria blodgettii* (Harvey)”

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por el Br.
Rodrigo Rodríguez, para
optar al título de
Licenciado en Química,
Mención Tecnología

Caracas, Junio 2016.


Nosotras; Dra. Dilsia J. Canelón Investigadora de la Cátedra de Química Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina la Universidad Central de Venezuela y Dra. María Rodríguez, Investigadora del Laboratorio Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

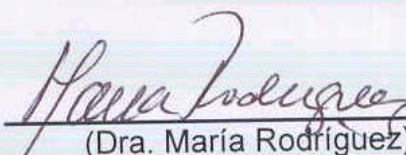
“Estudio Ficoquímico del Alga Roja *Gracilaria blodgettii* (Harvey).”

Que presenta el Br. Rodríguez Sánchez Rodrigo Antonio, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos de la Escuela de Química, en la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2015-2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 01 Junio de 2016

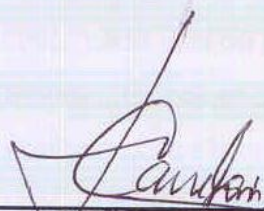


(Dra. Dilsia J. Canelón)

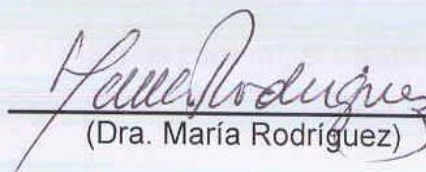


(Dra. María Rodríguez)

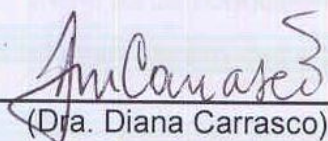
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "Estudio fícoquímico del Alga Roja *Gracilaria blodgettii* (Harvey)". Presentado por el Br. Rodrigo Antonio Rodríguez Sánchez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



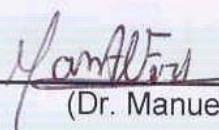
(Dra. Dilsia J. Canelón)



(Dra. María Rodríguez)



(Dra. Diana Carrasco)



(Dr. Manuel Fermín)

AGRADECIMIENTOS

Esta sección del manuscrito ha sido una de las más difíciles de escribir, se ha postergado innumerables veces, hasta momentos justo antes de su entrega final, esto es debido a que reconocer y agradecer a todos aquellos que tuvieron implicaciones en este trabajo, es una tarea titánica, que comienza desde el día en el que me embarqué en esta investigación, hasta el día mismo de la presentación final.

Muchos personajes se han cruzado, en lo que pudo haber sido un camino muy difícil, cada uno de ellos ha dejado experiencias y aprendizajes, que el no valorar será necio. Es por esto, que desde los más cercanos amigos, hasta los más cercanos colaboradores han sido cómplices, en lo que es para mí, el comienzo del trabajo que definirá mis rumbos, por esto les agradezco a todos.

Como también agradezco a mi tan amada UCV, mi alma mater que llevo orgullosamente tatuado en mí ser, como ejemplo de academia y de luchas victoriosas. En donde compartí mucho y aprendí demasiado, para solo darme cuenta que un universo de conocimientos, está allá afuera esperando por ser descubierto, que en mi caso espero sea a través de mi hermosa química, hecha mía porque en palabras sencillas define mi ciclo por este plano.

A todas aquellas personas que dejaron involucrarme en este maravilloso mundo de los productos naturales, quiero darles mis más sinceros agradecimientos, son ejemplo de vida y de academia, son los científicos a los cuales espero un día poderme parecer.

Extenderme más de una página, para agradecer a todo aquel que está relacionado con este trabajo y con mi persona, suena muy lógico, pero a la vez innecesario puesto el que lea aquí, es y será agradecido por ser mi cómplice.

A ti, gracias totales!

RESUMEN

En la actualidad hay un creciente interés en el estudio ficoquímico de productos naturales marinos, debido a la importancia biológica y química que tienen los compuestos aislados a partir de estos. En vista de la gran cantidad de algas rojas que se desarrollan en los ambientes tropicales venezolanos y considerando lo pocos antecedentes existentes de las mismas, este trabajo se centró en realizar el análisis ficoquímico de *Gracilaria blodgettii*, con el fin de caracterizar los metabolitos presentes en esta alga utilizando métodos cromatográficos para la separación y purificación; esto como parte del proyecto que se ejecuta en conjunto entre el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias y la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

El material algal seco, fue macerado utilizando MeOH por 72 h, filtrando la solución y evaporándola a presión reducida, proceso que se repitió por cuadruplicado para obtener un extracto crudo, que fue redissuelto en una mezcla 1:1 MeOH:H₂O, observando un residuo insoluble, del cual se aisló el colesterol (I). A la solución hidroalcohólica, se le realizan extracciones con solventes de creciente polaridad, obteniendo así los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo. Del extracto de hexano, se caracterizaron una mezcla de ácidos grasos compuesta por los ácidos: palmítico, esteárico, ecosenoico y nervónico. Para el extracto de diclorometano, se aislaron tres compuestos, dos de tipo ácido graso, el ácido mirístico (III), el láurico (IV) y un compuesto del tipo bencimidazol polisustituido (V), no reportado en la literatura de compuestos orgánicos. Del residuo hidrometanólico, se aisló el xilitol (VI) y un agarano (VII) del cual se identificó la unidad estructural de 4-O-metil-L-galactosa. Para un total de 7 metabolitos caracterizados por espectroscopia (¹H RMN, ¹³C RMN, IR) y espectrometría (EM).

Palabras Claves: Rhodophytas, *Gracilaria blodgettii*, ficoquímica.

ÍNDICE

ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ESPECTROS	xi
INTRODUCCIÓN	1
1.- Algas	4
1.1.- División Rhodophyta	6
1.2.- Familia Gracilariaceae	8
1.3.- Género <i>Gracilaria</i>	9
1.4.- <i>Gracilaria blodgettii</i>	10
1.4.1.-Hábitat y Localización:	12
1.5.- Productos Naturales Marinos en Algas Rojas.....	13
1.5.1.- Terpenos.....	13
1.5.2.- Éteres Policíclicos	15
1.5.3.- Polifenoles	16
1.5.4.- Polisacáridos.....	18
1.5.5.- Ácidos Grasos, Ésteres y Gliceroles	19
1.5.6.- Metabolitos citados para el género <i>Gracilaria</i>	21
2.- JUSTIFICACIÓN	27
3.- OBJETIVOS	28
3.1.- Objetivo General	28
3.2.- Objetivos Específicos.....	28
4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	29
4.1.- Materiales y equipos utilizados	29
4.1.1.- Soportes cromatográficos	29
4.1.2.- Solventes y Reactivos	29
4.1.3.- Equipos Utilizados.....	30

4.2.- Recolección del material algal	31
4.3.- Estudio Ficoquímico.....	32
4.3.1.- Fraccionamiento del Residuo Insoluble en MeOH:H ₂ O (1:1)	34
4.3.2.- Fraccionamiento del Extracto de Hexano	36
4.3.3.- Fraccionamiento del Extracto de Diclorometano.....	38
4.3.4.- Fraccionamiento del Extracto Acetato de Etilo.....	44
4.3.5.- Fraccionamiento del Residuo Hidrometanólico.....	45
5.- Resultados y Discusiones	47
Compuesto I: Colesterol ((3 β)- <i>Colest-5-en-3-ol</i>)	47
Compuesto II: Mezcla de Ácidos Grasos: Hexadecanoico C(16:0), Octadecanoico C(18:0), Eicosenoico C(20:1)n-12 [ω 9], Tetraeicosanoico C(24:1)n-6 [ω 9].	54
Compuesto IV: Ácido Láurico (<i>Ácido dodecanoico</i> C(12:0))	67
Compuesto VI: Xilitol ((2R, 3R, 4S)-Penta-1,2,3,4,5-pentol)	78
Compuesto VII: Polisacarido de tipo Agarano.....	81
5.- CONCLUSIONES	85
6.- RECOMENDACIONES	86
7.-BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología vegetativa y estructuras reproductivas de <i>Gracilaria sp.</i>	7
Figura 2. <i>Gracilaria blodgettii</i> , hábito.	11
Figura 3. <i>Gracilaria blodgettii</i> , corteza y médula.	11
Figura 4. <i>Gracilaria blodgettii</i> , espermatangios tipo <i>Textorii</i> .	11
Figura 5. <i>Gracilaria blodgettii</i> , cistocarpo.	11
Figura 6. <i>Gracilaria blodgettii</i> , tetrasporángios.	11
Figura 7. Zona tropical Característica del alga <i>Gracilaria blodgettii</i> , los puntos amarillos representan las zonas donde ha sido reportada.	12
Figura 8. Estructuras presentes en <i>L. obtusa</i> .	19
Figura 9. Estructuras presentes en <i>L. filiformis</i>	19
Figura 10: Zona recolección de la muestra de <i>Gracilaria blodgettii</i> .	31
Figura 11. Protocolo de separación de los metabolitos según polaridad	32
Figura 12. Protocolo de lavados residuo insoluble en mezcla hidrometanólica.	34
Figura 13. Protocolo de separación y purificación de metabolitos presentes en el extracto de diclorometano.	40
Figura 14. Tratamiento de fracción polar A' del extracto de Diclorometano.	43
Figura 15. Protocolo para la obtención de metabolitos presenten es el residuo hidrometanólico.45	45
Figura 16. Estructura del Compuesto I: Colesterol	52
Figura 17. Fragmentos típicos del colesterol por espectrometría de masas	53
Figura 18. Cromatograma de la muestra RRHE comparado con el patrón de ácido nervónico en la misma escala.	58
Figura 19. Estructura de los Ácidos Palmítico, Esteárico, Eicosenoico y Nervónico 60	60
Figura 20. Estructura propuesta para el compuesto III Ácido Mirístico	66
Figura 21. Estructura propuesta para el compuesto IV Ácido Láurico	71
Figura 22. Propuesta de estructura del Compuesto V	76
Figura 23. Estructura del compuesto VI Xilitol	81
Figura 24. Agarobiosa y agarobiosa metilada reportada para agares de <i>G. blodgettii</i>	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Masas de los extractos obtenidos de <i>Gracilaria blodgettii</i> .	33
Tabla 2. Fracciones obtenidas de la CC en fase normal del Residuo soluble en Hexano	35
Tabla 3. Fracciones obtenidas de la CC en fase normal del extracto de Hexano	37
Tabla 4. Fracciones obtenidas de la CC en fase normal del Extracto de CH ₂ Cl ₂	39
Tabla 5. Fracciones obtenidas de la CC RP ₁₈ de la unión las fracciones K y L	41
Tabla 6. Fracciones obtenidas de la CC de la unión las fracciones P y Q	42
Tabla 7. Fracciones obtenidas de la CC en fase reversa del Extracto de AcOEt	44
Tabla 8. Fracciones obtenidas de la CC por exclusión molecular Sephadex LH-20 del residuo hidromatanólico	46
Tabla 9: Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H para el Compuesto I comparado con los desplazamientos para el Colesterol	50
Tabla 10: Desplazamientos químicos de RMN de ¹³ C para el Compuesto I comparado con los desplazamientos para el Colesterol	50
Tabla 11: Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H del compuesto II comparado con los desplazamientos del ácido cis-15-tetracosenoico (ácido nervónico)	55
Tabla 12. Desplazamientos químicos RMN ¹³ C para el ácido cis-15-tetracosenoico (ácido nervónico)	57
Tabla 13. Compuestos detectados por el Espectrómetro de masas	60
Tabla 14. Longitudes de onda en espectroscopia IR para el Ácido Mirístico	63
Tabla 15. Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H para el Ácido Mirístico	64
Tabla 16. Desplazamientos químicos de RMN de ¹³ C del compuesto III comparado con el ácido mirístico	66
Tabla 17. Longitudes de onda en espectroscopia IR para el compuesto IV	68
Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H para el ácido láurico	69
Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN de ¹³ C para el compuesto IV comparado con los desplazamientos del ácido láurico	71
Tabla 20. Desplazamientos del espectro ¹ H RMN del compuesto V comparado con los desplazamientos en el modelador ACD de la estructura propuesta.	77

Tabla 21. Desplazamientos del espectro ^{13}C RMN del compuesto V comparado con los desplazamientos en el modelador ACD de la estructura propuesta.	77
Tabla 22: Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el compuesto VI y para el Xilitol	79
Tabla 23. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el Compuesto VI comparado con el Xilitol	80
Tabla 24. Comparación señales RMN ^{13}C del compuesto VII y unidades de LM4	83

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^{13}C para el Compuesto I tomado en CDCl_3 parte superior, y RMN ^{13}C DEPT 135 en la parte inferior	48
Espectro 2. RMN ^1H para el Compuesto I tomado en CDCl_3	49
Espectro 3. Espectro de masas del colesterol	52
Espectro 4. RMN ^1H del compuesto II	54
Espectro 5. RMN de ^{13}C del compuesto II ácido nervónico	56
Espectro 6. Fragmentograma del Ácido Nervónico	59
Espectro 7 Espectro IR del Compuesto III Acido Mirístico	63
Espectro 8. RMN de ^1H Compuesto III	64
Espectro 9. Espectro ^{13}C del compuesto III Ácido Mirístico	65
Espectro 10. Espectro IR del compuesto IV	68
Espectro 11. Ampliación 0 - 2,5 ppm Espectro ^1H del compuesto IV	69
Espectro 12. Espectro ^{13}C del compuesto IV	70
Espectro 13. Espectro de ^1H RMN del compuesto V	73
Espectro 14. Espectro de ^{13}C RMN y DEPT 135 del compuesto V	74
Espectro 15. Espectro HETCOR para el compuesto V	75
Espectro 16. Espectro de masas para el compuesto V	76
Espectro 17. Espectro ^1H del compuesto VI	78
Espectro 18. Espectro ^{13}C y DEPT 135 del compuesto VI	89
Espectro 19. Espectro de masas para el compuesto V Xilitol	80
Espectro 20. RMN ^1H para el Compuesto VII	82
Espectro 21. Espectro RMN ^{13}C para el compuesto VII	82

INTRODUCCIÓN

Las plantas y diversos seres vivos, se han venido utilizando desde tiempos inmemoriales con fines medicinales, el conocimiento se ha transmitido principalmente de manera verbal. Uno de los primeros registros escritos sobre los productos naturales se le atribuye a Hipócrates, quien tenía en su poder el uso de la manzanilla y de la cicuta. Las plantas se relacionan con propiedades curativas de acuerdo a su forma, color y hábitat, por ejemplo los embriones de *Chenopodium sp.* por parecerse a una lombriz, eran utilizados como antihelmínticos y por su forma las raíces de *Rauwolfia serpentina*, se utilizaban para combatir mordeduras de serpientes; independientemente de su aspecto, estas plantas son efectivas en los tratamientos indicados gracias a ciertos metabolitos secundarios presentes en ellas.¹

El creciente desarrollo en la llamada “medicina naturista”, ha generado un incremento en el número de escritos sobre la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones, involucrando de manera simultánea el interés científico en esta área, donde la etnobotánica entra con el papel de recopilar dichos conocimientos transferidos del día a día a una manera más precisa.

Las algas como organismos fotosintéticos que habitan en las principales fuentes de agua del planeta, bien sean dulces o marinas, constituyen los principales productores primarios de oxígeno en una superficie que representa el 70% de la Tierra. Las mismas son importantes en la investigación científica, puesto intervienen en procesos biológicos como fotosíntesis, nutrición, morfogénesis, entre otros. También, son utilizadas como suplemento alimenticio, fertilizantes, fármacos y como biocombustibles en la búsqueda de energías renovables.

Los productos naturales marinos han llamado la atención de biólogos y químicos del mundo por más de 5 décadas. Hasta la fecha, se han aislado aproximadamente 16.000 productos a partir de organismos marinos, y se han reportado cerca de 6.800 publicaciones. En adición a éstas, existen otras

publicaciones que cubren síntesis, revisiones, estudios de actividad biológica, estudios ecológicos, que están también asociados al tema de productos naturales marinos.²

Los especímenes acuáticos han sido objeto de estudio químico desde hace varios siglos, debido a la extraordinaria importancia y la enorme variedad de compuestos de origen natural que tienen impacto sobre la vida. Ante las dificultades para delimitar especies y aprovechando la información disponible en el campo de la química de algas, numerosos investigadores se han preocupado por el estudio de rasgos que pudieran ser útiles para la clasificación algal y han intentado encontrar alguna correlación entre la composición química y las características taxonómicas de las algas. Las rutas biosintéticas responsables de la síntesis de productos naturales difieren de un taxón a otro, variando los tipos y cantidades de compuestos expresados. La distribución de estos se corresponden bien con los arreglos taxonómicos existentes sobre la base de criterios más tradicionales, como la morfología.

El estudio de los metabolitos secundarios es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación estructural y la caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por fuentes naturales.³ El análisis de los metabolitos secundarios para la caracterización de la especie, se desarrolla en el marco científico mediante la quimiotaxonomía o también llamada quimiosistemática, que puede ser vista como una ciencia híbrida, que complementa los datos morfológicos disponibles para mejorar la sistemática de plantas tratando de clasificar e identificar organismos, según diferencias demostrables y similitudes en las composiciones bioquímicas.

Al extracto bruto de una planta se le puede separar en sus componentes individuales, mediante el uso de una o más técnicas de cromatografía, incluyendo papel, capa fina, gaseosa, o la cromatografía líquida de alta presión. El

cromatograma resultante, proporciona una representación visual o característica "huella digital", de una especie de planta según los metabolitos en estudio.⁴

Cerca de 941 productos naturales marinos se caracterizaron para el año 2009 representando aproximadamente el 24% de los compuestos químicos obtenidos para el ambiente marino en el 2006, entre ellos se dedica el estudio a organismos como: fitoplancton, esponjas, cnidarios, bryozoa, moluscos, tunicado, equinodermos y macroalgas como por ejemplo: algas verdes, pardas y rojas.⁵

Las algas rojas contribuyen a las diversas industrias como cosmética, farmacéutica, agrícola y química con compuestos como el agar y la carragenina, utilizados como agentes gelificantes y emulsificantes⁶; también se reportan como recurrentes metabolitos de tipo terpenoides y polifenoles halogenados.⁷

La clasificación del alga en estudio para el presente trabajo especial de grado, se rige según los criterios taxonómicos de Wynne, M. que se muestran a continuación:⁸

Imperio	Eukaryota
Reino	Protista
Phylum	Rhodophyta
Clase	Florideophyceae
Orden	Gracilariales
Familia	Gracilariaceae
Género	Gracilaria
Especie	<i>G. blodgettii</i>

1.- Algas

Las algas son organismos acuáticos de carácter autótrofos, que incluyen un amplio grupo de especies de vida acuática, que capturan energía solar a través de la fotosíntesis, usándola para convertir sustancias inorgánicas en materia orgánica. Las algas, en general, tienen una estructura relativamente simple; pueden ser unicelulares, un filamento de células, una placa de células o un cuerpo sólido que puede comenzar a aproximarse a la complejidad del cuerpo de una planta. Las algas macroscópicas a pesar de su variedad presentan características morfológicas comunes:

- ✓ Todas parecen fijadas al sustrato por medio de rizoides, similares a las raíces de las plantas, pero cuya función es únicamente fijar la planta ya que no toman nutrientes. En ocasiones estos rizoides son sustituidos por un disco basal de fijación.
- ✓ Tras la estructura de fijación hay una estirpe más o menos larga, que puede medir desde unos pocos milímetros hasta alcanzar un par de metros de longitud.
- ✓ La parte más visible del alga es la lámina, que puede adoptar diversas formas: filamentosas, huecas, comprimidas y delgadas, gruesas, incrustantes no calcificadas e incrustantes calcificadas.

Si bien la mayor parte de las algas son fotosintéticas como las plantas, no se le consideran plantas porque carecen de muchas estructuras vegetales como raíces, tallos, hojas especializadas y vascularidad.

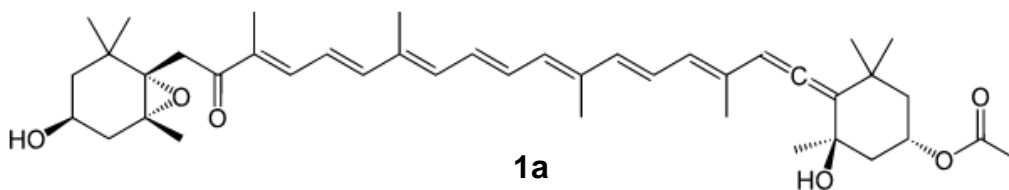
Las algas macroscópicas presentan adaptaciones que les permiten vivir en aguas poco profundas a lo largo de las costas, donde se acumulan, habitualmente,

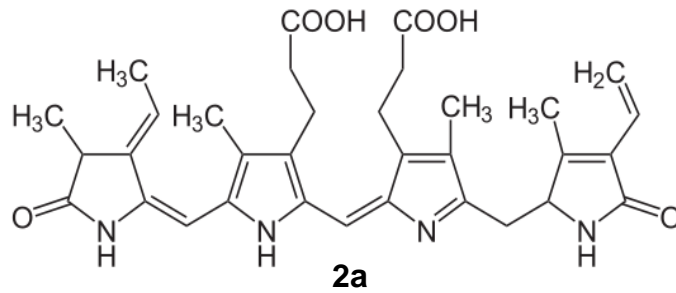
muchos nutrientes. También se encuentran en estanques de agua dulce, lagos, ríos, manantiales de aguas termales, hielo polar, suelo húmedo, entre otros.^{9,10}

Cuando se habla de algas, se hace referencia a organismos muy heterogéneos que comparten características comunes tales como: poseen clorofila, no poseen un sistema vascular, no desarrollan embrión y las estructuras formadoras de gametos (gametangios) o de esporas (esporangios) nunca diferencian células estériles de protección.

La heterogeneidad presente en las algas se pone de manifiesto por la diversidad de grupos que incluye: verdiazules, verdes, pardas, rojas, doradas, etc. Estos grupos fueron establecidos por su coloración pero, posteriormente la consideración de otras características ha contribuido a delimitar mejor sus diferencias. Entre estos caracteres se pueden mencionar: tipo de pigmento, tipo de sustancias que poseen y naturaleza de los flagelos.

Aunque todas las algas poseen clorofila, no todas son de color verde y el mismo puede resultar enmascarado, por otros pigmentos de diferente color, como la fucoxantina (**1a**) (color pardo) y la fucoeritrina (**2a**) (color rojo).





Como organismos autotróficos, constituyen los responsables principales de la captación de la energía lumínica en los ecosistemas acuáticos y de la productividad primaria, que genera la materia orgánica disponible para los consumidores.⁶

Las algas se clasifican en 7 divisiones importantes según varios investigadores unificando: Cyanobacterias, Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Ochrophyta, Chlorophyta y Rhodophyta.^{6,8,11,12}

1.1.- División Rhodophyta

Esta división posee aproximadamente 400 géneros y 3900 especies siendo un grupo de algas que presenta una gran simplicidad desde el punto de vista estructural, pero en la reproducción de grupos avanzados, poseen un ciclo de vida único entre los organismos vivos, con tres fases distintas, dos con carga cromosómica diploide y una con carga cromosómica haploide (Figura 1). Existen formas unicelulares (género *Phorphyridium*), formas filamentosas y pseudoparenquimáticas.

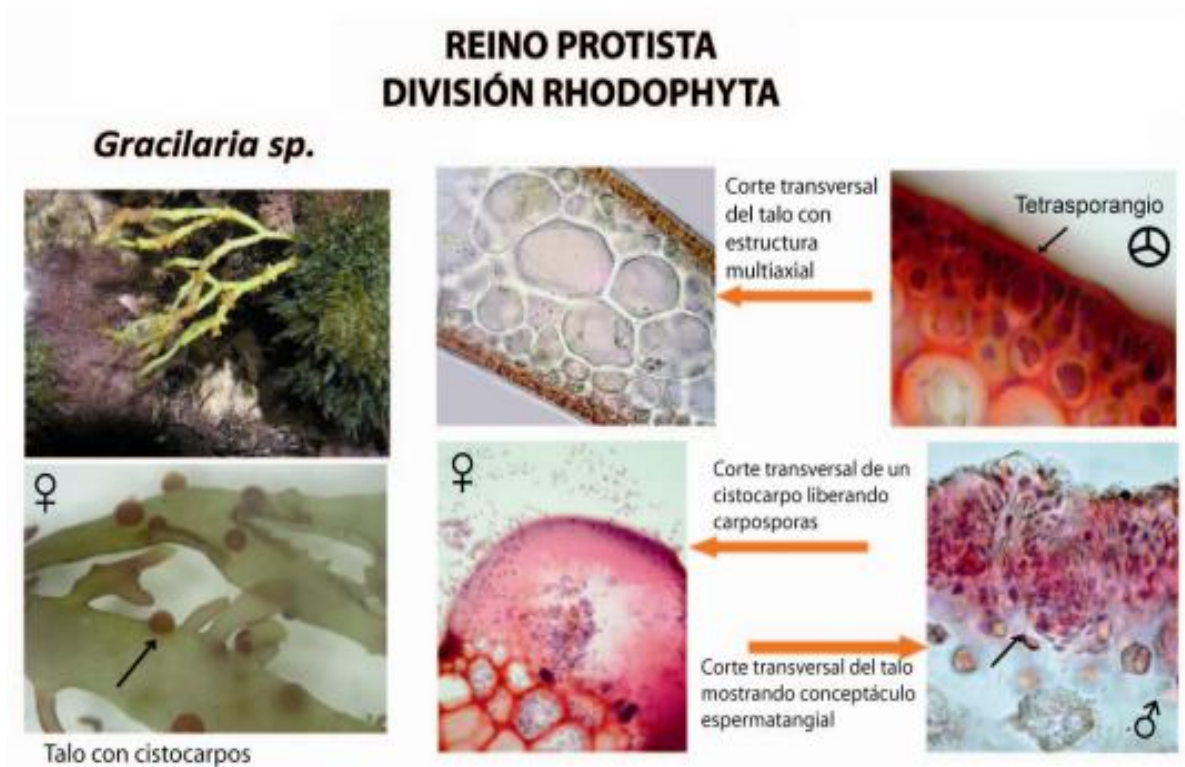


Figura 1. Morfología vegetativa y estructuras reproductivas de *Gracilaria sp.*¹³

Estas algas se caracterizan por su color rojo, rosado o púrpura, aunque dependiendo del ambiente en que crecen, se puede presentar variedad en la coloración, desde el verde hasta el rojo y esto depende del balance de los pigmentos que contienen se encuentran comúnmente las ficobilinas las clorofilas A y D, α y β -carotenos, y xantofilas. En su pared celular se hallan celulosa y pectinas, además, poseen el almidón y grasas como sustancia de reserva. Su aporte a la industria son compuestos con relevante importancia como el agar y la carragenina, ya que son utilizados como agentes gelificantes y emulsificantes.⁶

1.2.- Familia Gracilariaceae¹⁴

Los miembros de esta familia poseen un talo bien definido en ejes, ramas y un pié de fijación. Los ejes son producidos a partir de una germinación esporica tipo dumontia, es decir, una vez adherida al sustrato, la espora se divide una o más veces en un plano perpendicular al mismo. Luego se producen divisiones horizontales que forman una masa hemisférica de células dentro de la pared celular original, lo que a su vez, da lugar a la costra polistromática, de la que surgen uno o más ejes erectos.

Los ejes o ramas del talo pueden en corte transversal ser cilíndricos, completamente aplanados, laminares o presentar la condición intermedia. Se presentan dos tipos de esporas: (a) tetrasporas producidas meióticamente (meiosporas) en tetrasporangios cruzados corticales y (b) carposporas producidas mitóticamente en el cistocarpio del carposporofito.

El sistema reproductivo femenino está compuesto de una rama carpogonial de tres células y un tricógino conspicuo, o protricógino ubicado en el extremo distal de la célula femenina, o carpogonio. En los miembros de la familia, el gonimoblasto se forma directamente después de la fertilización del núcleo femenino o carpogonial sin mediar ni un filamento o célula conectiva, ni una célula auxiliar; es decir, el desarrollo es tipo Nematium.

En términos embrionarios, el desarrollo es de tipo somático, es decir, no hay una línea germinal distintiva. En cambio, hay linajes celulares que dan lugar tanto a células somáticas como a células gaméticas. En esta familia se presentan géneros de vida libre (*Curdiea*, *Hydropuntia*, *Gracilaria*, *Gracilariopsis* y *Melanthalia*) y adelfoparásitos (filogenéticamente relacionados al hospedero (*Congracilaria* y *Gracilariophyla*)).¹⁴

1.3.- Género *Gracilaria*¹⁴

La historia taxonómica del género *Gracilaria* (Greville) se ha caracterizado por una permanente inestabilidad y confusión. Las razones de ello residen en la complejidad anatómica de los representantes y las subsecuentes dificultades para interpretar los caracteres de delimitación específica.¹⁵

Gracilaria (Greville) es un género peculiar, entre el resto de las algas en cuanto a la estructura y organización de las células masculinas o espermiófitos. Se presentan cuatro arreglos: en poros superficiales o epicorticales, conocidos como tipo Chorda por *Gracilaria chorda* (Holmes); en depresiones cóncavas corticales, tipo Textorii por *Gracilaria textorii* (Suringar), en depresiones corticales profundas ovoides, urciformes, tipo Verrucosa por *Gracilaria verrucosa* (Hudson) y en conceptáculos subcorticales, múltiples o multicavitarios, lo cual conlleva a confusiones al momento de realizar la clasificación.¹⁴

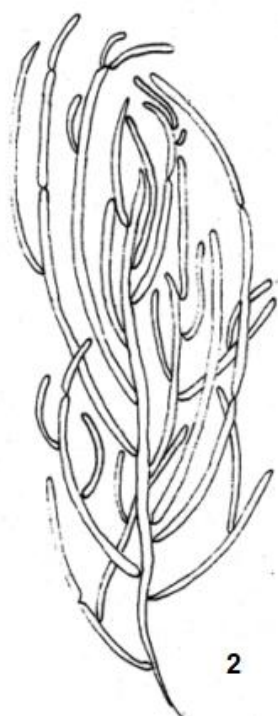
En Venezuela se han citado 11 especies del género *Gracilaria* mostradas a continuación:¹⁶

Gracilaria andersoni (Grunow) Kylin
Gracilaria bursa-pastoris (Gmelin) Silva
Gracilaria cervicornis (Turner) J. Agardh
Gracilaria cornea (J. Agardh)
Gracilaria cuneata (J.E. Areschoug)
Gracilaria dominguensis (Kützinger)
Gracilaria lacunculata (Vahl) Howe
Gracilaria lemneiformis (Bory de St. Vincent)
Gracilaria mammillaris (Montagne)
Gracilaria venezuelensis (W.R. Taylor)
Gracilaria verrucosa (Hudson)

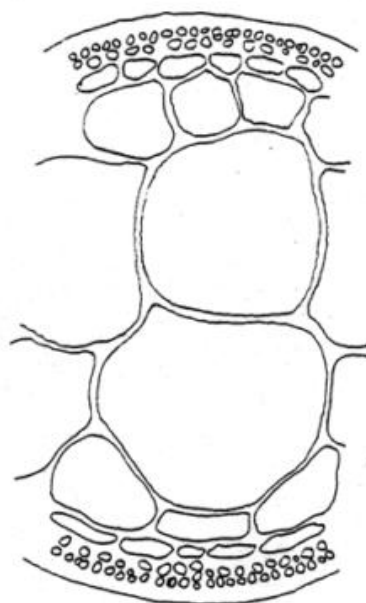
1.4.- *Gracilaria blodgettii*

El organismo a estudiar se conoce como *Gracilaria blodgettii* Harvey, 1853. El mismo posee un sinónimo taxonómico: *Gracilaria cylindrica* Børgesen, 1920.¹⁴

Son algas erectas, de hasta 14 cm de altura, textura suave y consistencia elástica (plegable), de color rojo-rosado *in situ* y café pálido una vez almacenadas en líquido. Pié de fijación rocoso y pequeño. Ramificación irregular, en varios planos, a veces secunda o alterna en algunas porciones. Ejes y ramas cilíndricas, 1.6-1.7 mm de diámetro constante, con constricciones en la base de las ramas y frecuentemente en porciones intercalares, curvadas. Segmentos de longitud variable. Consistencia flácida. Superficie lisa. Ápices agudos y redondeados. Estípites largos (Figura 2). La transición entre médula y corteza es abrupta. Médula de 7-10 células de ancho. Células medulares subesféricas a poligonales 340-600 μm de diámetro. Corteza de 8-12 capas celulares. Células corticales de 10-15 μm de largo por 7-10 μm de diámetro, anticlinales (Figura 3). Espermatangios tipo "textorii" 30-45 μm de alto por 30-50 μm de ancho (Figura 4). Cistocarpos apiculados y sésiles, 550-880 μm de alto por 750-1000 μm de diámetro (Figura 5). Carposporas en racimos. Gonimoblasto columnar. Tetrasporangios ovalados, 28-50 μm de largo por 26-35 μm de diámetro, distribuidos por todo el talo excepto en los ejes principales y porciones apicales, rodeados por 2-4 capas de células corticales evidentemente más elongadas que las células corticales ordinarias (Figura 6).¹⁴



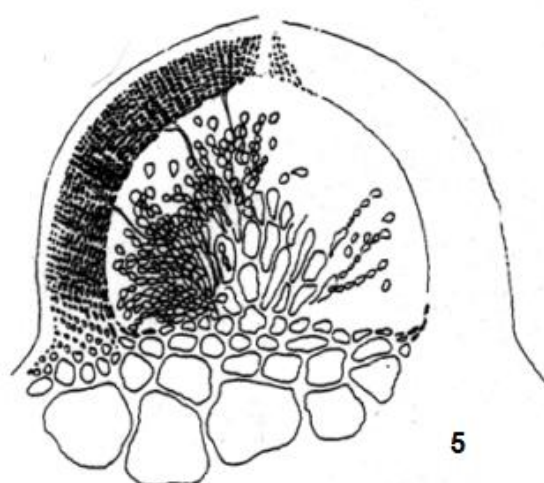
2



3

Figura 2. *Gracilaria blodgettii*, hábito.

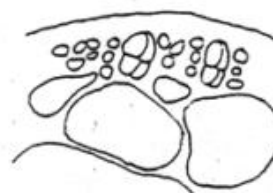
Figura 3. *Gracilaria blodgettii*, corteza y médula.¹⁴



5



4



6

Figura 4. *Gracilaria blodgettii*, espermatangios tipo *Textorii*.

Figura 5. *Gracilaria blodgettii*, cistocarpo.

Figura 6. *Gracilaria blodgettii*, tetrasporángios.¹⁴

1.4.1.-Hábitat y Localización:

El alga *G. blodgettii* se desarrolla en un hábitat marino, inframareal estricta de 1 a 110 m de profundidad, la misma se desarrolla sobre rocas u otro material duro. Asociada frecuentemente con especies del género *Ceramium*. Según reportes esta especie se distribuye a lo largo de la zona tropical ecuatorial destacando la zona de sur este asiático y la zona del Caribe con mayores asentamientos del espécimen (Figura 7).¹⁴

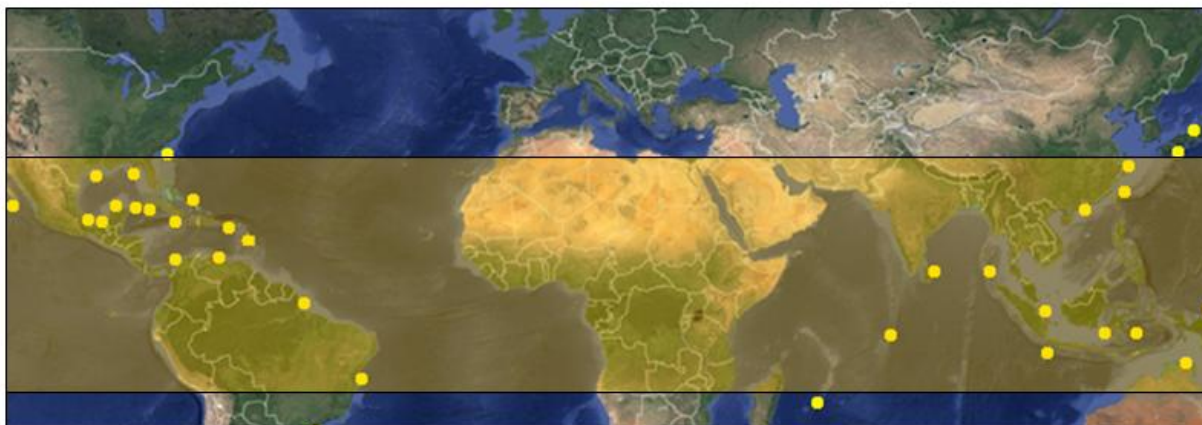


Figura 7. Zona tropical Característica del alga *Gracilaria blodgettii*, los puntos amarillos representan las zonas donde ha sido reportada.¹⁷

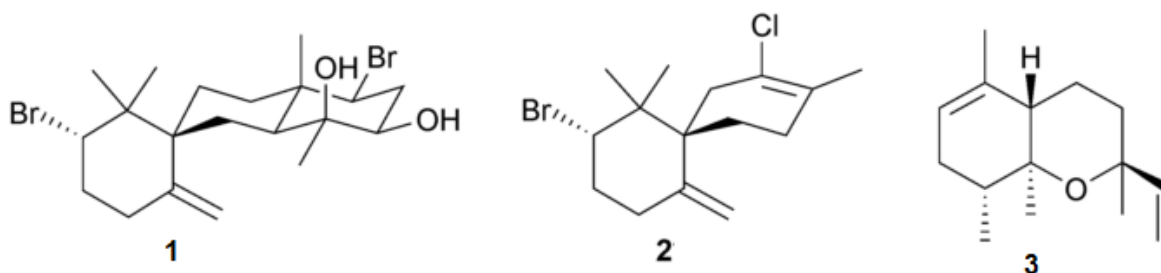
1.5.- Productos Naturales Marinos en Algas Rojas

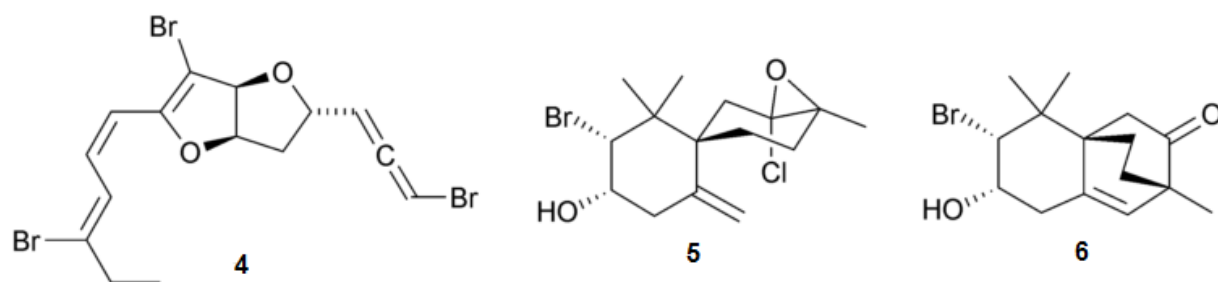
Numerosos trabajos de investigación han identificado diversos metabolitos para las especies terrestres. Las características que diferencian a los metabolitos marinos, son que en algunos casos la complejidad estructural es superior y se presentan grupos funcionales poco comunes en ambientes terrestres o la inclusión de diversos heteroátomos, como halógenos y azufre en las rutas biosintéticas.

Las algas rojas suelen contener los siguientes metabolitos característicos⁷:

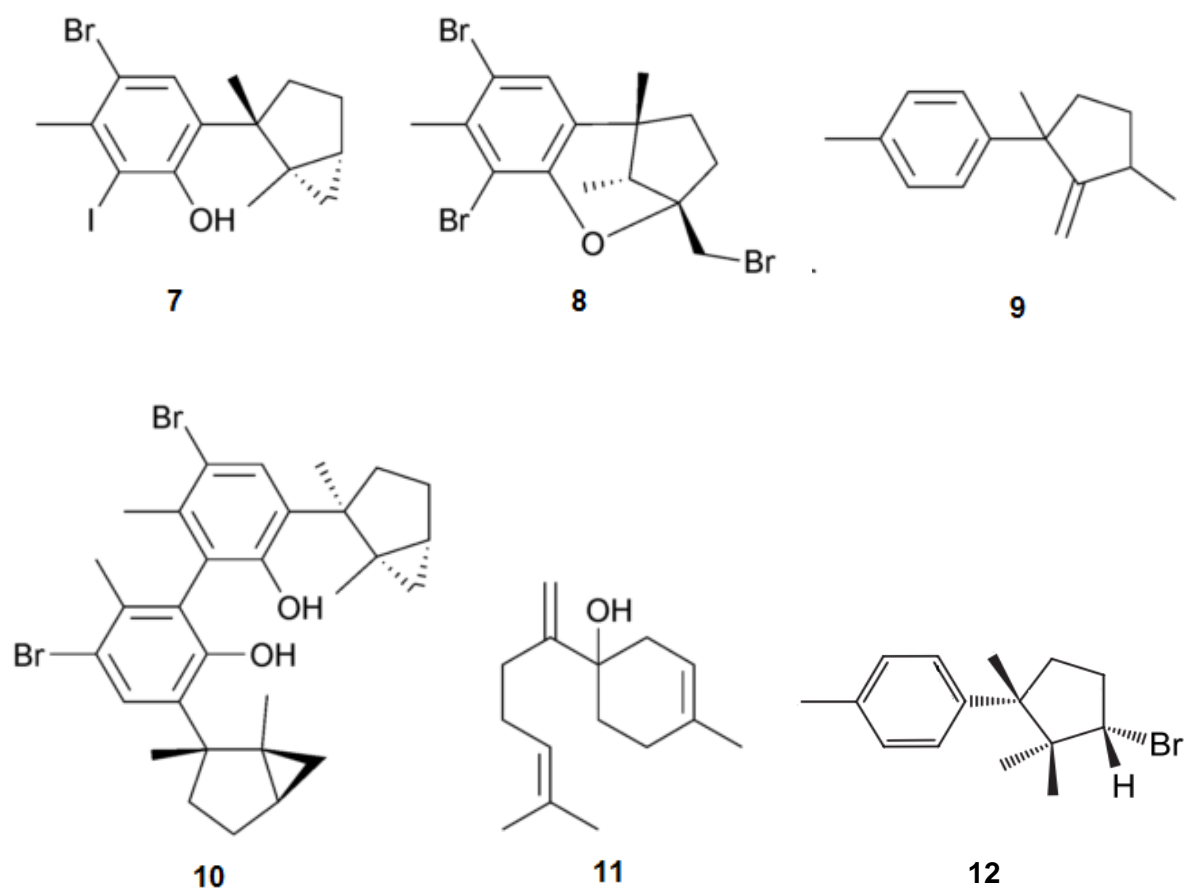
1.5.1.- Terpenos

Los diterpenos se encuentran recurrentemente en los organismos marinos, con diversas modificaciones estructurales. En ejemplares de *Laurencia mariannensis* colectados en las Islas Weizhou, China, se caracterizaron una serie de nuevos metabolitos: del tipo diterpenos bromados, 10-hidroxikahukueno B (**1**), dos sesquiterpenos, 9-desoxielatol (**2**) e isodactiloxeno A (**3**), una acetogenina bromada, laurenmarialeno (**4**), y dos nuevos sesquiterpenos halogenados (**5**) y (**6**).^{18,19}

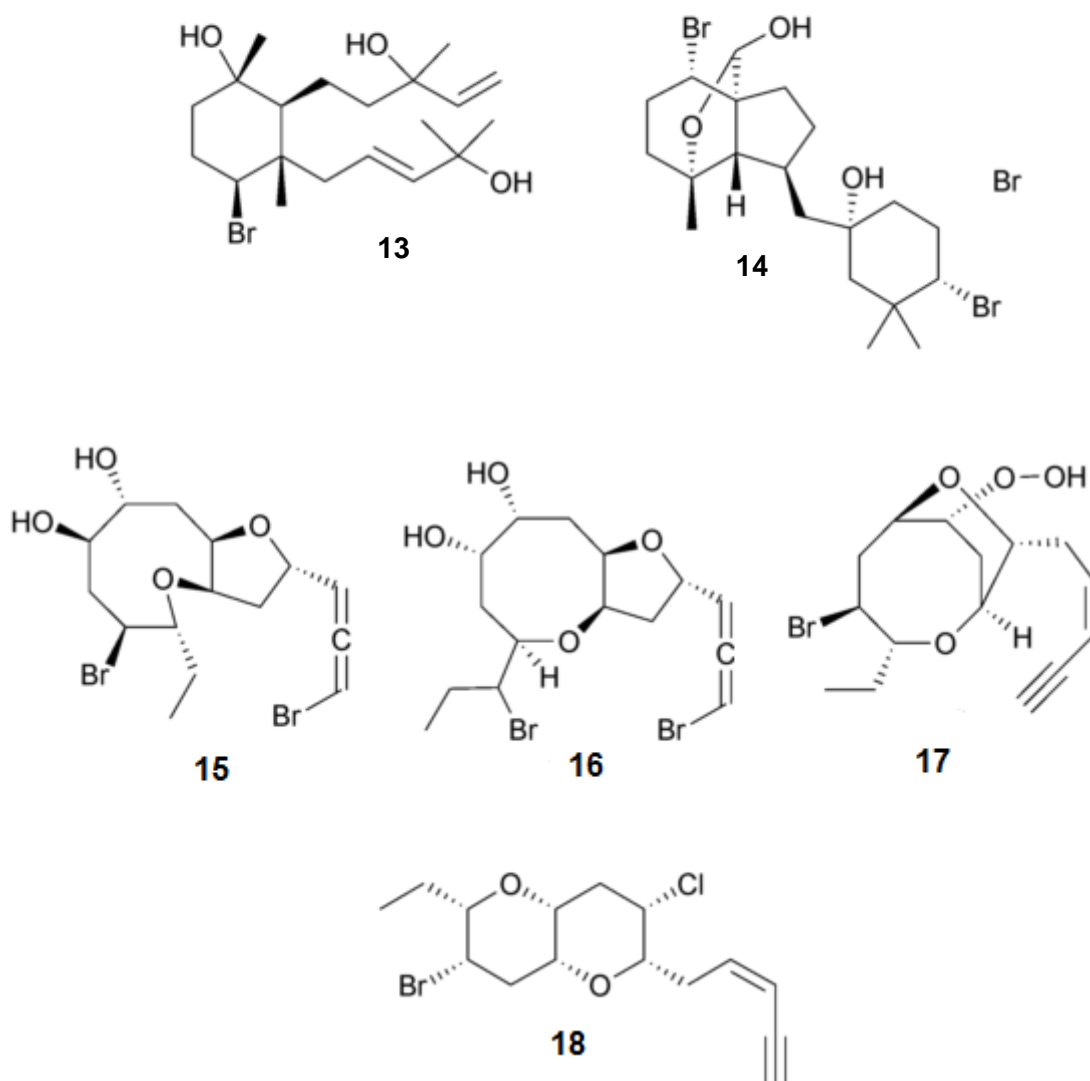




El alga *Laurencia microcladia* colectada en Chios, al norte de mar Egeo proporcionó una serie de nuevos metabolitos: tres sesquiterpenos aromáticos (**7**), (**8**) y (**9**), un dímero del ciclolaurano tipo sesquiterpeno (**10**), un alcohol sesquiterpénico (**11**) y (+)- α -isobromo-cupareno (**12**).²⁰

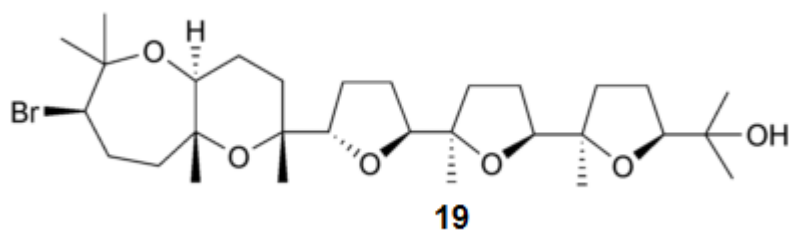


Se reportó para *Laurencia decumbens* siete nuevos metabolitos del tipo diterpenos bromados, entre los cuales se encuentran: laurendecumtriol (**13**), 11-diacetilpinaterpeno (**14**)²¹ y cuatro nonterpenoides halogenados C15-acetogeninas, laurendecumallenos A (**15**) y B (**16**) con laurendecumeninas A (**17**) y B (**18**).²²

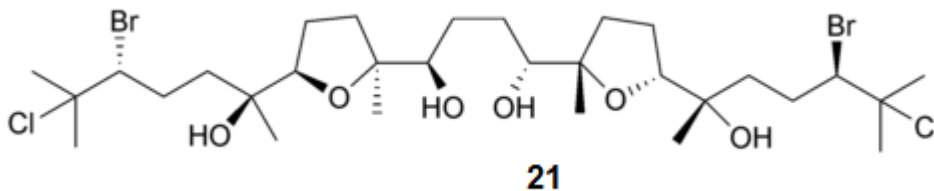
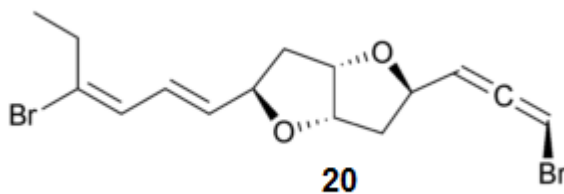


1.5.2.- Éteres Policíclicos

Los éteres policíclicos son otro tipo de compuestos relativamente característicos para algas rojas, los cuales representan un desafío estructural. De *Laurencia omaezakiana* ha sido aislado el triterpeno poliéter (+)-enshuol (**19**).²³

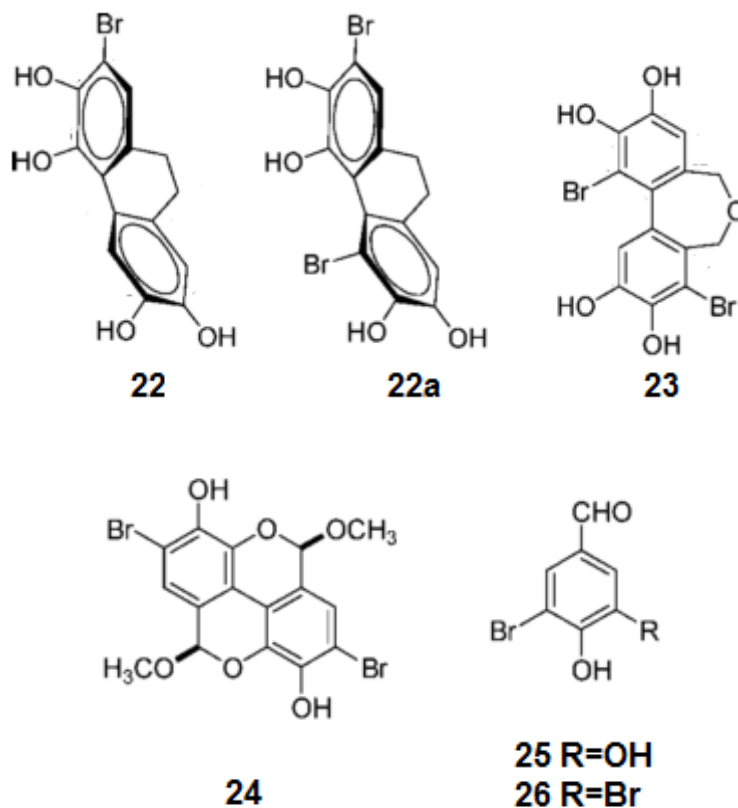


La estructura algo inusual de (-)-aplisialeno (**20**) aislado de *Laurencia okamurai*, a partir del extracto metanólico es otro metabolito con esqueleto carbonado del tipo éter policíclico²⁴ conjuntamente con un triterpeno poliéter (**21**) de *Laurencia intricata*.²⁵

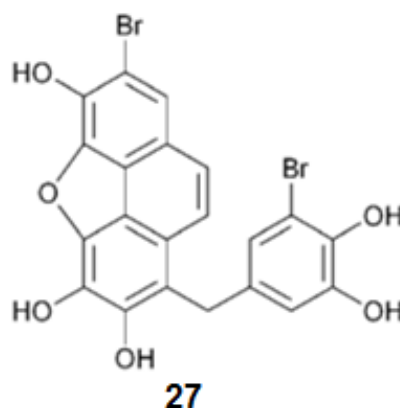


1.5.3.- Polifenoles

Estos metabolitos secundarios son característicos en este tipo de algas, los cuales se pueden considerar de suma importancia tanto a nivel de elucidación estructural como por sus propiedades antioxidantes. Un grupo de bromofenoles (**22-26**) se aislaron partir del alga *Polysiphonia urceolata*. identificando los compuestos como: 7-bromo-9,10-dihidrofenantreno-2,3,5,6-tetraol (**22**), 4,7-dibromo-9,10-dihidrofenantreno-2,3,5,6-tetraol (**22a**), 1,8-dibromo-5,7-dihidrodibenzo-[c,e]oxepina-2,3,9,10-tetraol (**23**), urceolatol (**24**), 3-bromo-4,5-dihidroxibenzaldehído (**25**) y 3,5-dibromo-4-hidroxibenzaldehído (**26**) los mismos fueron evaluados con α,α -difeníl- β -picrilhidrazil (DPPH) para cuantificar la actividad antioxidante, mediante la captación de radicales, presentando valores de IC_{50} entre 6,1 y 35,8 μ M, comparados con el control positivo hidroxitolueno butilado (BHT), el cual posee un IC_{50} de 83,8 μ M, se tiene que estos metabolitos secundarios (**22-26**) poseen una potente actividad captadora de radicales libres.²⁶



También fue aislado de *Polysiphonia urceolata* un bromofenol altamente oxigenado (**27**) llamado urceolatina, cuyo IC_{50} fue de 7,9 μ M, este metabolito fue evaluado con DPPH y mostró ser uno de los más potentes y prometedores dentro del grupo de polifenoles estudiados en esta especie.²⁷



1.5.4.- Polisacáridos

Los agaranos son compuestos con carácter quimiotaxonómico relevante para las algas dentro del phylum Rhodophyta, ya que son comúnmente aislados en estas y aunque son considerados metabolitos primarios porque se biosintetizan bajo las rutas regulares del anabolismo, sufren leves modificaciones a posteriori. Estos poseen gran utilidad a nivel industrial debido a su uso en alimentación como suplemento y agente gelificante.

El extracto acuoso de algas rojas *Laurencia obtusa* y *Laurencia filiformis* se comprende de complejos agaranos sulfatados. Aquellos provenientes de *L. obtusa* tienen unidades 3-enlazadas a unidades de β -D-galactosa, en parte sulfatados en la posición 2 o metiladas en la posición 6, mientras que en su mayoría las unidades son 4-enlazadas a unidades 3,6-anhidro- α -L-galactosa y α -L-galactosa-6-sulfato, algunas de las últimas unidades están sustituidas con β -D-xilosa en posición 3, lo que impide la ciclación (**28-28a**) (Figura 8). Las unidades β -D-galactosa 3 enlazadas de los agaranos de *L. filiformis*, están sulfatados principalmente en la posición 2,

pero aproximadamente la mitad de estos residuos también llevan la 4,6-O-(1-carboxyethylidene). Las unidades 4- enlazadas de 3,6-anhidro- α -L-galactosa son metiladas o sustituidas en parte, con los residuos individuales de β -D-xilosa en la posición 2 (**29-29a**) (Figura 9). Estos galactanos tienen algunas características estructurales comunes con los de otras especies de este mismo género, pero también con los que son específicos para estas especies.²⁸

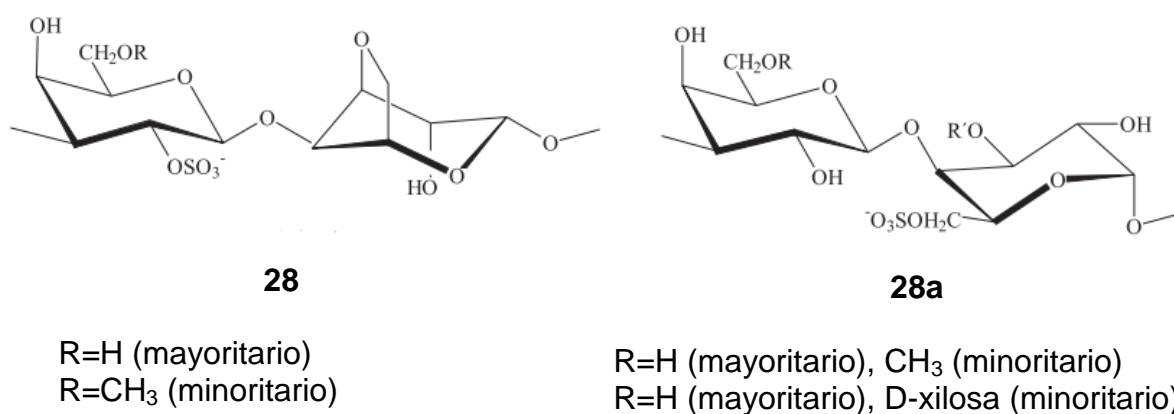


Figura 8. Estructuras presentes en *L. obtusa*.

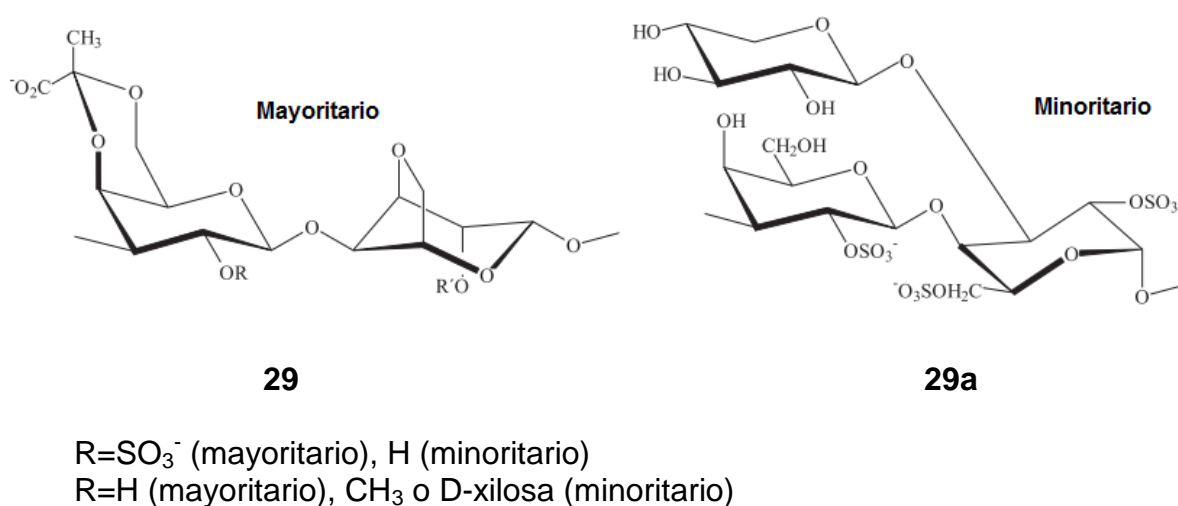
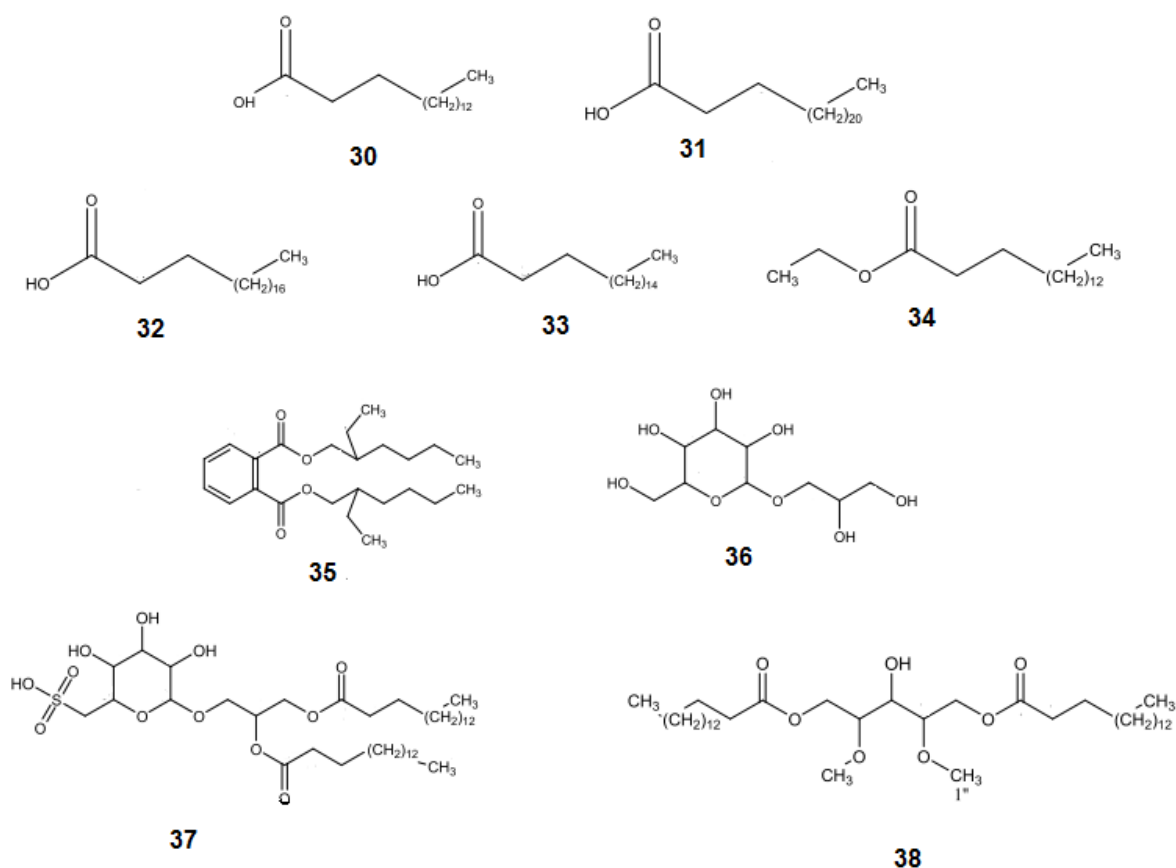


Figura 9. Estructuras presentes en *L. filiformis*.

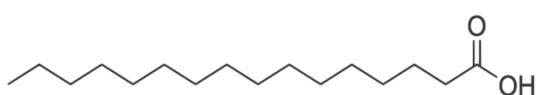
1.5.5.- Ácidos Grasos, Ésteres y Gliceroles

Para el alga roja *Gracilariopsis hommersandii* se caracterizaron 9 metabolitos: los ácidos grasos (**30**, **31**, **32**, **33**), un éster (**34**), el ftalato (**35**), un galactopiranosilglicerol (**36**), el sulfoquinovosil diacilglicerol (**37**) y finalmente, una estructura nueva de tipo polioliol similar al xilitol (**38**). El metabolito que presentó mayor actividad antiinflamatoria fue el ácido eicosanoico (**32**), con IC_{50} de 11,65 $\mu\text{g/mL}$, comparado con el control de quercitina cuyo IC_{50} fue igual a 1,07 $\mu\text{g/mL}$. Estos compuestos son provenientes del tratamiento cromatográfico del extracto de hexano a excepción del compuesto **36** que fue aislado del extracto de diclorometano.²⁹

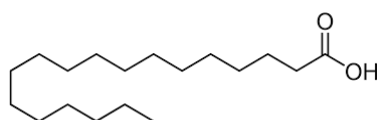


1.5.6.- Metabolitos citados para el género *Gracilaria*

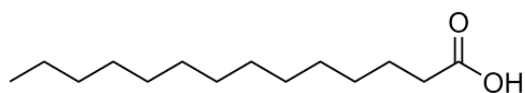
En el estudio de *G. verrucosa*, se aislaron los ácidos grasos: palmítico (39), esteárico (40), mirístico (41), oleico (42), palmitoleico (43), araquidónico (44), cuya importancia radica en la relación quimiotaxonómica para las algas pertenecientes al género *Gracilaria*; también fue aislado del extracto lipídico, el inositolfosfoceramida (45), así como también se obtuvieron diversos aldehídos y algunos monosacáridos.³⁰



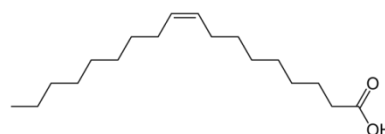
39



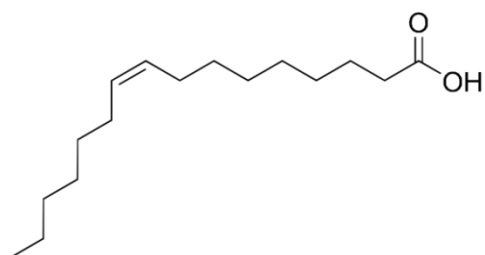
40



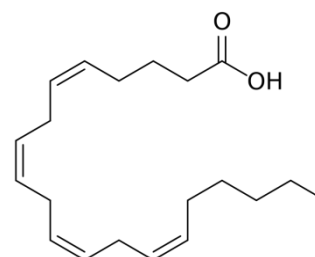
41



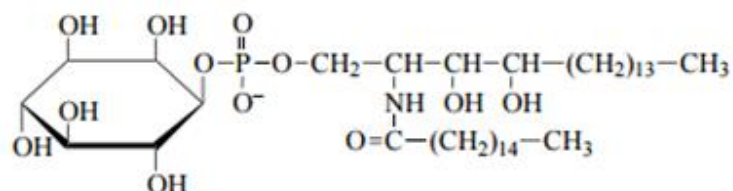
42



43

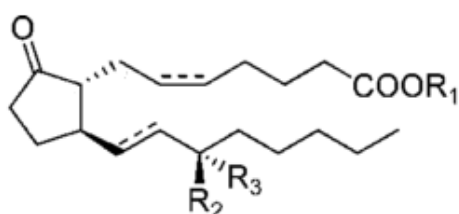


44

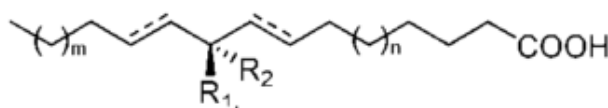


45

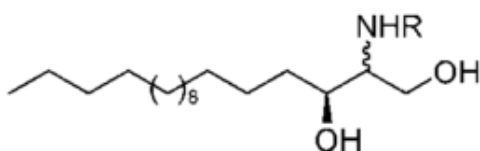
Un análisis químico de los componentes anti-inflamatorios del alga roja *Gracilaria verrucosa* condujo al aislamiento de 11-desoxiprostaglandinas (**46-49**), una ceramida (**50**) y un ácido graso ceto C16 (**51**), junto con los ácidos grasos oxigenados (**52-59**). Se evaluó la actividad anti-inflamatoria de los compuestos aislados (**46-59**) mediante la determinación de sus efectos inhibidores sobre la producción de mediadores pro-inflamatorios en lipopolisacáridos activados por células RAW 264.7 de macrófagos murinos. Los compuestos **54** y **55** exhibieron la mayor actividad antiinflamatoria.³¹



- 46 $R_1 = H$ $R_2 = H$ $R_3 = OH$ $\Delta^{5,13}$
 47 $R_1 = CH_3$ $R_2 = H$ $R_3 = OH$ $\Delta^{5,13}$
 48 $R_1 = H$ $R_2 = H$ $R_3 = OH$ Δ^{13}
 49 $R_1 = H$ $R_2, R_3 = O$ Δ^5

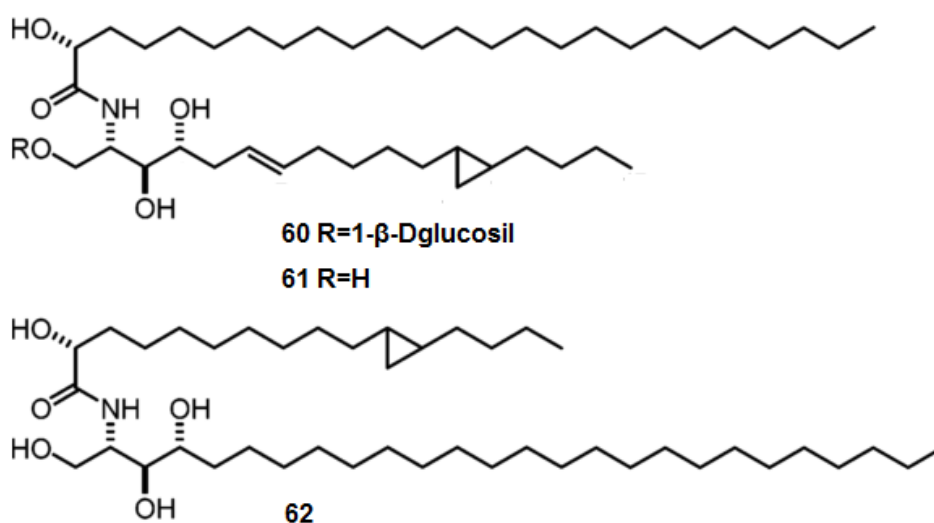


- 51 $n = 1$ $m = 3$ $R_1, R_2 = O$ Δ^{10}
 52 $n = 2$ $m = 2$ $R_1, R_2 = O$
 53 $n = 2$ $m = 2$ $R_1 = OH$ $R_2 = H$ Δ^8
 54 $n = 2$ $m = 4$ $R_1, R_2 = O$ Δ^8
 55 $n = 1$ $m = 5$ $R_1, R_2 = O$ Δ^{10}
 56 $n = 2$ $m = 4$ $R_1 = H$ $R_2 = OH$ Δ^8
 57 $n = 2$ $m = 4$ $R_1, R_2 = O$
 58 $n = 3$ $m = 3$ $R_1, R_2 = O$
 59 $n = 4$ $m = 2$ $R_1, R_2 = O$

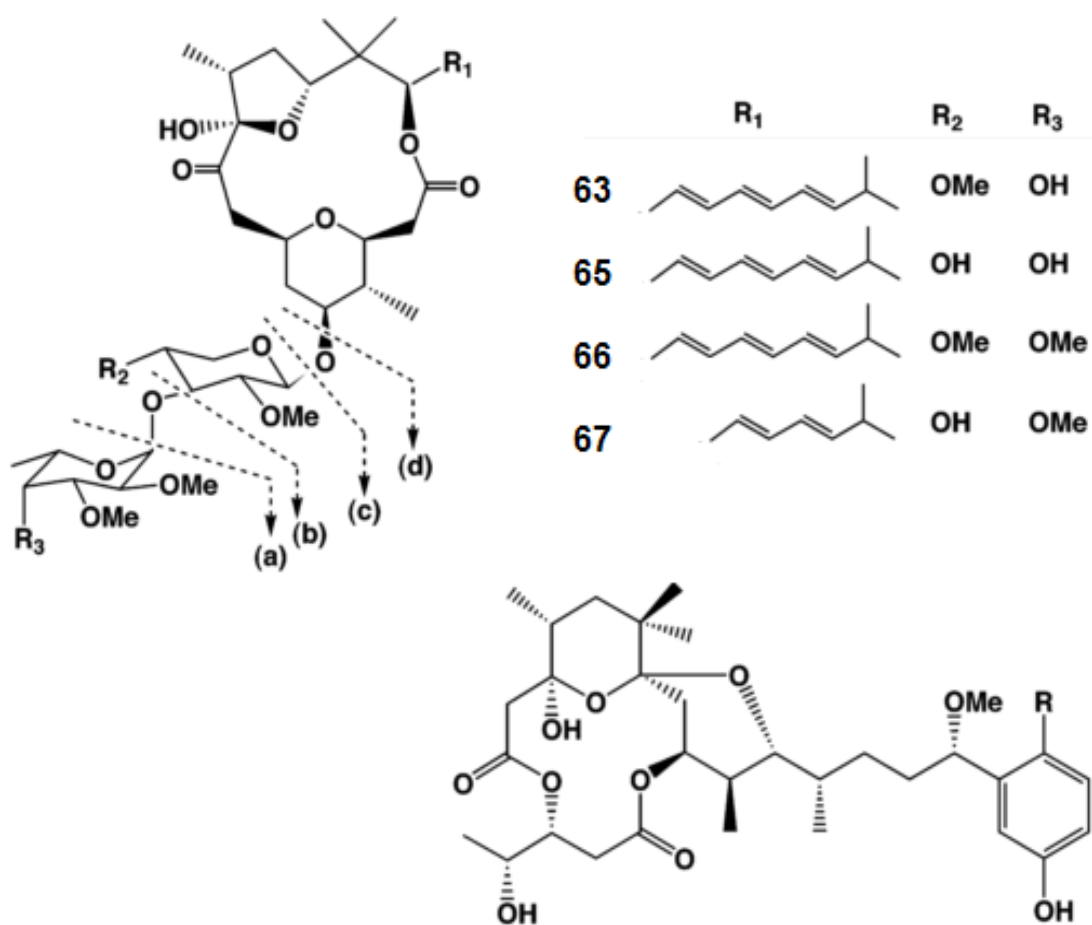


50 $R = CHO$, $2R$

El estudio ficoquímico del alga *G. asiática* reportó los compuestos: gracilariosida (**60**) y dos gracilamidias (**61-62**), con cadenas alquílicas que contienen ciclopropanos inusuales. Las estructuras se determinaron por métodos espectroscópicos y degradación química a microescala. No se tienen registros de reporte alguno sobre ceramidas con un anillo de ciclopropano en organismos marinos. Se evaluaron las citotoxicidades de estos tres compuestos contra la línea celular de melanoma A375-S2 utilizando el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)- 2,5- difeniltetrazolio). El compuesto gracilariosida mostró citotoxicidad inducida moderada y 18,2 % de muerte celular a 20,0 g/mL. Los otros dos compuestos mostraron una citotoxicidad débil 11,7 % y muerte celular a 30,0 mg/mL.³²



Del alga roja *Gracilaria edulis*, (o también llamada *Polycavernosa tsudai*) se aislaron y caracterizaron metabolitos tóxicos del tipo macrólidos glicosidados (**63-67**), de la muestra recolectada en Guam, Japón.³³ Se determinó el LD₉₉ en ratones de los compuestos **63** y **64** estimándose a 200-400 µg/kg para cada uno.³⁴

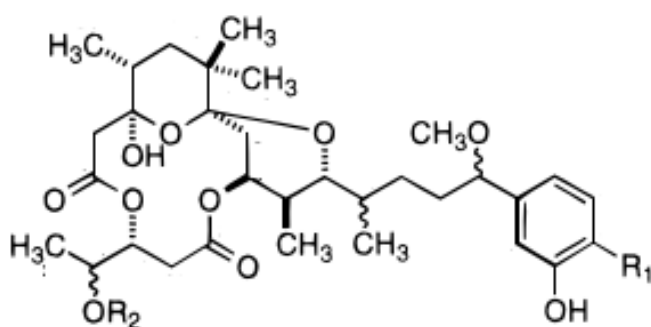


64

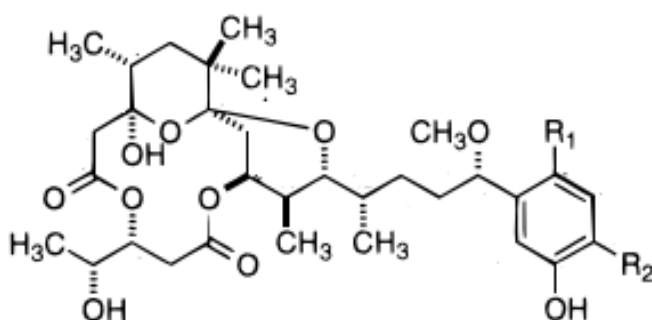
R=Br aplysiatoxina (APTX)

R=H debromoaplysiatoxina (deBrAPTX)

Los manaealidos A y C (**68-69**), compuestos relacionados con el debromoaplysiatoxin (**72**), se aislaron y caracterizaron a partir del alga roja *Gracilaria coronopifolia*. Los compuestos **68** y **70** son las toxinas sospechosas causantes de casos en intoxicación alimentaria ocurridos en Hawai desde 1994, incluyendo casos fatales. Los manaealidos A (**68**) y C (**69**) son nuevos macrólidos, mientras que manaealido B (**70**) es un producto semisintético conocido de (**71**).³⁵

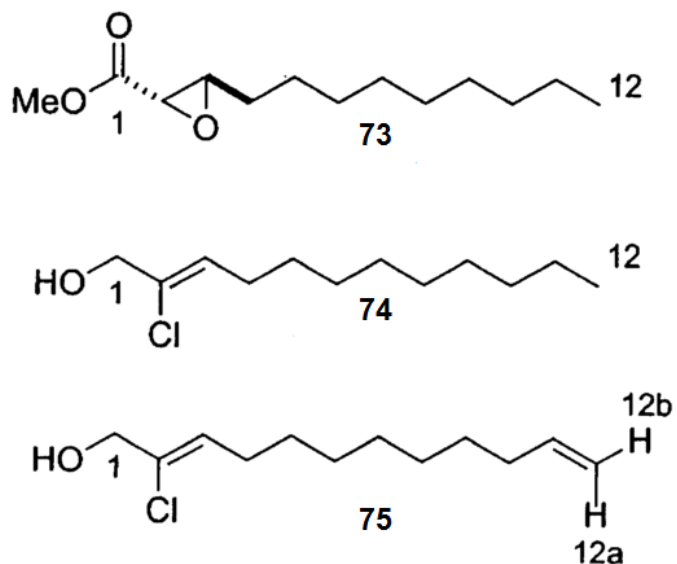


68 R₁ = Cl R₂ = H
69 R₁ = H R₂ = COCH₃



70 R₁ = H R₂ = Br
71 R₁ = Br R₂ = H
72 R₁ = H R₂ = H

Se aislaron tres derivados de ácidos grasos, 2-epoxi-dodecanoato de metilo (**73**), 2-cloro-2-dodecen-1-ol (**74**), y 2-cloro-2,11-dodecadien-1-ol (**75**) del alga roja *Gracilaria verrucosa* colectada en Puerto Elizabeth, Sudáfrica. El extracto metanólico se sometió a una cromatografía en sílice seguida de HPLC en fase normal lo que condujo al aislamiento de mencionados compuestos mientras sus estructuras se determinaron por métodos espectroscópicos.³⁶



2.- JUSTIFICACIÓN

El estudio ficoquímico del alga *Gracilaria blodgettii*, se basa en la importancia biológica y química que tienen los compuestos hallados a partir de productos naturales marinos; en vista de la gran extensión de costas, con una amplia diversidad de especies bentónicas que posee Venezuela, los pocos antecedentes existentes sobre el estudio ficoquímico de algas marinas y con el objeto de contribuir al desarrollo científico de nuestro país, se realizó el mencionado estudio en busca de los metabolitos secundarios del alga *G. blodgettii* como parte del proyecto que se ejecuta en el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales Marinos de la Facultad de Ciencias en conjunto con la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

- ✓ Realizar el estudio fitoquímico del alga roja *Gracilaria blodgettii* (Harvey).

3.2.- Objetivos Específicos

- ✓ Obtener el extracto metanólico del alga *Gracilaria blodgettii* a través de maceraciones sucesivas.
- ✓ Particionar el extracto metanólico con solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetato de etilo.
- ✓ Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los diferentes extractos obtenidos del alga *Gracilaria blodgettii*, mediante técnicas cromatográficas.
- ✓ Elucidar las estructuras moleculares de los metabolitos mayoritarios, empleando técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C), espectrometría de masas (EM) e infrarrojo (IR).

4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1.- Materiales y equipos utilizados

4.1.1.- Soportes cromatográficos

- Para cromatografía de capa fina fase normal, se emplearon placas de sílica gel Alugram® de dimensiones 20 x 20 cm, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄.
- Para cromatografía de capa fina fase reversa, se utilizaron placas RP₁₈ soportadas en aluminio, de longitud 20 x 20 cm.
- En la columna cromatográfica de fase normal, se utilizó sílica gel 60, con las siguientes especificaciones: 0,063-0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM.
- En las separaciones cromatográficas de tipo fase reversa, se utilizaron columnas Sep-Pak® Vac 35 cc y 12 cc C₁₈.
- Con las separaciones por exclusión molecular, se utilizaron como soporte Sephadex™ LH-20 GE Helthcare.

4.1.2.- Solventes y Reactivos

Todos los solventes usados en la realización de este trabajo son de grado técnico, previamente destilados. Sin embargo, el uso de solventes grado analítico (PA) se realizó cuando se consideró necesario en las fases de purificación.

- Hexano (H)
- Diclorometano (D)
- Cloroformo (CHCl₃)
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Metanol (MeOH)
- Acetonitrilo (ACN)
- Agua destilada

- Cloroformo deuterado (CDCl_3) grado PA. Aldrich
- Metanol deuterado (MeOD) grado PA Aldrich
- Agua deuterada (D_2O) grado PA Aldrich
- Revelador de p-anisaldehído en Etanol/ H_2SO_4 . Obedece a una reacción de ataque al grupo carbonilo del aldehído.
- Revelador de timol en Etanol/ H_2SO_4
- Revelador Dragendorff: Nitrato de Bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), ácido tartárico y yoduro de potasio (KI) obedece a la reacción:

$$\text{Alcaloide-NR}_{2(ac)} + \text{Bi}(\text{NO}_3)_{3(ac)} + 4\text{KI}_{(ac)} \rightarrow \text{Alcaloide-NIR}_{2(ac)} + (\text{BiI}_4)\text{K}_{(s)}^{\text{anaranjado}} + 3\text{KNO}_{3(ac)}$$
- Revelador de Yodo (I_2)

El proceso de revelado consiste en rociar el reactivo sobre la placa ya desarrollada; para el p-anisaldehído calentar y observar la coloración producto de la reacción, mientras que el reactivo de dragendorff se observa la coloración inmediatamente y con yodo se impregna la placa en una cámara de revelado.

4.1.3.- Equipos Utilizados

- En la realización de este trabajo se usaron los rotaevaporadores marca BÜCHI R-111 con un baño de agua BÜCHI 461 y un BÜCHI RE-121 con baño de aceite BÜCHI 471 adaptado con agua.
- Se aplicó succión con la bomba precisión 25 l/m (0.88 CFM) 0.1 Micronn modelo D25
- Se utilizó la lámpara de UV-Vis marca MINERALIGHT® LAMP, Modelo UVSL-58, con dos longitudes de onda disponibles: 254 y 366 nm.
- Equipo Espectrofotómetro de Infrarrojo medio (FT-IR) Nicolet, modelo 380, operado en modo de transformada de Fourier, con un intervalo espectral de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ y una resolución de 4 cm^{-1} . Ubicado en la Escuela de Química

- Equipo CG-EM, Cromatógrafo de gases Thermo Trace Ultra con una columna DB-5 acoplado a un Espectrómetro de masas de la misma marca modelo DSQ II (Ubicado en las instalaciones de PDVSA INTEVEP)
- Equipo CG-EM, Cromatógrafo de gases Agilent 6890N, equipado con una columna DB-5 acoplado a un Espectrómetro de masas de la misma marca system 5975 Inert. (Ubicado en la Facultad de Ciencias-ICT)
- Equipo CG-FID, Cromatógrafo de gases Agilent 4890D, con una columna HP-5 acoplado detector de FID de la misma marca. (Ubicado en el IPC sede caracas)
- Equipo de resonancia magnética nuclear BRUKER, modelo AM500, de 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C (Ubicado en el IVIC).
- Equipo de resonancia magnética nuclear JEOL, modelo Eclipse, de 270 MHz para ^1H y 67.5 MHz para ^{13}C (Ubicado en la Facultad de Farmacia UCV).

4.2.- Recolección del material algal

El alga roja *Gracilaria blodgettii* se colectó en febrero del 2014, en la Bahía de Buche, Estado Miranda, de manera manual a 5 metros de profundidad aproximadamente (Figura. 10). Fue conservada en cavas con hielo hasta la refrigeración en el laboratorio. La identificación del espécimen fue realizada por la Dra. Beatriz Vera, Taxónomo del Instituto de Biología Experimental en el Centro de Botánica Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

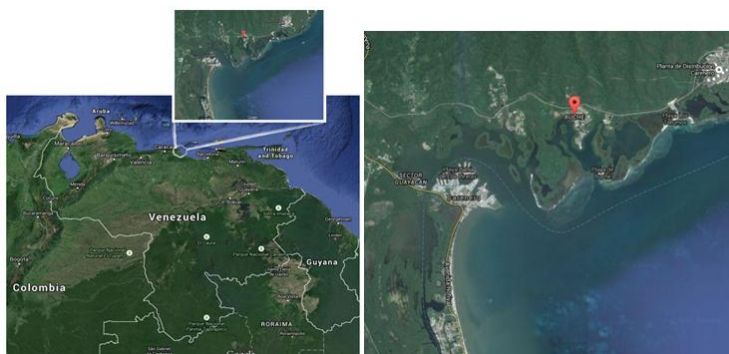


Figura 10: Zona recolección de la muestra de *Gracilaria blodgettii*.

Una muestra de la misma se encuentra depositada en Herbario Nacional, en el Jardín Botánico de Caracas bajo la cota Q-4.

4.3.- Estudio Ficoquímico

La muestra se dejó secar a temperatura ambiente por 5 días, seguidamente se realizó la limpieza manual con un cepillo de cerdas suaves eliminando arena y otros residuos, para seguir el protocolo expresado en el Figura 11.

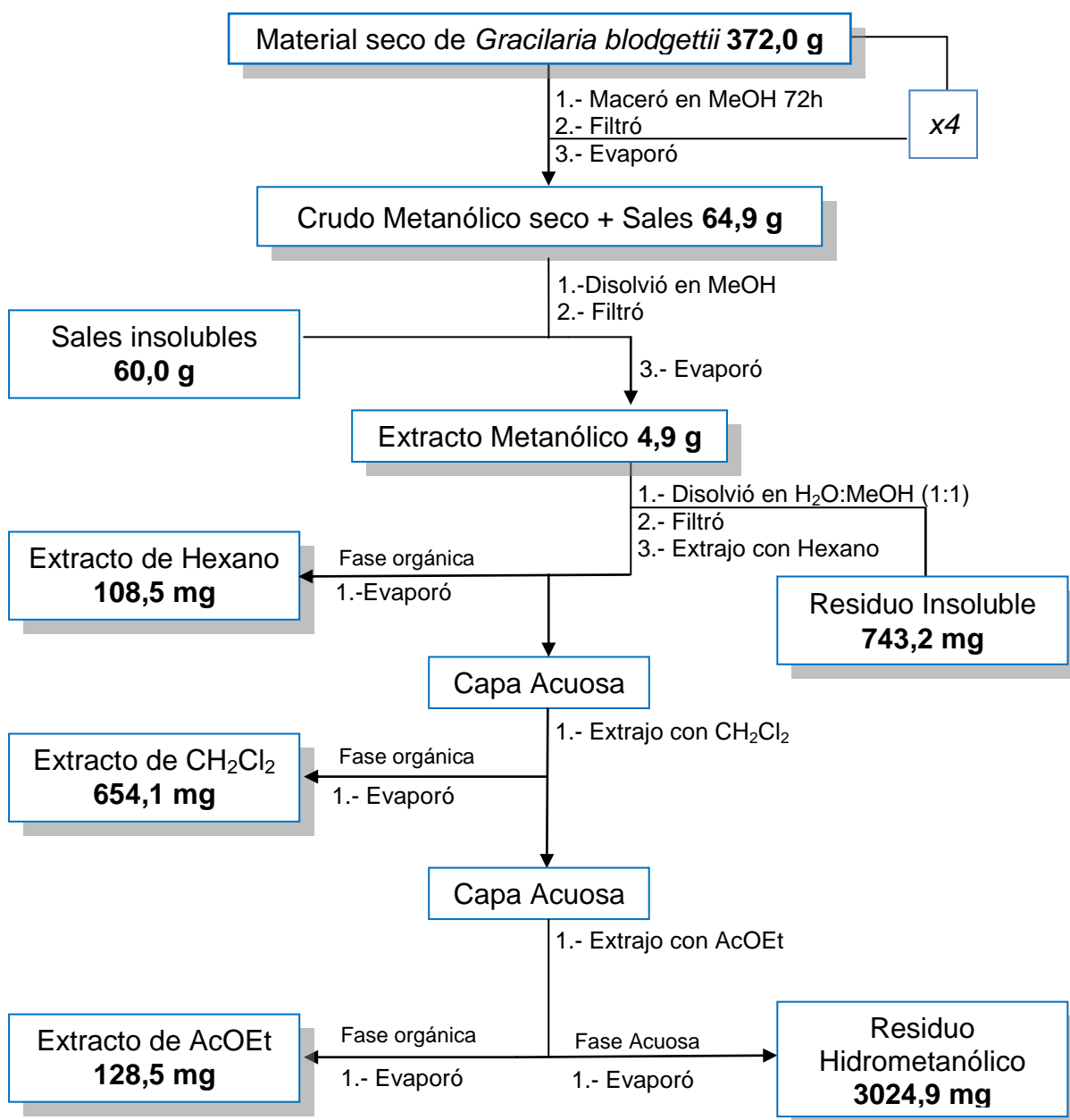


Figura 11. Protocolo de separación de los metabolitos según polaridad

La masa del material seco fue de 372,0 g, el cual se pulverizó y maceró en 1 L de metanol por 72 h, se decantó y filtro el material algal, la solución remanente fue destilada a presión reducida en condiciones de presión de 25 mmHg y una temperatura no mayor a 45 °C, este proceso se repitió 4 veces para obtener un crudo metanólico color verde intenso, con una masa de 64,9 g. Se agregó la mínima cantidad de MeOH al crudo, observando sales inorgánicas, estas fueron separadas empleando filtración por succión, lavando con MeOH frio para obtener así un extracto metanólico de 4,9 g.

El extracto sin sales, fue redissuelto en 300 mL de una solución 1:1 MeOH:H₂O, filtrando el residuo insoluble y obteniendo así la solución hidrometanólica de la cual se realizaron extracciones sucesivas con 300 mL hexano, 300 mL diclorometano y 300 mL acetato de etilo, los extractos fueron secados con sulfato de sodio anhidro (NaSO₄) y evaporados al igual que la solución acuosa a presión reducida, obteniendo el rendimiento de masas expresado en la tabla 1 en relación al material seco.

Tabla 1. Masas de los extractos obtenidos de *Gracilaria blodgettii*.

Extractos	Masa±0,3 (mg)	Rendimiento (%)
Hexano	108,5	0,03
Diclorometano	654,1	0,2
Acetato de Etilo	128,5	0,03
Hidrometanólico	3024,9	0,8
Residuo insoluble 1:1 MeOH:H ₂ O	743,2	0,2
Masa total	4659,2	1,3
Sales	60,0 g	16,1
Crudo Metanólico	64,9 g	17,4
Material Seco	372,0 g	---

Para el tratamiento de los extractos se considera el fraccionamiento mediante métodos cromatográficos comenzando por:

4.3.1.- Fraccionamiento del Residuo Insoluble en MeOH:H₂O (1:1)

Al redissolver el extracto metanólico en la mezcla MeOH:H₂O (1:1) precipitó un sólido verde con aspecto brillante y fino, el cual se filtró por gravedad obteniendo 743,2 mg del mismo. El sólido anterior se solubilizó con hexano y a su vez el residuo insoluble con metanol, obteniéndose un sólido verde oscuro para los lavados con hexano y un sólido verde claro para el residuo soluble con MeOH. Al monitorear por cromatografía en capa fina (CCF) y comparar los lavados, se evidenció la presencia de diversas clorofilas, debido a la fluorescencia roja observada bajo la lámpara con longitud de onda 366 nm y la intensa coloración verde en el visible. Los compuestos monitoreados con el revelador p-anisaldehído estaban en mayor proporción en los lavados de hexano, mientras que en los lavados con metanol no se evidenciaba la presencia de otros compuestos diferentes, sólo de clorofilas. En la Figura 12, se muestra de forma detallada como se realizaron los procesos de lavado.

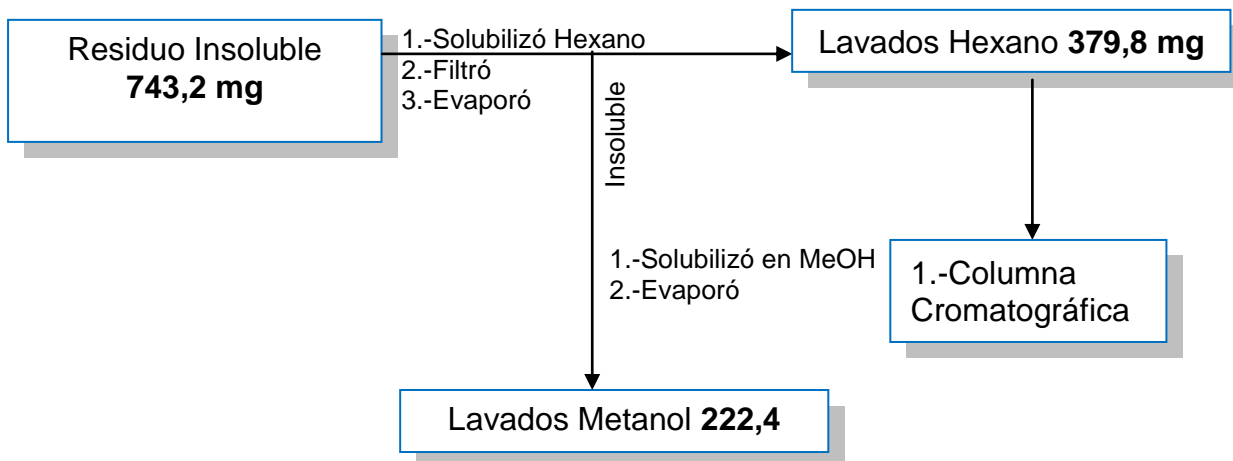


Figura 12. Protocolo de lavados residuo insoluble en mezcla hidrometanólica.

Con 379,2 mg se estableció la separación mediante una columna cromatográfica, donde se pre-adsorbió la muestra con sílica-gel y la misma se colocó en una columna empacada con 17,0 g de sílica. El desarrollo de polaridad es el expresado en la tabla 2, apreciando también las fracciones y sub fracciones que

fueron unidas bajo el criterio de factores de retención, mediante cromatografía en capa fina (CFF).

Tabla 2. Fracciones obtenidas de la CC en fase normal del Residuo soluble en Hexano

Sistema de Solventes	Volumen de Fase Móvil \pm 1 (mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas \pm 0,3 (mg)
1:1 Hex:CH₂Cl₂	160	1-51	GbR1	11,3
8:2 CH₂Cl₂:Hex	40	51-58	GbR2	8,2
9:1CH₂Cl₂:AcOEt	80	59-69	GbR3	121,6
		70-84	GbR4	22,8
7:3 CH₂Cl₂:AcOEt	40	85-98	GbR5	48,8
1:1 CH₂Cl₂:AcOEt	42	99-114	GbR6	61,6
7:3 AcOEt:CH₂Cl₂	30	115-124	GbR7	46,6
1 AcOEt	20	125-132	GbR8	15,7
9:1 AcOEt:MeOH	20	133-139	GbR9	15,7
7:3 AcOEt:MeOH	55	140	GbR10	10

La fracción GbR5 (48,8 mg) fue cristalizada en una mezcla diclorometano-metanol a baja temperatura (9°C), ocurriendo la formación de cristales en forma de agujas, estos representan el 12,9% de masa del residuo insoluble y un 0,01% en relación al material algal seco. El compuesto anterior, reveló morado oscuro con p-anisaldehído, siendo soluble en CDCl₃, nombrando así al compuesto I.

4.3.2.- Fraccionamiento del Extracto de Hexano

Se determinó mediante cromatografía en capa fina (CCF) la presencia de un compuesto mayoritario, el cual reveló color azul índigo con p-anisaldehído. Con este análisis pre-eliminar se propuso la purificación mediante una columna cromatográfica. Para el empacado de la columna se emplearon 12,2 g de sílica-gel con hexano, sembrando 90 mg de extracto disuelto en el mismo solvente.

Se eluyó la columna utilizando un gradiente de polaridad ascendente; en un sistema de mezcla de solventes con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, en distintas proporciones. Se colectaron 203 fracciones y se unieron de acuerdo a la comparación de los factores de retención observados en la cromatografía de capa fina. En la tabla 3, se muestran las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográfico para el extracto de hexano y las masas de las fracciones unidas. Destacando la fracción GbHE donde se encuentra el compuesto mayoritario.

Tabla 3. Fracciones obtenidas de la CC en fase normal del extracto de Hexano

Sistema de Solventes	Volumen de Fase Móvil \pm 1 (mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas \pm 0,3 (mg)
		1-3	GbHA	0,8
		4	GbHB	4,1
		5	GbHC	1,7
8:2 Hex:AcOEt	100	6	GbHD	5,6
		7	GbHE	13
		8-10	GbHF	17
		11-15	GbHG	6,1
		16-24	GbHH	2,3
7:3 Hex:AcOEt	100	25-29	GbHI	0,8
		30-45	GbHJ	3,6
		46-50	GbHK	1,2
		51-53	GbHL	1,6
6:4 Hex:AcOEt	100	54-58	GbHM	1,4
		59	GbHN	--
		60-71	GbHO	0,9
6:4 AcOEt:Hex	100	72-86	GbHP	1,8
7:3 AcOEt:Hex	100	87-109	GbHQ	2,1
8:2 AcOEt:Hex	100	110-134	GbHR	0,4
9:1 AcOEt:Hex	100	135-146	GbHS	1,3
		147-148	GbHT	1,1
1 AcOEt	130	149-163	GbHU	0,7
		164-167	GbHV	0,1
		168-170	GbHW	0,9
9:1 AcOEt:MeOH	200	171-174	GbHX	1,2
		175-203		

La fracción GbHE (13 mg) representa un 14,4% de rendimiento de materia en cuanto al extracto de hexano y un 0,003% del material seco total, obteniendo así el compuesto **II** a caracterizar. Esta fracción fue disuelta en cloroformo deuterado y se analizó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear y cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas. El resto de las fracciones representan una cantidad de materia muy pequeña para purificar o para ser analizados por los métodos espectroscópicos disponibles actualmente.

4.3.3.- Fraccionamiento del Extracto de Diclorometano

El análisis por CCF del extracto de CH_2Cl_2 permitió pre visualizar la presencia de una diversa cantidad de manchas solapables y con colas, es por esto que se planteó una separación principal mediante una columna cromatográfica. Se sembraron 622,0 mg de muestra preadsorbida sobre sílica gel, para la cual se utilizaron 35,00 g de soporte fase normal, donde el incremento de polaridad se realizó de forma paulatina, como se representa en la tabla 4, separando en fracciones de las cuales destacan varias por su perfil cromatográfico en CCF, donde se detalló al menos un compuesto y la cantidad obtenida permite a su vez una propuesta de purificación.

Tabla 4. Fracciones obtenidas de la CC en fase normal del Extracto de CH₂Cl₂

Sistema de Solventes	Volumen de Fase Móvil ± 1(mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas ± 0,3 (mg)
CH₂Cl₂	100	1-10	GbDA	0,4
		11-16	GbDB	4,2
		17-20	GbDC	1,3
		20-23	GbDD	0,2
		24-25	GbDE	0,3
9:1 CH₂Cl₂:AcOEt	100	26	GbDF	3,8
		27-29	GbDG	6,5
		30	GbDH	4,4
		31-32	GbDI	12,0
		33-36	GbDJ	14,2
8:2 CH₂Cl₂:AcOEt	100	37-41	GbDK	10,5
		42-44	GbDL	6,9
		45-49	GbDM	24,3
7:3 CH₂Cl₂:AcOEt	200	50-53	GbDN	10,8
		54-59	GbDÑ	15,4
		60-73	GbDO	35,9
		74-84	GbDP	15,6
6:4 CH₂Cl₂:AcOEt	200	85-90	GbDQ	13,1
		91-110	GbDR	28,4
1:1 CH₂Cl₂:AcOEt	100	111-125	GbDS	20,2
6:4 AcOEt:CH₂Cl₂	200			
7:3 AcOEt:CH₂Cl₂	200	126-196	GbDT	61,1
8:2 AcOEt:CH₂Cl₂	100			
9:1 AcOEt:CH₂Cl₂	200	197-216	GbDU	8,3
		217-233	GbDV	7,8
1 AcOEt	200	234-263	GbDW	14,8
9:1 AcOEt:MeOH	100	264-280	GbDX	7,3
7:3 AcOEt:MeOH	500	281-301	GbDY	50,4

	302-304	GbDZ	9,1
	305-357	GbDA'	173,3

En el Figura 13 se aprecia la distribución y protocolos realizados sobre las fracciones obtenidas a partir del extracto de cloruro de metileno.

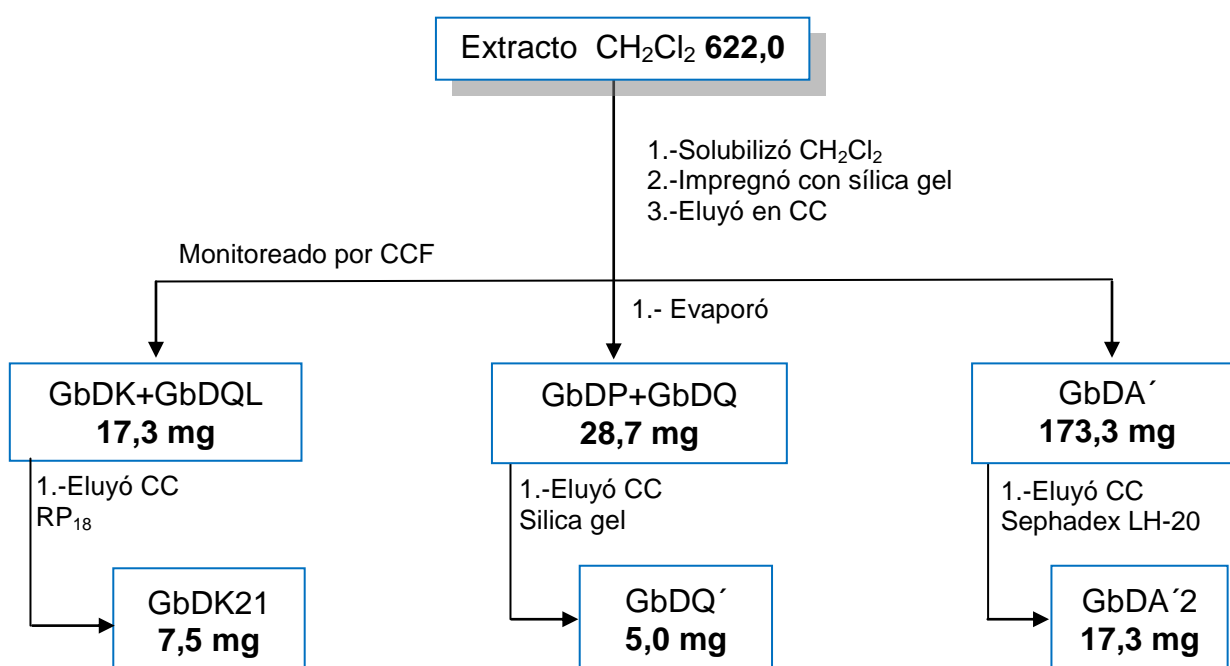


Figura 13. Protocolo de separación y purificación de metabolitos presentes en el extracto de diclorometano.

Luego de la columna de separación y de la obtención de las fracciones, se planteó la purificación y tratamiento de aquellas que presentaron un buen rendimiento de masas como lo son:

4.3.3.1 Fracciones GbDK-GbDL

Las fracciones GbDK y GbDL obtenidas de la columna de sílica gel del extracto de CH₂Cl₂, presentaban el mismo comportamiento en CCF, donde se observaron dos puntos al ser revelados con p-anisaldehído y la lámpara de 254 nm. Un punto presentó mayor R_f en soportes de fase reversa, revelando con una coloración magenta, siendo el compuesto menos polar; el otro punto presentó un R_f inferior, cuya coloración era azulada ante el mismo revelador. Por lo tanto se unieron para sumar una masa de 17,3 mg. Al encontrar el sistema de solventes adecuado, se propuso la separación mediante una columna cromatográfica de fase reversa pre-empacada, donde se separaron las fracciones según el sistema de elución expresado en la tabla 5.

Tabla 5. Fracciones obtenidas de la CC RP₁₈ de la unión las fracciones K y L

Sistema de Solventes	Volumen de Fase Móvil ± 1 (mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas ± 0,3 (mg)
70:35 MeOH:H₂O	20	1-7	GbDK3	3,9
		8-15	GbDK8	2,1
1 MeOH	10	16-21	GbDK21	7,5

De las fracciones separadas GbDK3 (3,9 mg) punto magenta y GbDK21 (7,5 mg) mancha azulada, se pudo caracterizar mediante espectroscopia el compuesto **III**.

4.3.3.4 Fracciones GbDP-GbDQ

El extracto de CH₂Cl₂ fue fraccionado por cromatografía en columna (CC) fase normal, donde se obtuvieron las fracciones P y Q, las cuales se comportaban de manera muy similar al ser analizadas por CCF. Por lo tanto, se consideró unir las obteniéndose una masa de 28,7 mg, destacando la presencia de un punto que

florece azul celeste a 366 nm, el cual al ser revelado con p-anisaldehído es solapado por una cola grisácea. Al encontrarse el sistema de solventes adecuado en CCF, se propuso la separación mediante una columna cromatográfica de fase normal con 4,6 g de sílica, sembrando de forma húmeda y solubilizando la muestra en CH₂Cl₂. Se separó a su vez en fracciones según el sistema de elución expresado en la tabla 6.

Tabla 6. Fracciones obtenidas de la CC de la unión las fracciones P y Q

Sistema de Solventes	Volumen de Fase Móvil ± 1 (mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas ± 0,3 (mg)
4:0,4:0,3 CHCl₃:Hex:MeOH	70	1-10	1-10	5,6
		11-14	11-14	8,4
		15-20	15-20	4,9
		21-46	GbDQ`	6,0
		46-62	46-62	0,2
MeOH	10	63-73	63-73	3,6

Se observó una mancha azul celeste fluorescente a 366 nm, representando el 0,9% del extracto y el 0,002% del material algal seco, denominada como fracción GbDQ` obteniendo así, el compuesto **IV**.

4.3.3.5 Fracción GbDA'

La fracción A' es la última obtenida de la elución en cromatografía en fase normal, por lo tanto se trata de la mayor polaridad posible, esta fue analizada por CCF donde interesó un compuesto que revela con el reactivo de Dragendroff y absorbe bajo la lámpara de 254 nm y dos tipos de manchas que se distribuyen a lo largo de la elución cromatográfica las cuales se distinguen por su coloración bajo la lámpara de 366 nm una azul cielo y otra un tono un poco más verdoso, una ubicada

por debajo del punto de interés y otra por encima, debido a esto se propone una separación por exclusión molecular como se expresa en el esquema de la figura 14.

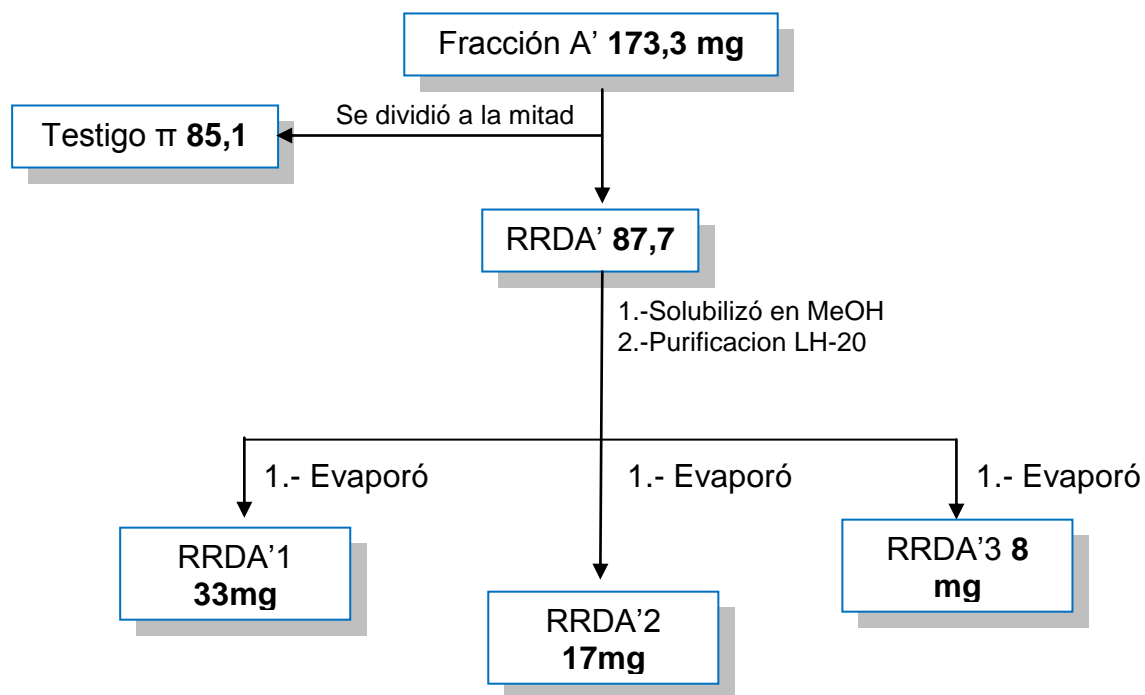


Figura 14. Tratamiento de fracción polar A' del extracto de Diclorometano.

La fracción GbDA'1 se nombró como compuesto **V** al ser una sola mancha en el análisis de CCF que revela con el reactivo de Dragendroff se disolvió en MeOD para los análisis de RMN ^1H y ^{13}C y posteriormente se analizó por EM.

4.3.4.- Fraccionamiento del Extracto Acetato de Etilo

El extracto de acetato de etilo, fue analizado sobre los soportes de fase reversa y fase normal en CCF en búsqueda de una separación óptima, de lo que parecía una banda compleja de purificar. Se procedió a separar mediante una columna de fase reversa RP₁₈, obteniendo distintas fracciones a medida que se disminuía la polaridad como se expresa en la tabla 7.

Tabla 7. Fracciones obtenidas de la CC en fase reversa del Extracto de AcOEt

Sistema de Solventes	Volumen de Fase Móvil ± 1 (mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas ± 0,3 (mg)
1:1 H₂O:MeOH	10	1-5	GbA α	19
		6-8	GbA β	14
7:3 MeOH:H₂O	15	10-23	GbA γ	35
		24-27	GbA δ	10
1 MeOH	25	28-32	GbA θ	10
		33-35	GbA ψ	0,8

Las fracciones se unieron según el criterio de factor de retención por CCF, pero una separación más fina por métodos convencionales no pudo ser determinada, debido a que en los distintos soportes probados y según las masas obtenidas, no se consideró efectivo realizar más procesos de purificación.

4.3.5.- Fraccionamiento del Residuo Hidrometanólico

Del residuo hidrometanólico se tomó una muestra de 565,0 mg siendo el primer paso mostrado en la Figura 15, como parte del protocolo para la purificación de metabolitos, esta se redisolvió con MeOH y se observó la aparición de un precipitado nombrado GbM0, el cual se enfrió y centrifugó, con una masa total de 69,9 mg; al analizarlo por CCF se trata de un compuesto polar que revela blanco con timol y p-anisaldehído, soluble en dimetilsulfóxido y agua considerando así este el compuesto **VI**.

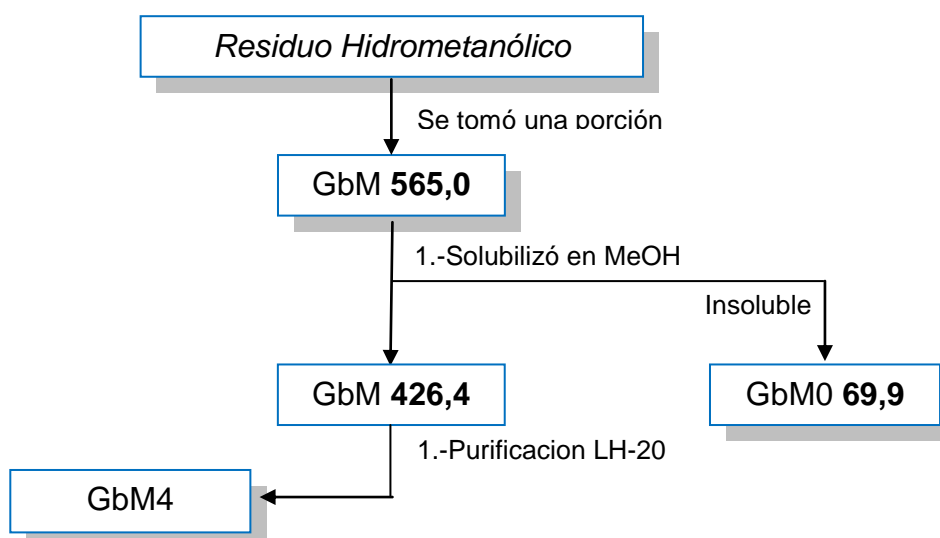


Figura 15. Protocolo para la obtención de metabolitos presentes en el residuo hidrometanólico.

Con el resto soluble en metanol cuya masa fue de 426,4 mg, se utilizó un protocolo de separación basado en una columna de separación por exclusión molecular sephadex LH-20, de la cual se obtuvieron 71 fracciones. Estas se analizaron y reagruparon en 10 fracciones como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Fracciones obtenidas de la CC por exclusión molecular Sephadex LH-20 del residuo hidrometanólico

Fase de elución	Volumen de Fase Móvil \pm 1 (mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas \pm 0,3 (mg)
MeOH	200	1-7	GBM1	5,9
		8-12	GBM2	34,9
		13-20	GBM3	167,4
		21-26	GBM4	104,3
		27-29	GBM5	15,7
		30-32	GBM6	14,8
		33-45	GBM7	53,8
		46-50	GBM8	18,3
		51-61	GBM9	9,6
		62-71	GBM10	1,7

La fracción GbM4 con 104,3 mg se analizó por CCF, observando una mancha que revela color verde con p-anisaldehído. Se disolvió en D₂O para ser analizado espectroscópicamente, nombrando así al compuesto **VII**.

5.- Resultados y Discusiones

La caracterización de los compuestos aislados a partir de una muestra del alga roja *Gracilaria blodgettii*, se llevó a cabo a través de técnicas espectroscópicas como: RMN de ^1H y ^{13}C , DEPT 135, IR y técnica de espectrometría de masas (EM). Los datos espectroscópicos obtenidos fueron comparados con los espectros publicados en la literatura de productos naturales.

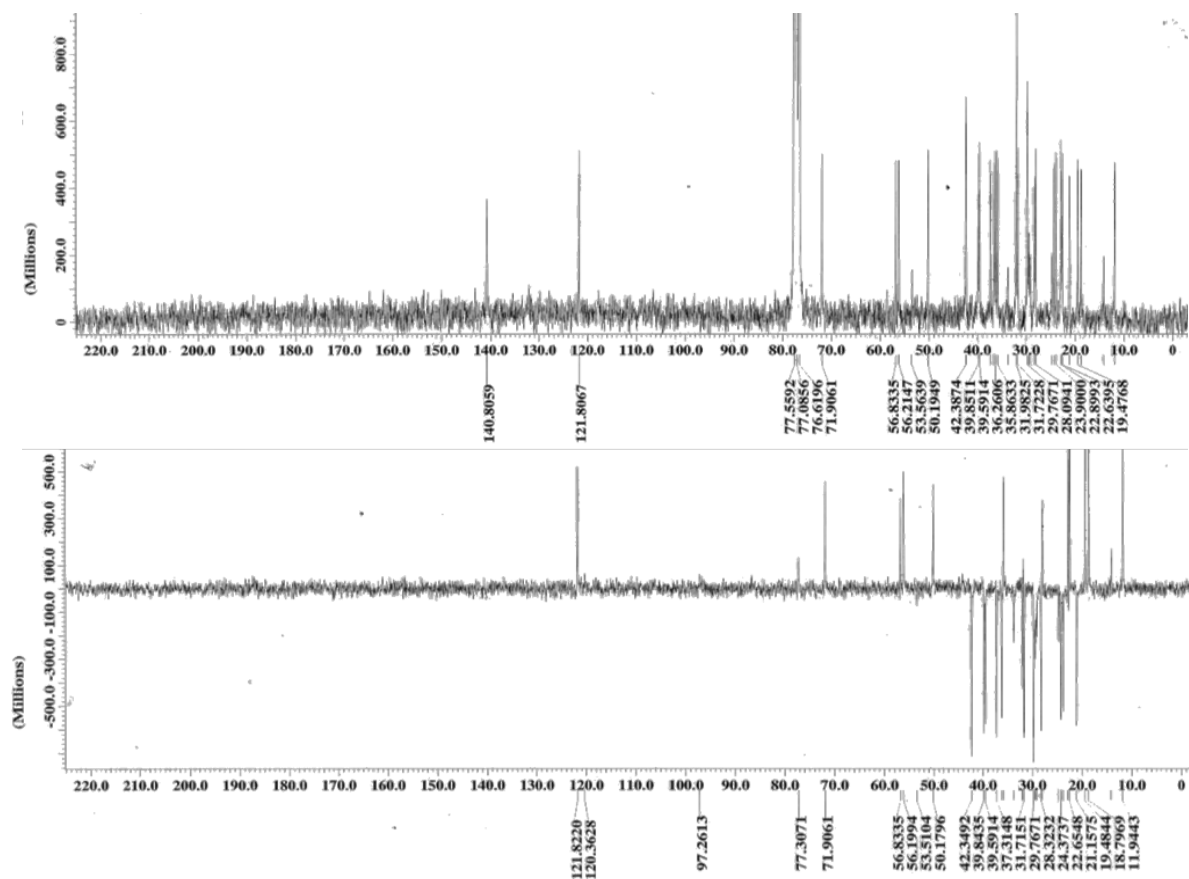
En el estudio sobre el aislamiento de los metabolitos presentes en los diferentes extractos separados de la especie *G. blodgettii*, se obtuvo en el residuo insoluble MeOH:H₂O 1:1 se aisló e identificó un compuesto de tipo esteroidal; del extracto de hexano, se aisló e identificó una mezcla de compuestos del tipo ácido graso insaturados y saturados. Para el extracto de diclorometano, se aislaron e identificaron dos compuestos de tipo ácido graso saturado y un compuesto del tipo alcaloidal. Para el residuo hidro-metanólico, se aisló e identificó un compuesto del tipo polialcohol de cadena abierta y un polisacárido de tipo agarano.

Compuesto I: Colesterol ((3 β)-Colest-5-en-3-ol)

Aislado del residuo insoluble en la mezcla MeOH:H₂O 1:1, donde se separan cierta cantidad de grasas y metabolitos poco polares, se obtuvieron 48,8 mg de un sólido cristalino en forma de agujas, con un punto de fusión 147-148°C, que al ser revelado con p-anisaldehído en los análisis de CCF, se detectó una coloración violeta intensa.

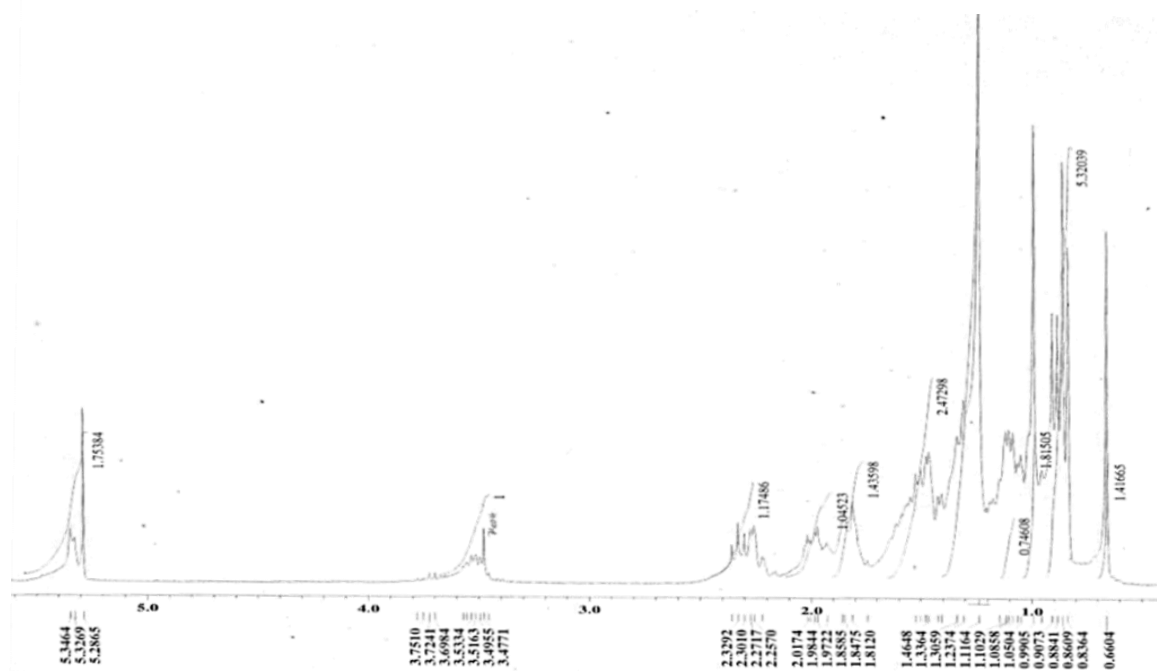
En el análisis del espectro de RMN ^{13}C (espectro 1) tomado en CDCl₃ se aprecian 27 señales, destacando señales correspondientes a dos carbonos desapantallados, desplazados a campo bajo C5: a 140,8 ppm y C6: a 121,8 ppm, infiriendo la presencia de un doble enlace en la molécula, una señal con un

desplazamiento químico de 71,9 ppm corresponde a un carbono unido a un oxígeno en el C3.



Espectro 1. RMN ^{13}C para el Compuesto I tomado en CDCl_3 parte superior, y RMN ^{13}C DEPT 135 en la parte inferior

En el espectro RMN ^1H (espectro 2) se visualizaron dos singletes, que integraron para tres protones cada uno a 0,66 ppm y otro en 0,99 ppm, estas señales corresponden al carbono C18 cuyo desplazamiento químico es a 11,9 ppm y el carbono C19 a 19,5 ppm. Adicionalmente, en el espectro RMN ^1H se observó una señal con multiplicidad de doblete y una constante de acoplamiento J de 6,6 Hz, que integra para seis protones a 0,85 ppm, estas señales se relacionaron al carbono C26 ubicado en 22,6 ppm y al carbono C27 en 22,9 ppm.



Espectro 2. RMN ^1H para el Compuesto I tomado en CDCl_3

De igual modo, se observó un doblete que integró para tres protones con un desplazamiento a 0,90 ppm asignado al carbono C21: a 18,8 ppm. La existencia de un doble enlace en la molécula fue confirmada debido a la presencia de un protón olefínico a 5,32 ppm y ésta se correlacionó con el carbono C6. La presencia en el espectro RMN ^1H de un protón H3 ubicado en la región de los carbonos unidos a oxígenos a 3,51 ppm y el desplazamiento observado del carbono C3: a 71,9 ppm, permitió establecer la existencia del grupo hidroxilo en la molécula. Todas estas asignaciones se encuentran en la tabla 9 para protones y tabla 10 para carbonos, donde se establece su multiplicidad con ayuda del experimento DEPT 135 y se comparan dichos valores con los reportados en la literatura.

Tabla 9: Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el Compuesto I comparado con los desplazamientos para el Colesterol ^a

H	$\delta\text{H}_{\text{exp}}$ [ppm] (int. mult. J[Hz])	δ reportado HMDB³⁷ [ppm]	Asignación
1	1,31, (m)	1,30	-CH ₂
2	1,85, (m)	1,82	-CH ₂
3	3,51, (m)	3,52	-CH-OH
4	2,27, (m)	2,27	-CH ₂
6	5,32, (m)	5,35	-CH=C
7-17	1,40-1,74, (m)	1,52-1,98	-CH ₂ y -CH-
18	0,66, (s)	0,68	-CH ₃
19	0,99, (s)	1,01	-CH ₃
20	1,33, (m)	1,30	-CH-
21	0,90 3H, (d), 6,3	0,91	-CH ₃
22-25	1,11, (m)	1,11	-CH ₂
26-27	0,85 6H, (d), 6,6	0,85	-CH ₃

^a Espectros tomados de CDCl₃

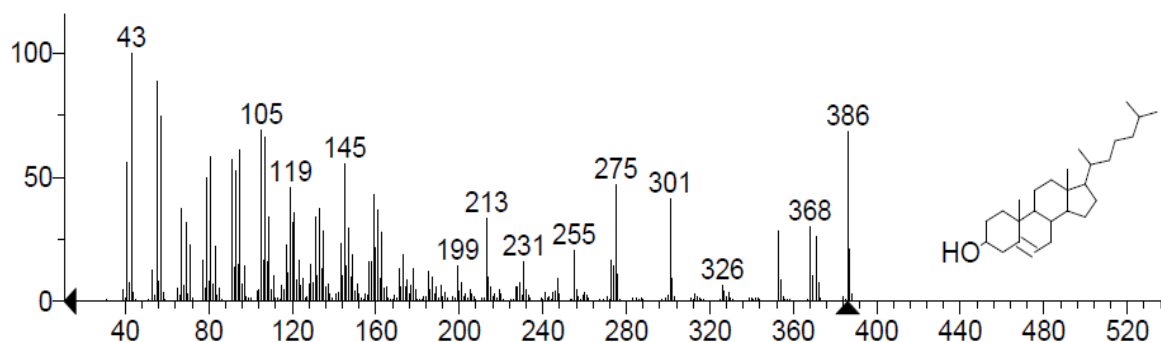
Tabla 10: Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C para el Compuesto I comparado con los desplazamientos para el Colesterol ^a

C	$\delta\text{C}_{\text{exp}}$ [ppm](mult.)	δ reportado HMDB³⁷ [ppm]	Asignación
1	37,3(t)	37,3	-CH ₂
2	31,7(t)	31,7	-CH ₂
3	71,9(d)	71,7	-CH-OH
4	42,4(t)	42,4	-CH ₂
5	140,8(s)	-	-C=C
6	121,8(d)	121,8	-C=C
7	31,9(t)	32,0	-CH ₂
8	31,8(d)	31,7	-CH
9	50,2(d)	50,1	-CH

10	36,6(s)	-	-C-
11	21,2(t)	21,1	-CH ₂
12	39,9(t)	39,7	-CH ₂
13	42,4(s)	-	-C-
14	56,8(d)	56,6	-CH
15	24,4(t)	24,3	-CH ₂
16	28,3(t)	28,3	-CH ₂
17	56,2(d)	56,2	-CH
18	11,9(q)	11,8	-CH ₃
19	19,5(q)	19,5	-CH ₃
20	35,8(d)	35,9	-CH
21	18,8(q)	18,7	-CH ₃
22	36,3(t)	36,2	-CH ₂
23	23,9(t)	23,7	-CH ₂
24	39,6(t)	39,7	-CH ₂
25	28,1(d)	28,0	-CH
26	22,6(q)	22,8	-CH ₃
27	22,9(q)	22,8	-CH ₃

^a Espectro tomado de CDCl₃

El espectro de masas (espectro 3) para este compuesto exhibió un ion molecular con relación masa/carga (m/z) igual a 386 $[M]^+$, según los datos espectroscópicos obtenidos, mediante RMN (^1H y ^{13}C), conjuntamente con la revisión bibliográfica realizada, se estableció que la fórmula molecular es $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$, correspondiendo al colesterol, cuya estructura se muestra en la Figura 16, Este compuesto esteroideal es muy común en las algas rojas³⁸, pudiendo considerarse como un importante marcador quimiotaxonómico para las especies pertenecientes al Phylum Rhodophyta³⁹.



Espectro 3. Espectro de masas del colesterol

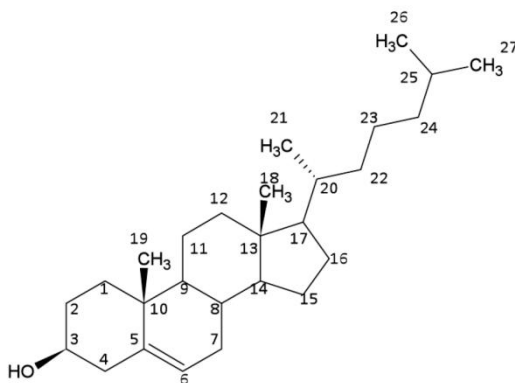


Figura 16. Estructura del Compuesto I: Colesterol

El colesterol tiene un patrón de fragmentación conocido, el cual se muestra en la figura 17. Éste posee su ion molecular con una relación masa/carga (m/z) de 386 (M^+ , $C_{27}H_{46}O$), 371 ($M^+ - CH_3$), 368 ($M^+ - H_2O$, 31%), 353 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), 273 (M^+ -cadena lateral), 255 ($M^+ - \text{cadena lateral} - H_2O$), 231 ($M^+ - \text{cadena lateral} - \text{clivaje de anillo D}$), 229 ($M^+ - \text{cadena lateral} - C16 - C17 - OH$), 213 ($M^+ - \text{cadena lateral} - H_2O - \text{clivaje de anillo D}$). Este patrón demostró un 93% de coincidencia espectral con la librería NIST11 permitiendo identificar inequívocamente al compuesto como colesterol.

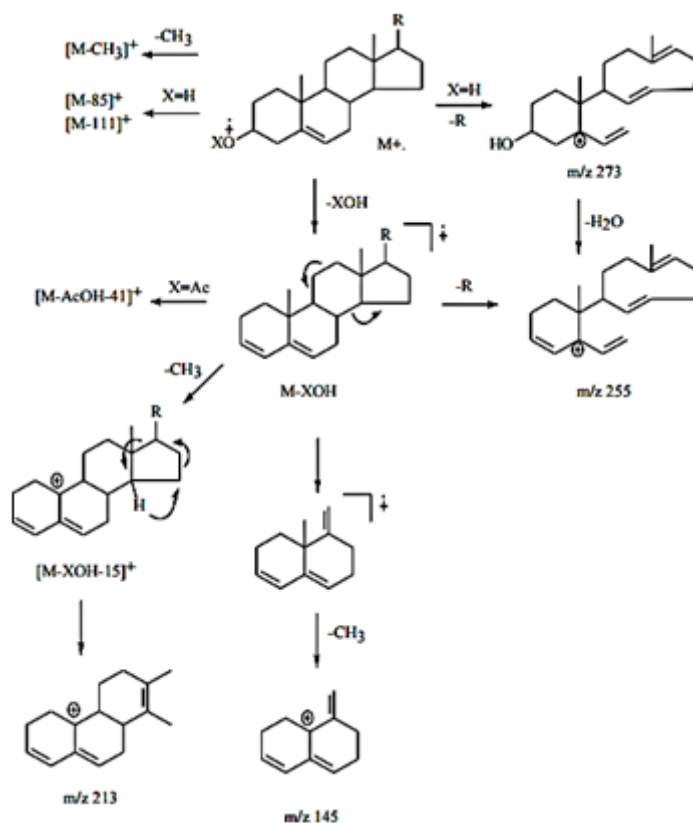


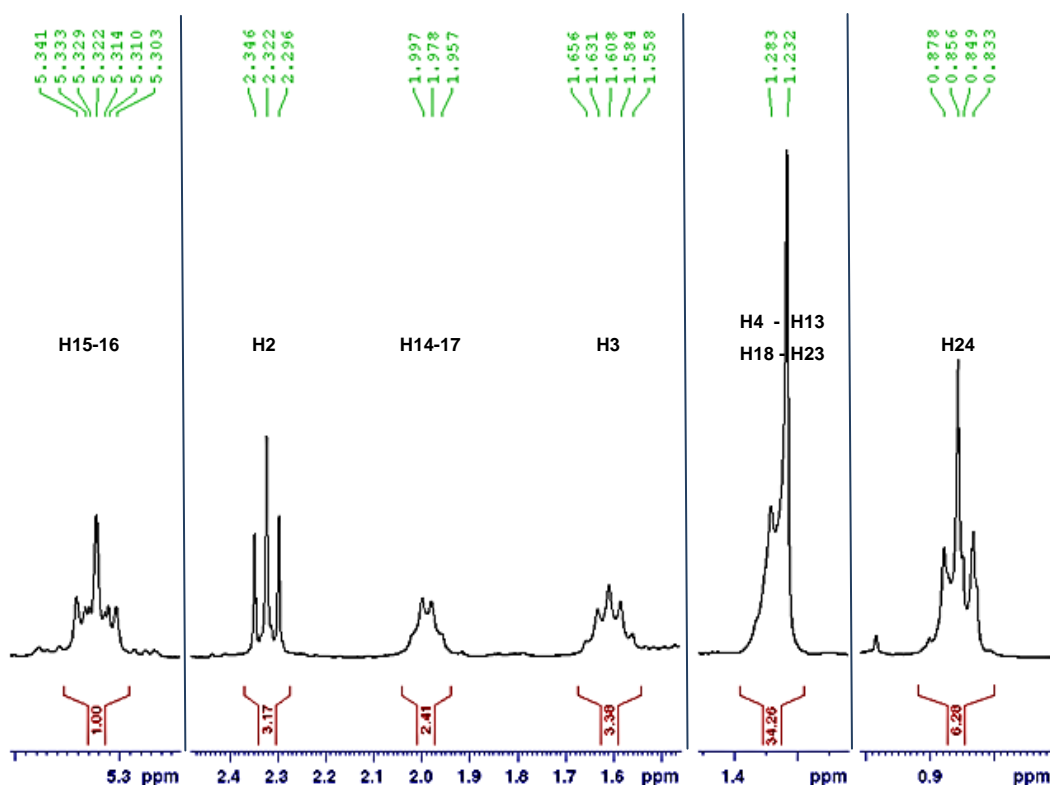
Figura 17. Fragmentos típicos del colesterol por espectrometría de masas

En algún momento se llegó a pensar que el colesterol era un esteroide típico del reino animal. Actualmente, se sabe que el mismo está ampliamente distribuido en ambos ambientes marinos y terrestres, para plantas, algas y animales, donde es biosintetizado a partir del escualeno. Algunas de las enzimas individuales en los pasos tempranos de la biosíntesis del escualeno, han sido aisladas, corroborando la biosíntesis del mismo en otros organismos ajenos al reino animalia.⁴⁰

Compuesto II: Mezcla de Ácidos Grasos: Hexadecanoico C(16:0), Octadecanoico C(18:0), Eicosenoico C(20:1)n-12 [ω 9], Tetraeicosanoico C(24:1)n-6 [ω 9].

Aislado del extracto de hexano, se obtuvo un sólido viscoso cuya masa fue de 13 mg, donde destaca el color azul intenso que se percibe al hacer reaccionar al mismo en CCF con p-anisaldehído como agente revelador.

El análisis espectroscópico para RMN ^1H (espectro 4) permite inferir que se está en la presencia de un ácido graso insaturado ya que a 5,32 ppm se detecta un multiplete correspondiente a protones olefínicos, una señal intensa en la zona alifática alrededor de 1,26 ppm, correspondiente a metilenos en la cadena y en 2,32 ppm se aprecia un triplete, característico de protones vecinos a un grupo acilo. La asignación de estas señales se muestra en la tabla 11.



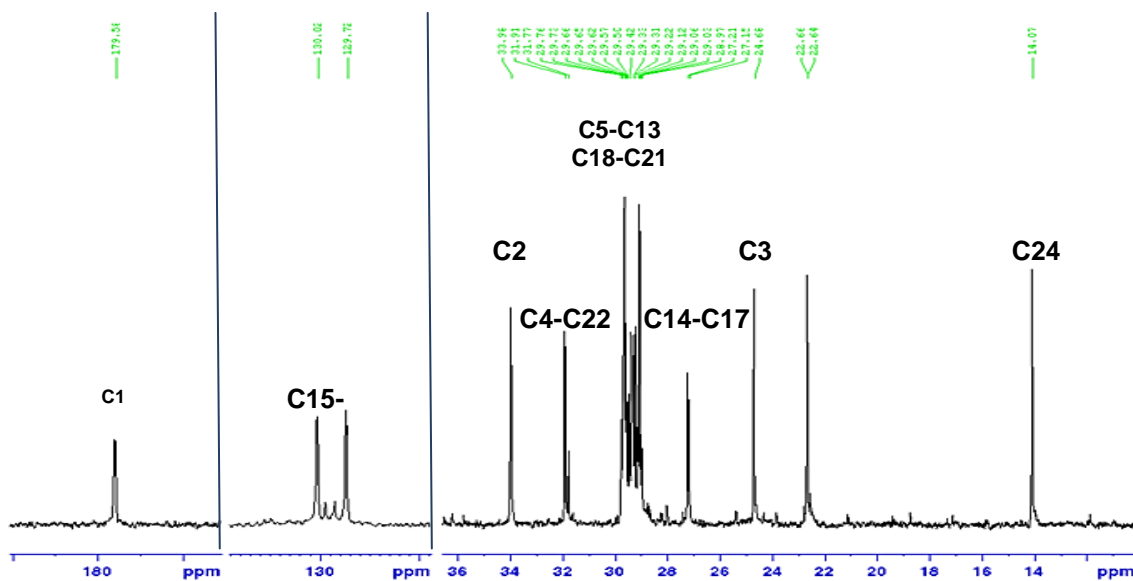
Espectro 4. RMN ^1H del compuesto II

Tabla 11: Desplazamientos químicos de RMN de ^1H del compuesto II comparado con los desplazamientos del ácido cis-15-tetracosenoico (ácido nervónico)^a

H	$\delta\text{H}_{\text{exp}}$ [ppm] (int. mult. J [Hz])	δ reportado HMDB ³⁷ [ppm]	Asignación
2	2,32 2H (t) $J=7,8$	2,35	-CH ₂
3	1,61 2H (m)	1,63	-CH ₂
4-13, 18-23	1,26 32H (m)	1,26	-CH ₂
14-17	1,98 4H $J=5,70$ (dd)	2,01	-CH ₂
15-16	5,32 2H (m)	5,35	-CH
24	0,85 3H (t)	0,88	-CH ₃

^a Espectro tomado de CDCl_3

En el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 5) se logran visualizar 24 señales principales, y con ayuda del experimento DEPT 135, se asignan las multiplicidades de los carbonos, donde en la zona que abarca de 34 a 22 ppm se aprecia una cadena alifática con 20 átomos de carbono metilénico. A campo alto, se aprecian 2 carbonos de una olefina cuyo desplazamiento es de 130 ppm, corroborando la presencia de los protones olefínicos detectados en el espectro de ^1H a 5,35 ppm. A campo bajo, se aprecia un carbono correspondiente a un ácido carboxílico a 180 ppm, cuya señal desaparece en el experimento DEPT 135. Finalmente, la cadena presenta en 14 ppm un grupo metilo que está asociado a la señal de protones correspondiente en 0,85 ppm a campos más altos.



Espectro 5. RMN de ^{13}C del compuesto II ácido nervónico

La comparación de las señales de carbono es de suma importancia, por lo que basándose en la literatura como base de datos para ácidos grasos, así como también en el modelado molecular, se pudo asignar cada una de las señales como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Desplazamientos químicos RMN ^{13}C para el ácido cis-15-tetracosenoico (ácido nervónico)

C	δ_{Cexp} [ppm](mult.)^a	δ reportado HMDB 2D³⁷ [ppm]^a	δ modelado ACD CNMR [ppm]	Asignación
1	179,6(s)	180,1	180,6	-CO
2	34,0 (t)	33,8	34,2	-CH ₂
3	24,6 (t)	24,7	24,8	-CH ₂
4	31,7 (t)	29,5	29,2	-CH ₂
5	29,1 (t)	29,6	29,5	-CH ₂
6	29,0 (t)	29,6	29,8	-CH ₂
7	28,9 (t)	29,6	29,8	-CH ₂
8	29,0 (t)	29,6	29,6	-CH ₂
9	29,2 (t)	29,6	29,6	-CH ₂
10	29,3 (t)	29,6	29,4	-CH ₂
11	29,5 (t)	29,6	29,3	-CH ₂
12	29,6 (t)	29,6	29,2	-CH ₂
13	29,7 (t)	29,5	29,4	-CH ₂
14	27,1 (t)	27,2	29,9	-CH ₂
15	130,0(d)	129,9	129,7	-CH
16	129,7(d)	129,9	129,9	-CH
17	27,2 (t)	27,2	30,0	-CH ₂
18	29,7 (t)	29,5	29,7	-CH ₂
19	29,3 (t)	29,6	29,8	-CH ₂
20	29,4 (t)	29,6	29,8	-CH ₂
21	29,6 (t)	29,6	29,41	-CH ₂
22	31,9 (t)	31,9	31,99	-CH ₂
23	22,6 (t)	22,7	22,57	-CH ₂
24	14,1 (c)	14,1	14,0	-CH ₃

^a Espectros tomados en CDCl₃

Se realizó un análisis cualitativo por cromatografía de gases, comparando los tiempos de retención de la muestra con un patrón certificado de ácido nervónico de la casa Alltech associates, Inc/Applied Science Labs. Donde se pudo constatar la presencia del ácido nervónico, aunque no como compuesto mayoritario en la fracción, sino en conjunto de otros componentes, que son ácidos grasos por las características del espectro de RMN. El mismo posee un tiempo de retención bajo las condiciones cromatográficas de 18,9 min que se muestra en el cromatograma, con las condiciones de elución (figura 18).

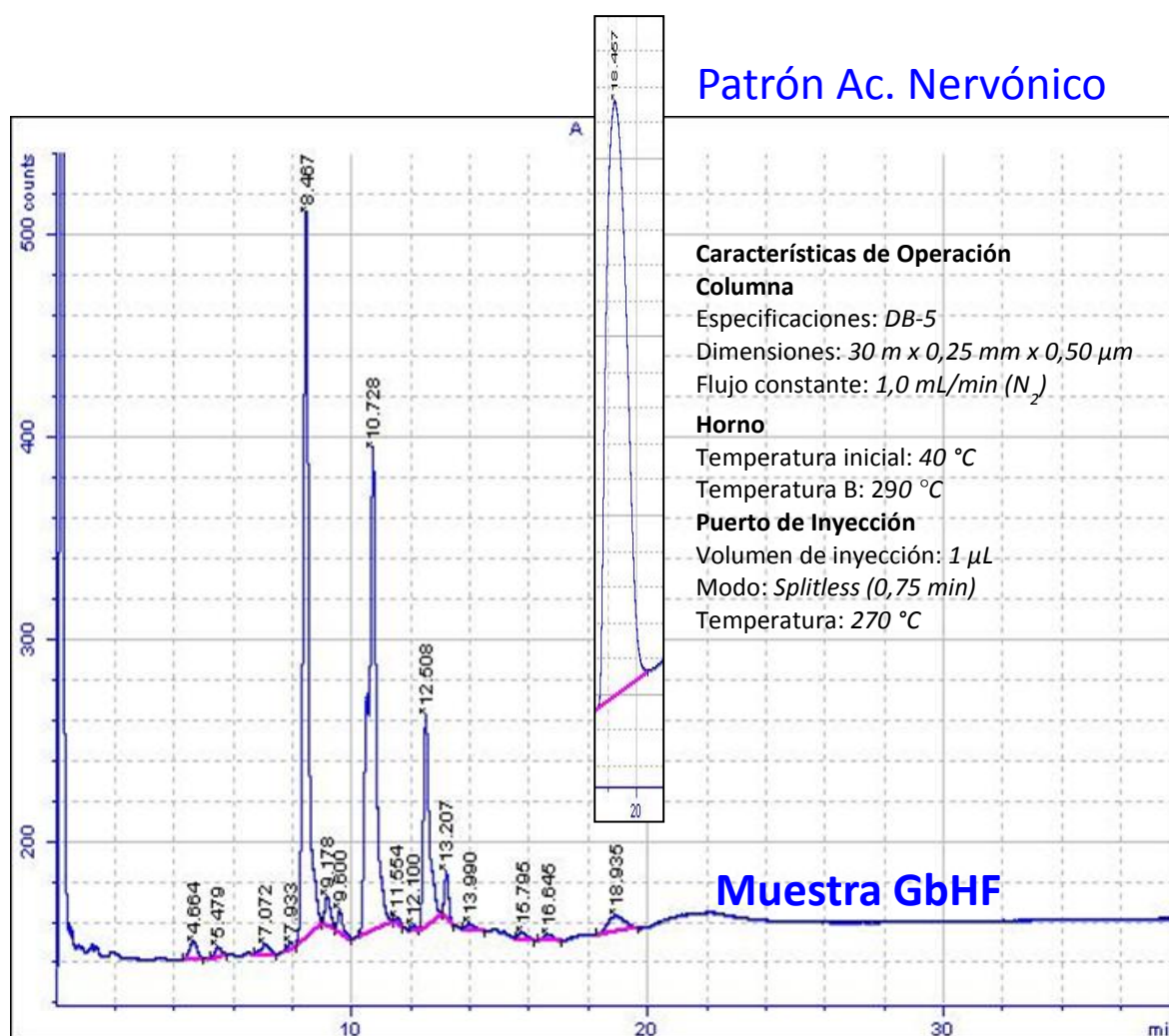
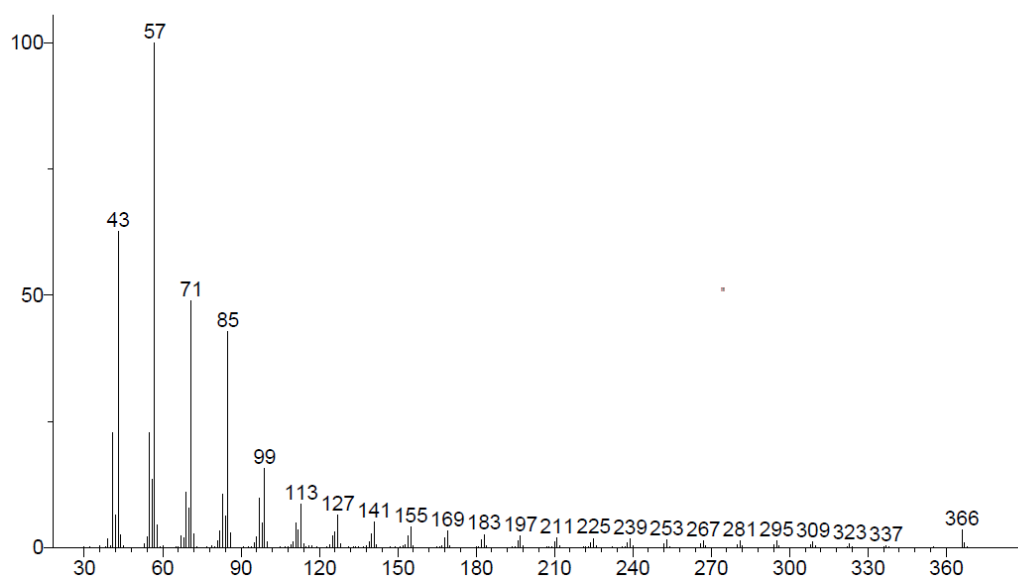


Figura 18. Cromatograma de la muestra RRHE comparado con el patrón de ácido nervónico en la misma escala.

Debido a la intensidad de los otros picos en la muestra, se llevó a cabo la caracterización mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-EM), donde del cromatograma se identificaron varios picos destacando el espectro de masas (espectro 6), en el cual se detectó una relación m/z con $[M]^+$ igual a 366; lo cual indica el peso molecular del compuesto, estableciendo como fórmula molecular $C_{24}H_{46}O_2$ con 2 insaturaciones, pudiendo observar el típico patrón gaussiano de consecutivas pérdidas de 14 unidades de masa, cuando se trata de cadenas alifáticas largas, también se observa la pérdida de $[M-CO_2]$ característico de ácidos carboxílicos; por lo que concatenando con la data espectroscópica se establece que la fracción aislada posee el ácido nervónico mostrado en la figura 19, en conjunto con otros ácidos grasos saturados e insaturados especificados en la tabla 13, que expresaron patrones de fragmentación similares donde sólo varía el ion molecular $[M]^+$, el cual está relacionado con la longitud de la cadena.



Espectro 6. Fragmentograma del Ácido Nervónico

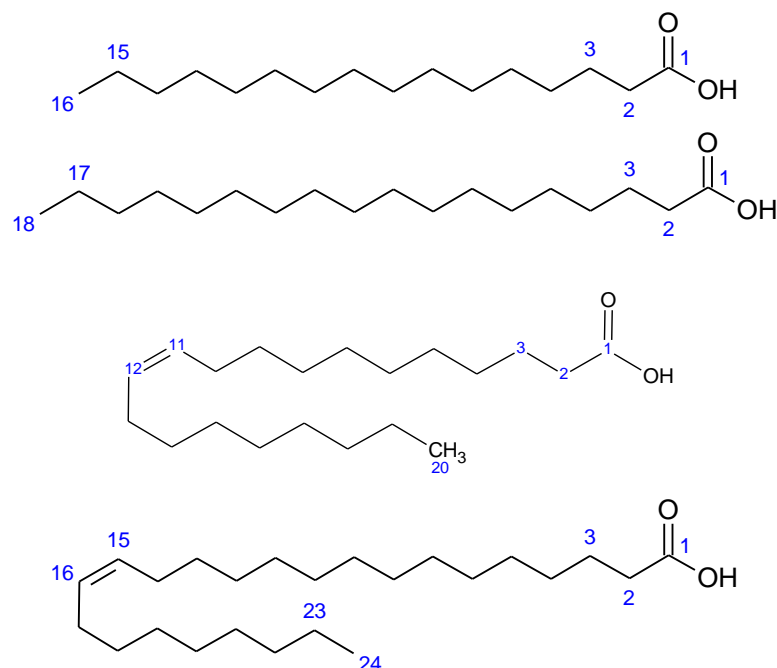


Figura 19. Estructura de los Ácidos Palmítico, Esteárico, Eicosenoico y Nervónico

Tabla 13. Compuestos detectados por el Espectrómetro de masas

Compuestos Detectados EM
Ácido Hexadecanoico - Ac. Palmítico C(16:0)
Ácido Octadecanoico - Ac Esteárico C(18:0)
Ácido (Z)-(12) Eicosenoico C(20:1)n-12 [ω9]
Ácido (Z)-(15) Tetracosenoico C(24:1)n-15 [ω9]

Existen múltiples citas de este tipo de compuesto para las tres divisiones Rhodophyta, Chlorophyta y Phaeophyta, donde se plantea la relación de diversos ácidos grasos saturados e insaturados como marcadores quimiotaxonómicos. Resalta que ácidos con más de 22 átomos de carbonos se presentan en cantidades minoritarias, con respecto a los ácidos de 16 a 20 carbonos. De la clase Floridophyceae a la cual pertenece *G. blodgettii*, se conocen las especies *Odonthalia dentata*⁴¹ y *Laurencia papillosa*, en las cuales se señala la presencia del ácido graso C(24:1)n-15. Del extracto de diclorometano de *L. papillosa* donde se exhibe este

metabolito, se presenta actividad antimicrobiana por halo de inhibición, atribuyéndose esta propiedad a la presencia de diversos ácidos grasos; también se ensayó la captación de radicales libres, por prueba con DPPH, se obtuvo un 77% de captación de radicales libres, comparado con un control de referencia de Silymarin, cuya captación radicalaria es del 92%. Esta actividad fue atribuida al alto contenido de lípidos solubles y de carotenoides.⁴²

Los ácidos grasos insaturados de cadena larga son conocidos como moléculas bioactivas de importancia nutricional y farmacéutica. En la literatura, las Rhodophyta son comúnmente reportadas como buenas productoras de ácidos eicosapentanoicos, lo cual sugiere que las algas rojas pueden llegar a ser la mejor fuente nutritiva de ácidos grasos.⁴³

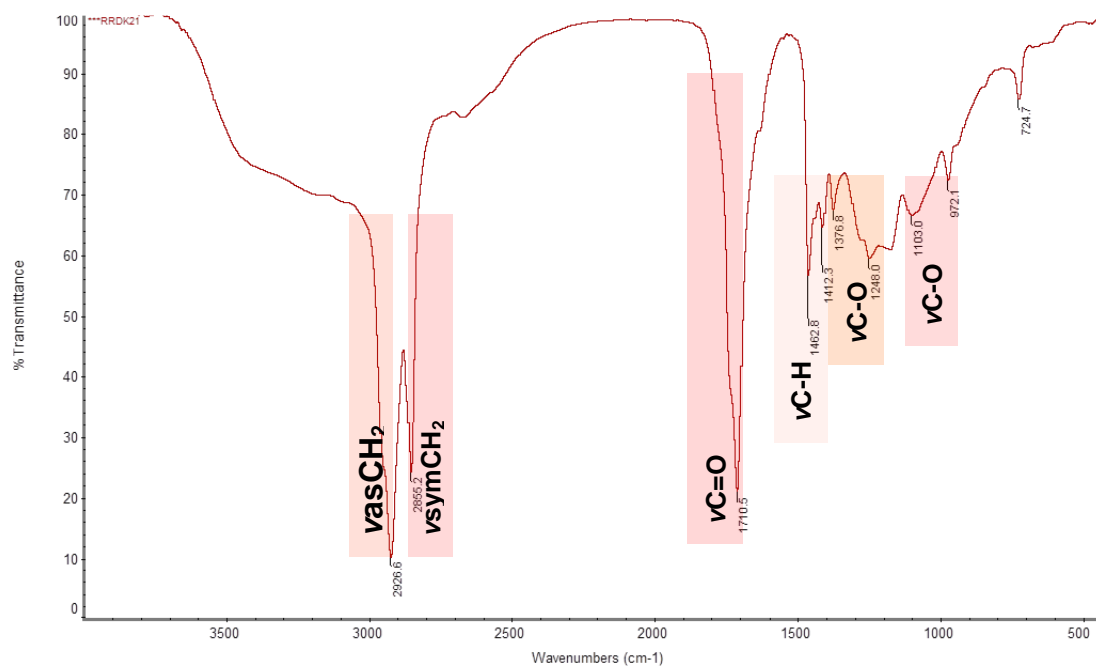
Se conoce que extractos de material algal, enriquecidos con ácido palmítico en conjunto con otros ácidos grasos, pueden estar involucrados en la actividad antiviral en contra del herpes simple 1.⁴⁴ Adicionalmente, Se ha comprobado que este ácido se une al receptor de la célula CD4, bloqueando la infección y la entrada del virus de inmunodeficiencia humana, tipo 1 (VIH-1).⁴⁵ Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento con 100 – 200 mM de ácido palmítico inhibe la infección VIH-1 en el tejido cervical *ex vivo* en modelo de vagina humana por encima del 50%, estos resultados demuestran la utilidad de este ácido como una molécula modelo para el desarrollo preclínico de un seguro y potente microbicida inhibidor de la entrada del VIH-1.⁴⁶

En cuanto al género *Gracilaria* se encuentra citado el ácido (Z)-15-tetracosanoico para las especies *G. chilensis*⁴⁷ y *G. verrucosa*, este metabolito es un nutriente esencial para el mantenimiento de las funciones cerebrales, ya que posee un efecto neuroprotector, ya que es un componente importante en la membrana de las células nerviosas. El ácido nervónico puede regular las funciones de la membrana celular interviniendo en los canales iónicos y en diversos receptores.⁴⁸

Compuesto III: Ácido Mirístico (Ácido tetradecanoico C(14:0))

Compuesto aislado como un sólido viscoso de color ligeramente amarillo, con un punto de fusión 53-55°C, del extracto de CH₂Cl₂, el cual al ser monitoreados por CCF reveló azul grisáceo, este metabolito presentó las mismas características espectroscópicas de un ácido graso saturado de mediana longitud.

Al observar el espectro infra rojo (IR) (espectro 7) se puede apreciar un par de bandas agudas e intensas en 2926,6 y 2855,2 cm⁻¹, la primera asignada a la vibración de los estiramientos asimétricos del enlace C-H de los grupos metilénicos (vasCH₂) y la segunda surge de las vibraciones simétricas del mismo enlace (vsCH₂). En 1710,5 cm⁻¹ se aprecia una banda fina característica de la vibración del enlace del C=O del ácido carboxílico; se detectan en la zona de vibraciones fuera del plano una banda en 1462,8 cm⁻¹, la cual corresponde a las deformaciones vibraciones del tipo tijereteo correspondientes a los grupos CH₂. Otra banda en 1376,8 cm⁻¹ la cual es asignada a la deformación simétrica del enlace C-H. La banda de absorción a 1103 cm⁻¹ se relaciona a las tensiones del enlace C-O. El grupo OH absorbe también a 972,1 cm⁻¹.⁴⁹



Espectro 7 Espectro IR del Compuesto III Acido Mirístico

En la tabla 14 se resumen los valores obtenidos de las bandas mas relevantes seleccionadas del espectro de infrarrojo.

Tabla 14. Longitudes de onda en espectroscopia IR para el Ácido Mirístico

Longitud de onda [cm^{-1}]	Vibración	Asignación
3400* m	st	O-H
2926,6 f	st	C-H sp^3
2855,2 f	st	C-H sp^3
1710,5 f	st	C=O
1462,8 m	δ tijereteo	C-H
1376,8 d	δ sy	C-O
1248,0 d	Curva fuera del plano	C-H
1103,0 d	st	C-O
972,1	Curva fuera del plano	C-H
724,7	Rocking (balanceo)	C-H

Intensidad de la banda: f, fuerte; m, media; d, débil; * agua, Vibración: st, estiramiento o tensión; δ , deformada; sy, simétrica; as, asimétrica

Al analizar el espectro RMN de ^1H (espectro 8) destaca un triplete centrado de 2,32 ppm, característico de los protones vecinos a un ácido carboxílico, una señal de tipo multiplete es situada en 1,60 ppm, la cual es seguida por una señal intensa centrada en 1,26 ppm; en la cual se agrupan los metilenos superpuestos de la cadena y a 0,85 ppm se aprecia una señal terminal que se atribuye al metilo final de la cadena alifática. La asignación de las señales se encuentra expresada en la tabla 15.

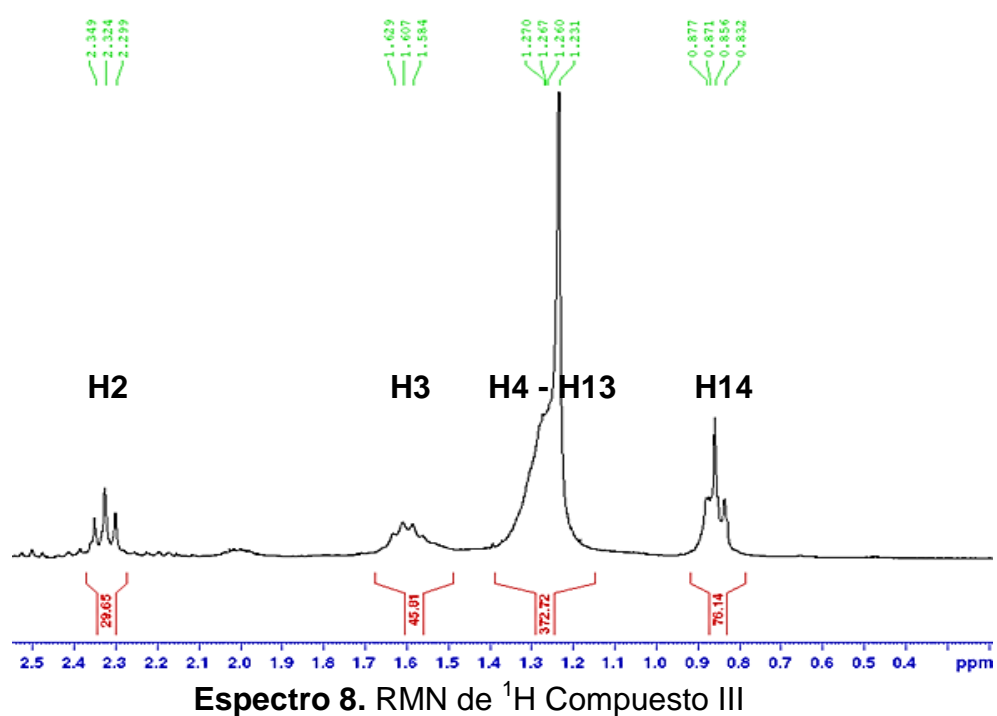
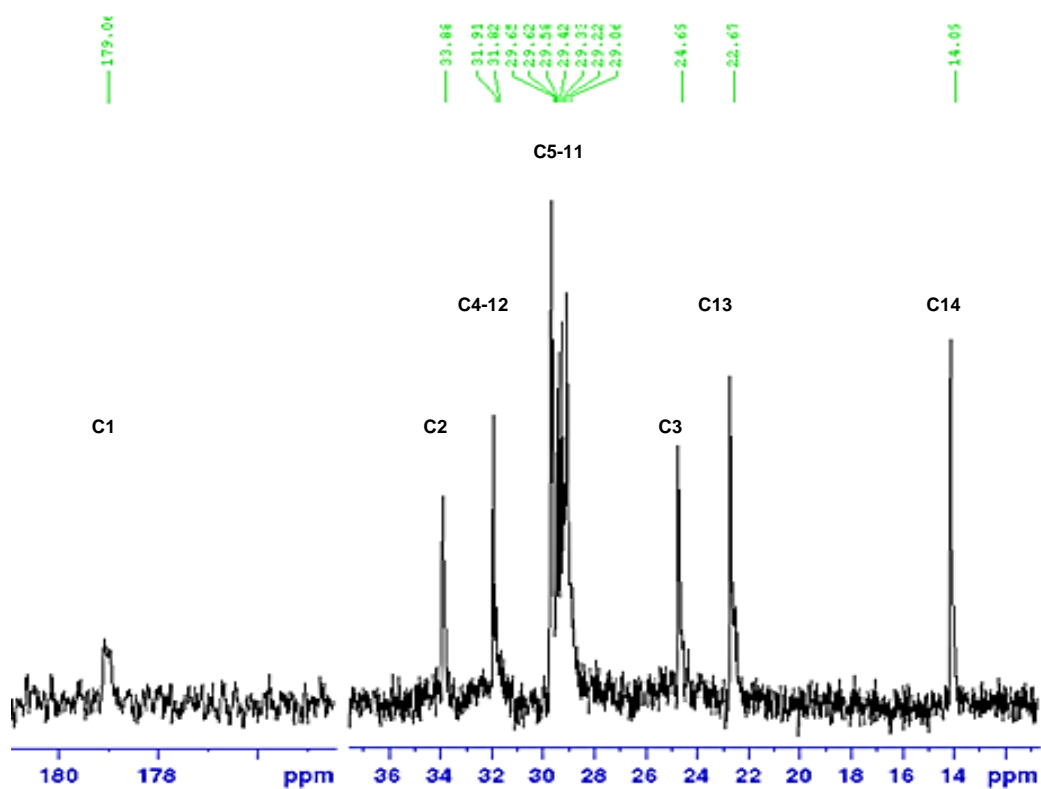


Tabla 15. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el Ácido Mirístico

H	δ_{Hexp} [ppm] (int. mult. J [Hz])	δ reportado HDMB ³⁷ [ppm]	δ modelado ACD CNMR [ppm]	Asignación
2	2,32 2H (t), 7,5	2,35	2,26	-CH ₂ -CO
3	1,60 2H (q)	1,69	1,58	-CH ₂ -CH ₂ -CO
4-13	1,26 H (m)	1,31	1,25	-CH ₂ -
14	0,85 3H (m)	0,89	0,87	-CH ₃

^a Espectro tomado de CDCl₃

En el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 9) se logran visualizar 14 señales principales y con ayuda del experimento DEPT 135, se asignan las multiplicidades de los carbonos, donde en la zona que abarca de 34 a 22 ppm se aprecia una cadena alifática correspondiente a 12 átomos de carbono metilénicos. A campo bajo, se aprecia un carbono correspondiente a un ácido carboxílico a 179 ppm, cuya señal desaparece en el experimento DEPT 135. Finalmente, la cadena presenta en 14,1 ppm un grupo metilo.



Espectro 9. Espectro ^{13}C del compuesto III Ácido Mirístico

La asignación de las señales se llevó a cabo al realizar la comparación teórica que se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C del compuesto III comparado con el ácido mirístico^a

C	$\delta\text{C}_{\text{exp}}$ [ppm](mult.)	δ reportado HDMB ³⁷ [ppm]	δ modelado ACD CNMR [ppm]	Asignación
1	179,1(s)	180,6	180,7	-CO
2	33,9(t)	34,1	34,2	-CH ₂
3	24,7(t)	24,6	24,8	-CH ₂
4	31,8(t)	29,1	29,2	-CH ₂
5	29,7(t)	29,6	29,5	-CH ₂
6	29,6(t)	29,6	29,8	-CH ₂
7	29,6(t)	29,6	29,5	-CH ₂
8	29,4(t)	29,6	29,4	-CH ₂
9	29,3(t)	29,6	29,3	-CH ₂
10	29,2(t)	29,6	29,3	-CH ₂
11	29,1(t)	29,1	29,3	-CH ₂
12	31,9(t)	32,0	31,9	-CH ₂
13	22,7(t)	22,8	22,7	-CH ₂
14	14,1(c)	14,1	14,1	-CH ₃

^a Espectro tomado de CDCl_3

Al detectarse una cadena alifática de 13 átomos de carbono y como grupo funcional un ácido carboxílico se propone como estructura para el compuesto, al ácido graso tetradecanoico C(14:0), conocido comúnmente como ácido mirístico cuya estructura se aprecia en la figura 20, este es un compuesto muy común para las algas de la división Rhodophyta, la cual presenta una amplia riqueza en este tipo de metabolitos con cadenas de diferentes longitudes.

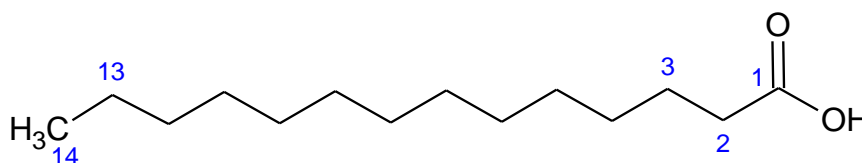


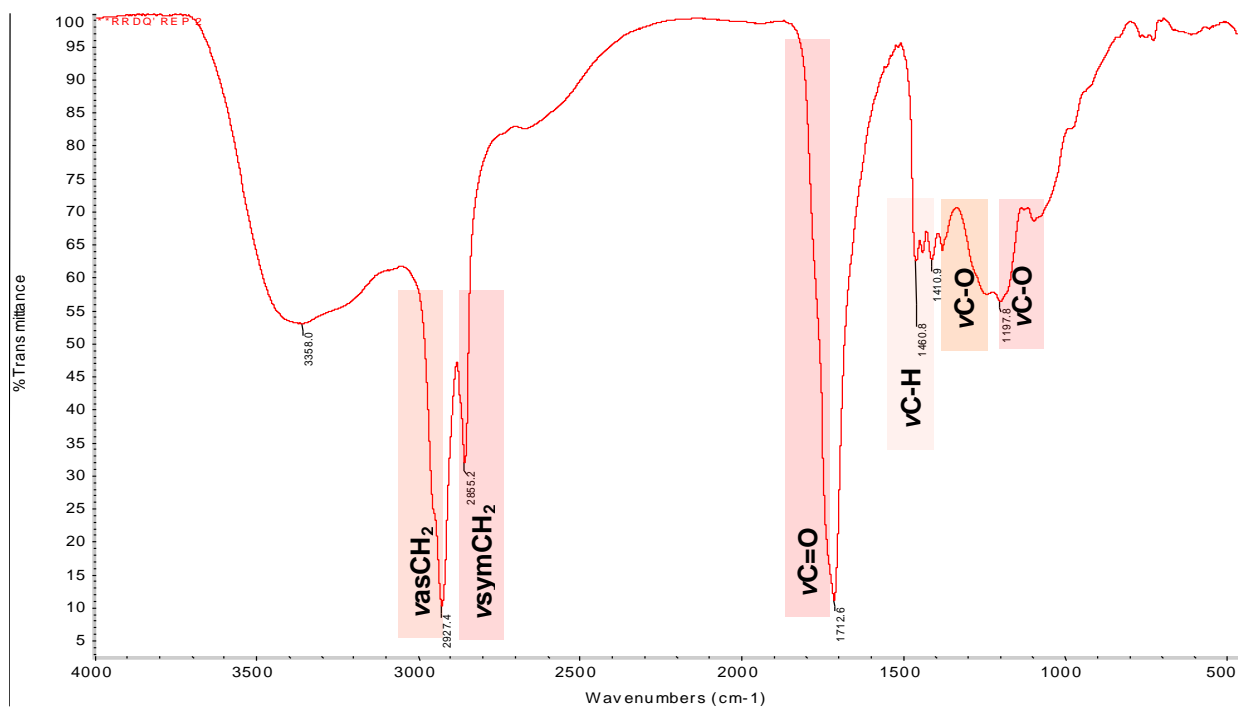
Figura 20. Estructura propuesta para el compuesto III Ácido Mirístico

El ácido mirístico ha sido aislado de *Scinaia fascicularis*⁵⁰ y citado también para el género *Hypnea* el cual está estrechamente vinculado con el género *Gracilaria*, en especies como *Hypnea cornuta*, *H. musciformis*, *H. pannosa* y *H. valentiae*⁵¹ para el género *Gracilaria* se tiene evidencia de su presencia en *G. chilensis*⁴⁷, *G. salicornia*⁵² y *G. verrucosa*³⁰.

Compuesto IV: Ácido Láurico (Ácido dodecanoico C(12:0))

Este metabolito presentó características muy similares al ácido mirístico, fue aislado como un sólido con una coloración amarillenta, cuyo punto de fusión fue 43-44°C, que presenta fluorescencia azul celeste bajo la lámpara a 366 nm y al revelar con p-anisaldehído sobre las placas cromatográficas, se obtiene una mancha azul grisácea, que permite inferir la naturaleza del tipo ácido graso del compuesto.

Al observar el espectro IR (espectro 10) se observa una banda ancha e intensa a $3358,0\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a las vibraciones características del enlace O-H. Se pueden apreciar un par de bandas agudas e intensas en $2927,4\text{ cm}^{-1}$ y $2855,2\text{ cm}^{-1}$, perteneciente a los estiramientos asimétrico y simétrico del enlace C-H de carbonos sp^3 . En $1712,6\text{ cm}^{-1}$ se aprecia una banda fuerte, típica para la vibración del enlace C=O de ácidos carboxílicos. En la zona de vibraciones fuera del plano se detectan un par de bandas en $1460,8$ y $1410,9\text{ cm}^{-1}$, que fueron asignadas a las deformaciones del enlace C-H. Finalmente se aprecia una ligera banda de absorción a $1197,8\text{ cm}^{-1}$ que se asignó a la tensión del enlace C-O.⁴⁹



Espectro 10. Espectro IR del compuesto IV

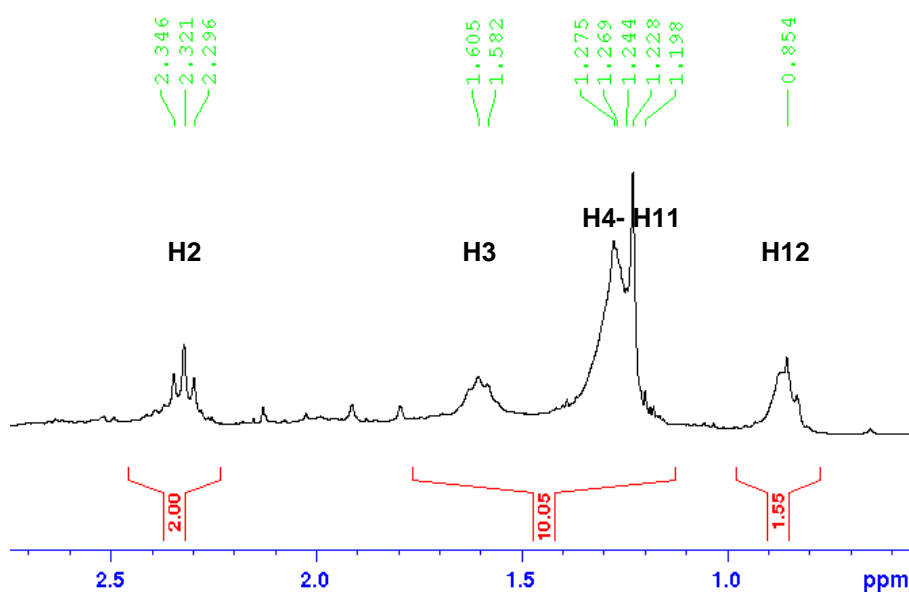
En la tabla 17 se resumen los valores obtenidos de las bandas más relevantes seleccionadas del espectro de infrarrojo.

Tabla 17. Longitudes de onda en espectroscopia IR para el compuesto IV

Longitud de onda [cm ⁻¹]	Vibración	Asignación
3358,0* f	st	O-H
2927,4 f	St as	C-H
2855,2 f	st sym	C-H
1712,6 f	st	C=O
1460,8 m	δ tijereteo	C-H
1410,9 d	δ sym	C-H
1197,8 d	st	C-O

Intensidad de la banda: f, fuerte; m, media; d, débil; *agua Vibración: st, estiramiento o tensión; δ, deformada; sy, simétrica; as, asimétrica

En el espectro RMN de ^1H (espectro 11) destaca un triplete centrado de 2,32 ppm, característico de los protones vecinos a un ácido carboxílico, una señal de tipo multiplete situada en 1,60 ppm, correspondiente a los protones beta al grupo acilo, la cual es seguida por una señal intensa centrada en 1,26 ppm en la cual se agrupan los metilenos superpuestos de la cadena y a 0,8 ppm se aprecia una señal terminal que se atribuye al metilo final de la cadena alifática.



Espectro 11. Ampliación 0 - 2,5 ppm Espectro ^1H del compuesto IV

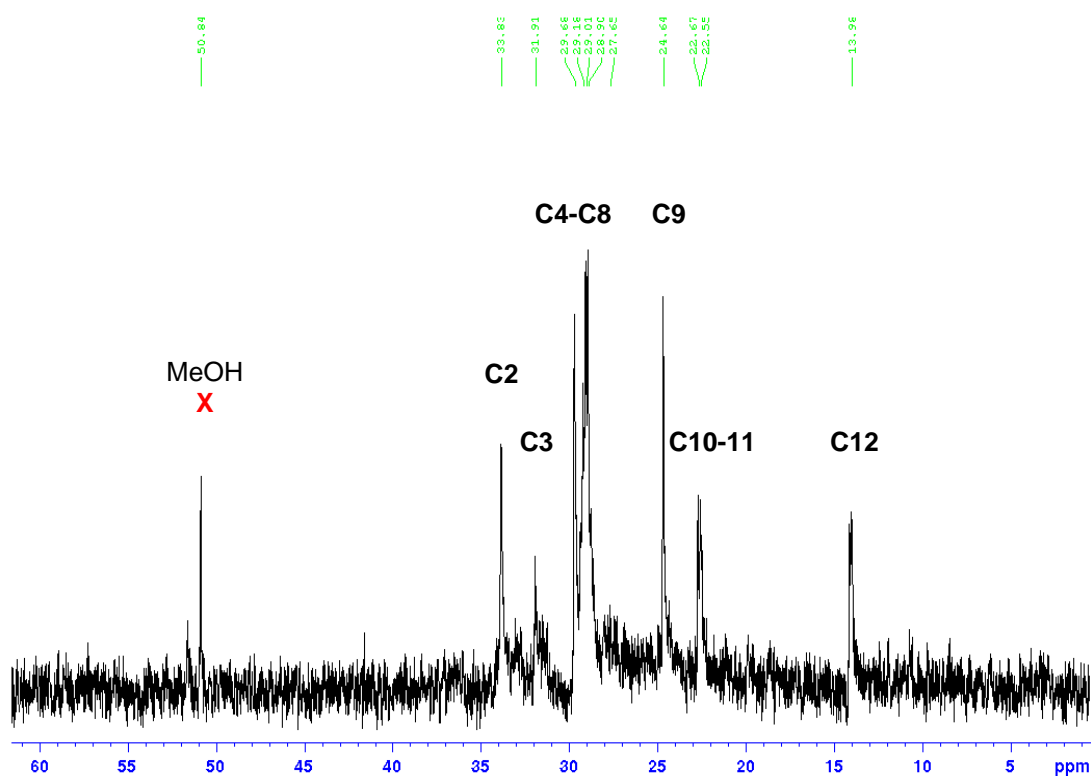
La asignación de las señales y comparación con los valores reportados en la literatura para el ácido láurico se encuentra expresada en la tabla 18.

Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el ácido láurico^a

H	δ_{Hexp} [ppm] (int. mult. J [Hz])	δ reportado HMDB ³⁷ [ppm]	Asignación
2	2,32 2H (t) 7,5	2,35	-CH ₂ -CO
3	1,59 2H (m)	1,64	-CH ₂ -CH ₂ -CO
4-11	1.25 16H (m)	1,27	-CH ₂ -
12	0.85 3H	0,89	-CH ₃

^a Espectro tomado en CD₃Cl

Al observar el espectro de RMN de ^{13}C (espectro 12) se detectan once (11) señales principales y con ayuda del experimento DEPT 135, se asignan las multiplicidades de los carbonos, donde en la zona que abarca de 34 a 22 ppm se aprecia una cadena alifática con diez (10) átomos de carbono. A campos altos la cadena presenta en 14,1 ppm un grupo metilo que está asociado a la señal de protones correspondiente en 0,85 ppm.



Espectro 12. Espectro ^{13}C del compuesto IV

La asignación de las señales y comparación con los valores reportados en la literatura de productos naturales para el ácido láurico se encuentra expresada en la tabla 19.

Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C para el compuesto IV comparado con los desplazamientos del ácido láurico ^a

C	δCexp [ppm](mult.)	δ reportado HMBD ³⁷ [ppm]	Asignación
1	-	180,7	-CO
2	33,8	34,2	-CH ₂
3	31,9	32,0	-CH ₂
4	29,7	29,7	-CH ₂
5	29,2	29,5	-CH ₂
6	29,0	29,4	-CH ₂
7	29,0	29,3	-CH ₂
8	27,7	29,2	-CH ₂
9	24,6	24,8	-CH ₂
10	22,8	22,8	-CH ₂
11	22,5	-	-CH ₂
12	14,0	14,1	-CH ₃

^a Espectro tomado en CDCl_3

A campos más altos no se logra observar por RMN la presencia del C=O a 180 ppm, se infiere que esto es debido a la poca cantidad de muestra empleada para el análisis. Con la evidencia del mismo en el IR y la multiplicidad de triplete del protón en 2,32 ppm, se propone como estructura para el compuesto obtenido al ácido dodecanoico mejor conocido como ácido láurico (figura 21).

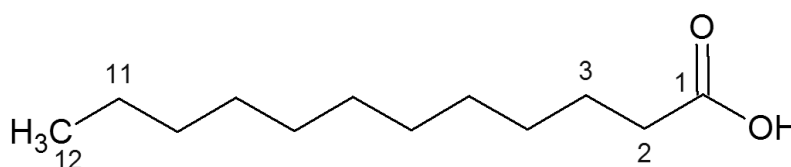


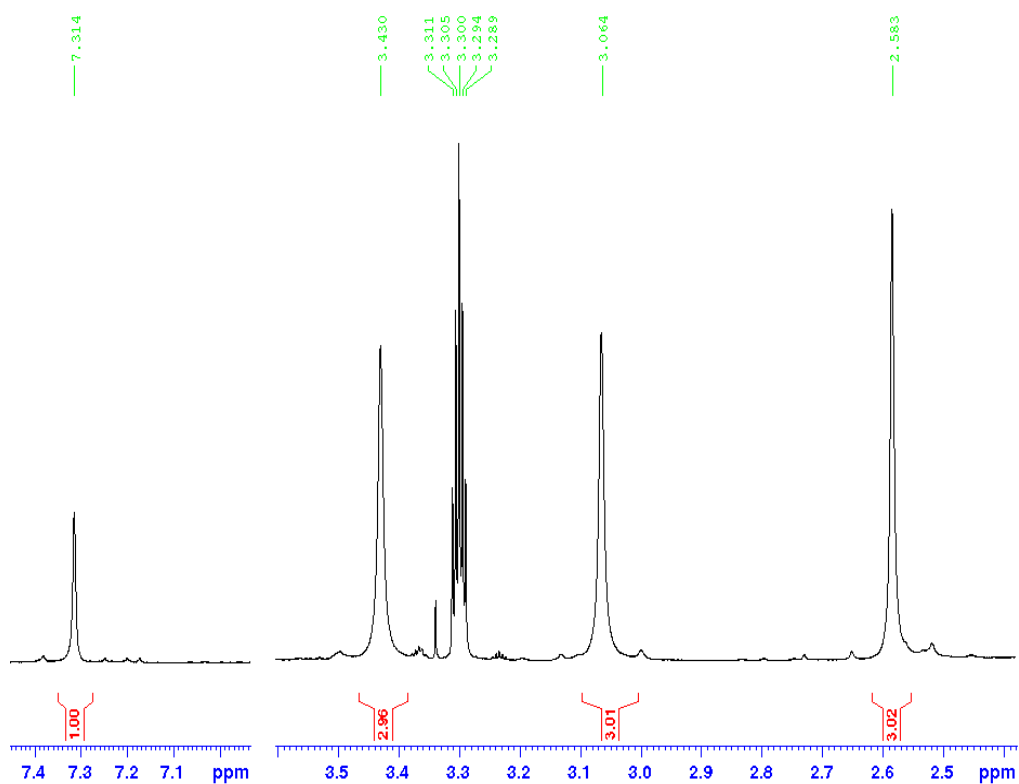
Figura 21. Estructura propuesta para el compuesto IV Ácido Láurico

El ácido láurico ha sido aislado de especies del género *Hypnea* el cual está estrechamente vinculado con el género *Gracilaria*, en especies como *Hypnea cornuta*, *H. musciformis*, *H. pannosa* y *H. valentiae*⁵¹. Para el género *Gracilaria* se tiene evidencia de su presencia en *G. salicornia*⁵² y se encuentra distribuido en los Phylum Chlorophyta y Phaeophyta.

Compuesto V: (6-bromo-1,2,7-trimetil-1H-bencimidazol-5-amina)

Este metabolito es un compuesto que revela con el reactivo de dragendorff con una coloración naranja, posee una alta absorción bajo la lámpara con una longitud de onda 254 nm, por lo tanto se infiere la presencia de un compuesto nitrogenado altamente conjugado.

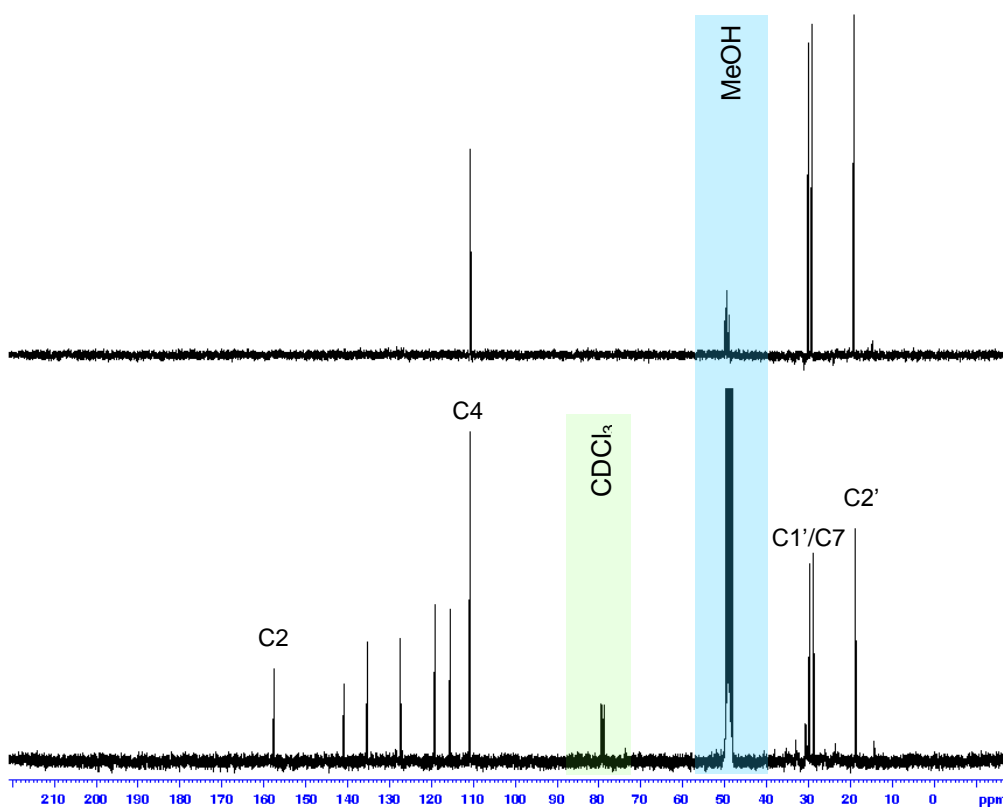
En el espectro de ^1H RMM (espectro 13), se observan 4 singletes, multiplicidad que revela la interrupción del acoplamiento entre protones vecinos. A campo alto centrado en 7,31 ppm, se observa una señal que integra para un protón característico de sistemas aromáticos. Seguido de tres singletes a 3,43 ppm, 3,06 ppm y 2,58 ppm, que integran para tres protones cada uno, por lo tanto se determinan tres metilos unidos a sistemas aromáticos o a heteroátomos, lo cual explicaría sus diferentes desplazamientos.



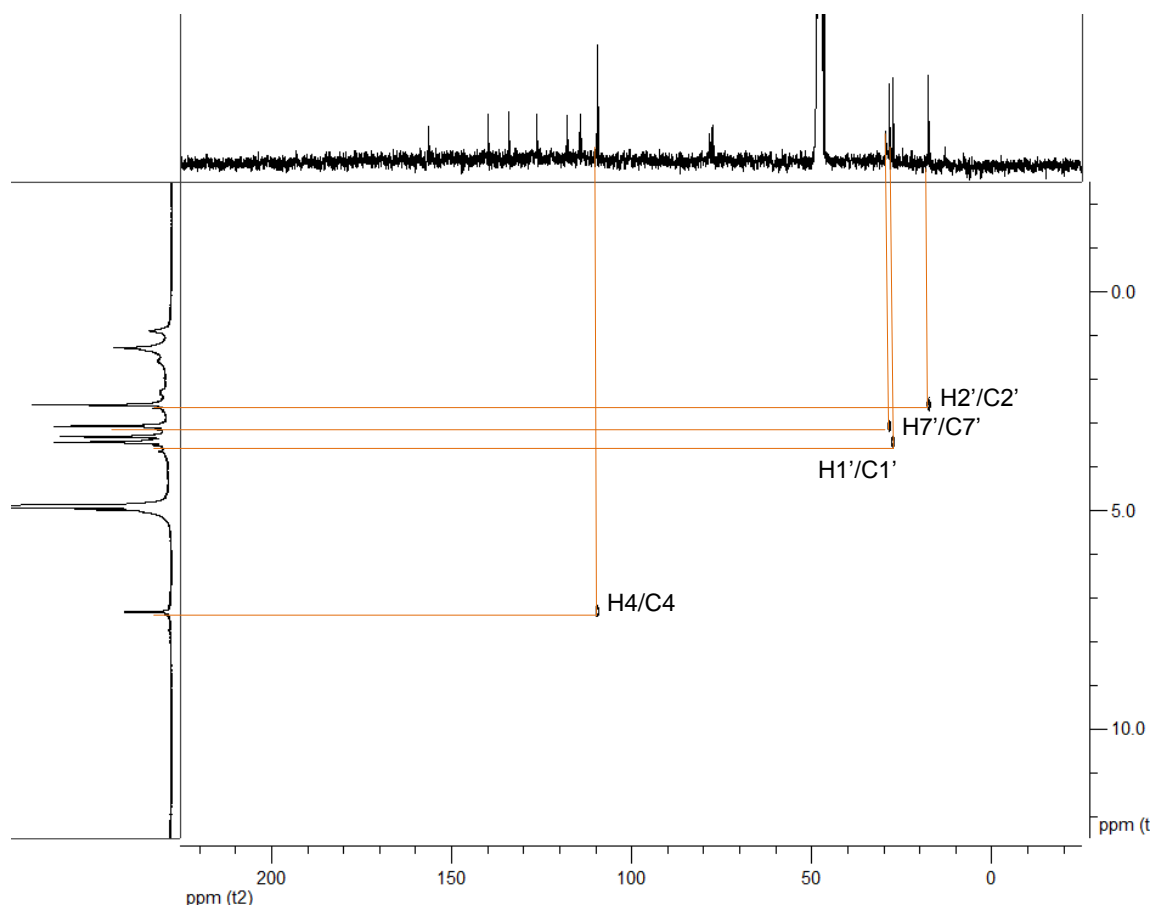
Espectro 13. Espectro de ^1H RMN del compuesto V

En el espectro 14 de ^{13}C RMN del compuesto V, se contabilizan 10 señales de carbono. Los desplazamientos inferiores a 29 ppm indican la presencia de los tres metilos predichos en el espectro de protones, los cuales se observan en el espectro HETCOR (espectro 15) a través de las correlaciones entre señales. Destaca en campos bajos un solo carbono con multiplicidad doblete correlacionado con el protón a 7,31 ppm.

Seis señales con multiplicidad singlete establecida por el experimento DEPT 135, son parte de un sistema aromático, muy similar a un bencimidazol, el cual debe estar polisustituido.

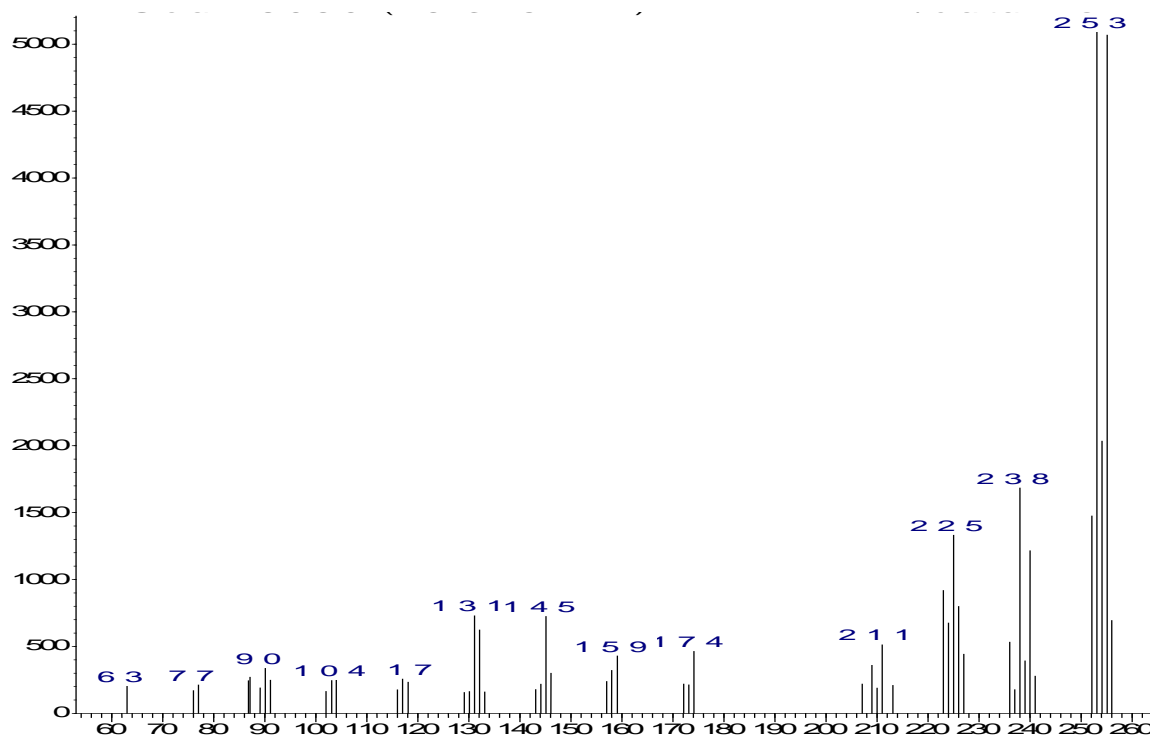


Espectro 14. Espectro de ^{13}C RMN y DEPT 135 del compuesto V



Espectro 15. Espectro HETCOR para el compuesto V

En el análisis del espectro 16 de masas se determinó que el peso molecular del compuesto es de 253 uma, ya que en el fragmentograma de la molécula se observa el ion molecular M^+ 253, en el cual se observa el patrón isotópico característico de bromo con M^+ 100% y $[M^+ + 2]$ al 98%, con la pérdida característica $[M - 79]^+$, considerando el valor impar del pico molecular se propone la fórmula molecular $C_{10}H_{12}N_3Br$, para la cual se plantea un estructura de tipo becilimidazol sustituida. En el espectro se observan pérdidas consecutivas de 15 uma, pérdidas de metilos y amino, con la formación del ion tropilio con una m/z de 91, con las típicas fragmentaciones para sistemas aromáticos de m/z 91, 77, 63.



Espectro 16. Espectro de masas para el compuesto V

Esta estructura no ha sido reportada en la literatura de productos naturales, ni en compuestos sintéticos, por lo tanto se propone la estructura siguiente (figura 22), la cual es comparada en la tabla 20 para desplazamiento de protones y la tabla 21 para desplazamiento de carbonos, con los desplazamientos obtenidos al modelar con ayuda del software ACD Labs.

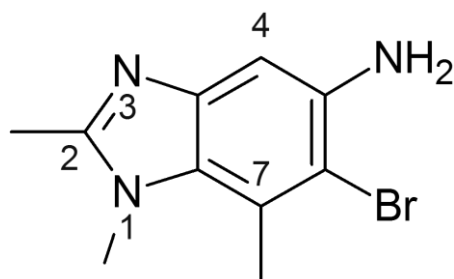


Figura 22. Propuesta de estructura del Compuesto V

Tabla 20. Desplazamientos del espectro ^1H RMN del compuesto V comparado con los desplazamientos en el modelador ACD de la estructura propuesta.

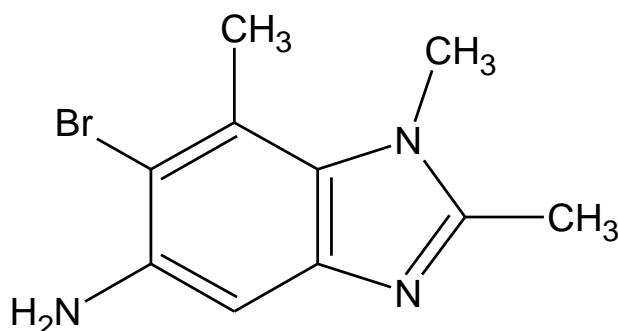
H	$\delta\text{H}_{\text{exp}}$ [ppm] (int. mult. J [Hz])	δ Modelado ACD [ppm]	Asignación
1'	3,43 3H (s)	3,33	N-CH ₃
2'	2,58 3H (s)	2,50	Ar-CH ₃
4	7,31 1H (s)	6,46	Ar-H
7'	3,06 3H (s)	2,58	Ar-CH ₃

^aEspectro tomado en MeOD

Tabla 21. Desplazamientos del espectro ^{13}C RMN del compuesto V comparado con los desplazamientos en el modelador ACD de la estructura propuesta.^a

C	$\delta\text{C}_{\text{exp}}$ [ppm](mult.)	δ Modelado ACD [ppm]	Correlación HETCOR	Asignación
1'	29,8 (q)	33,1	3,43	N-CH ₃
2	157,6 (s)	153,8	-	ArN-C-NAr
2'	18,9 (q)	12,3	2,58	Ar-CH ₃
3a	135,4 (s)	136,3	-	Ar-C
4	110,9 (d)	106,9	7,31	Ar-CH
5	141,0 (s)	139,9	-	Ar-C
6	115,6 (s)	114,5	-	Ar-C
7a	127,5 (s)	131,9	-	Ar-C
7	119,3 (s)	127,9	-	Ar-C
7'	28,8 (q)	19,7	3,06	Ar-CH ₃

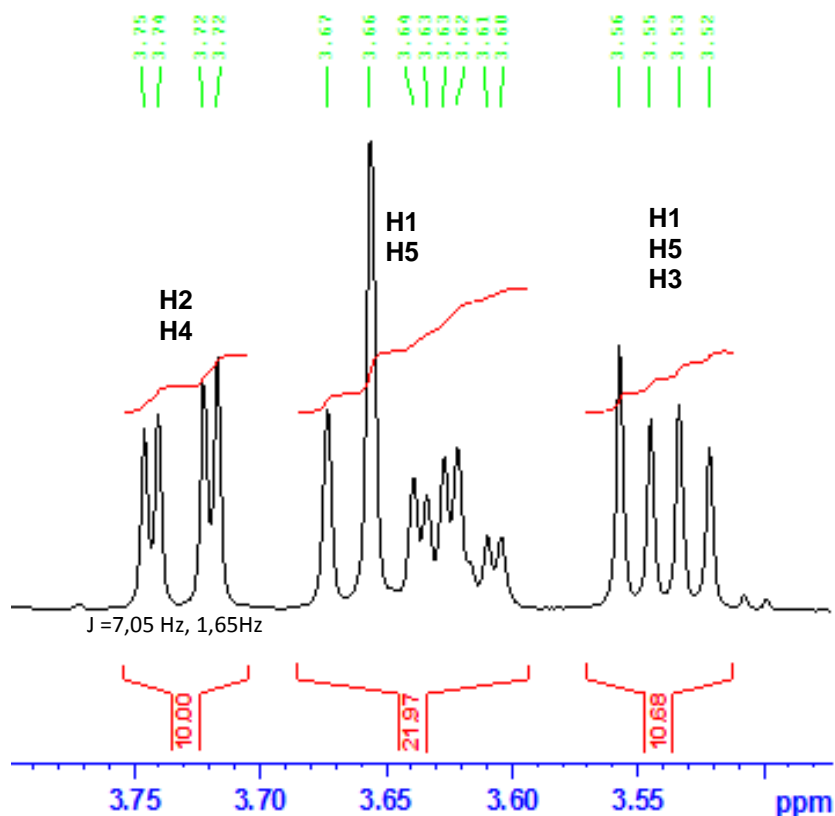
^aEspectro tomado en MeOD



Compuesto VI: Xilitol ((2R, 3R, 4S)-Penta-1,2,3,4,5-pentol)

Precipitado como un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión 93-95°C obtenido a partir del residuo hidrometanólico, poco soluble en metanol y soluble en solventes más polares, como dimetilsulfóxido y agua, que al ser revelado con timol y p-anisaldehído se aprecia una mancha blanca sobre la placa con una ligera tonalidad rosada.

En el espectro de RMN de ^1H (espectro 17) se evidencia a campo medio la presencia de dos multipletes centrados en: 3,54 ppm y 3,62 ppm asignados a los protones H1, H3 y H5, también se observó un doblete de triplete centrado en 3,73 ppm con una constante de acoplamiento de 7,05 y 1,65 Hz atribuido a los protones H2 y H4 del compuesto. Estos desplazamientos se encuentran en la tabla 22, donde son comparadas con los valores reportados para las señales del xilitol.



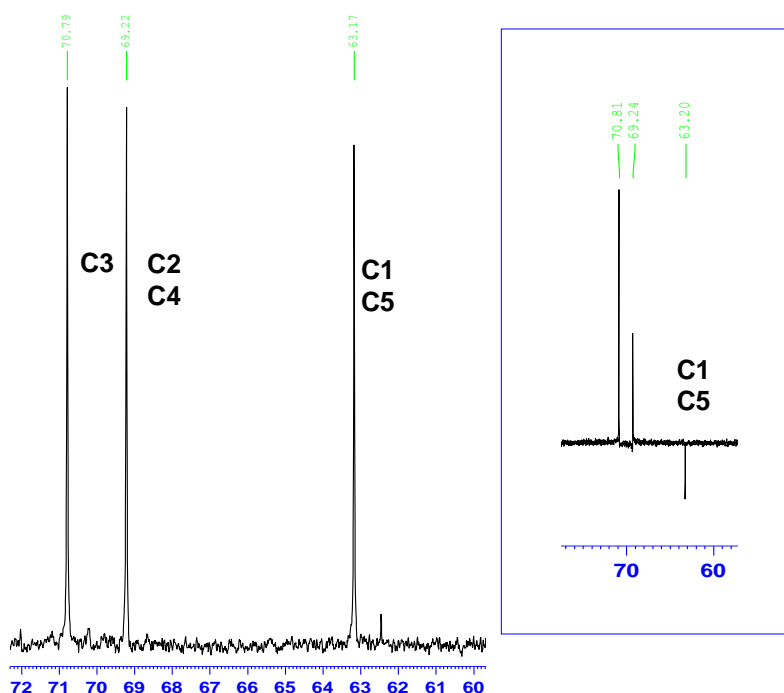
Espectro 17. Espectro ^1H del compuesto VI

Tabla 22: Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el compuesto VI^a y para el Xilitol

H	δ_{H} [D_2O] (ppm) (m, J Hz) exp.	δ_{H} [DMSO-d_6] (ppm), m rep. ⁵³
1-5	3,62 (1H, m)	3,56 (2H, m)
	3,54 (1H, m)	
2-4	3,73 (1H, dd, 7,05; 1,65)	3,36 (1H, m)
3	3,54 (1H, m)	3,36 (1H, m)

^aEspectro tomado en D_2O

El espectro de ^{13}C conjuntamente con el experimento DEPT 135 permitió corroborar la presencia de dos metilenos y tres metinos (espectro 18). Se observaron en 63,3 ppm dos metilenos equivalentes correspondientes a C1 y C5; también, se evidenció una señal en 69,3 ppm asignada al grupo metino C3. Posteriormente, se observó una señal con un desplazamiento de 70,9 ppm correspondiente a un par de metinos equivalentes C2 y C4. Estos desplazamientos se encuentran en la tabla 23, donde son comparados con los valores reportados en la literatura.

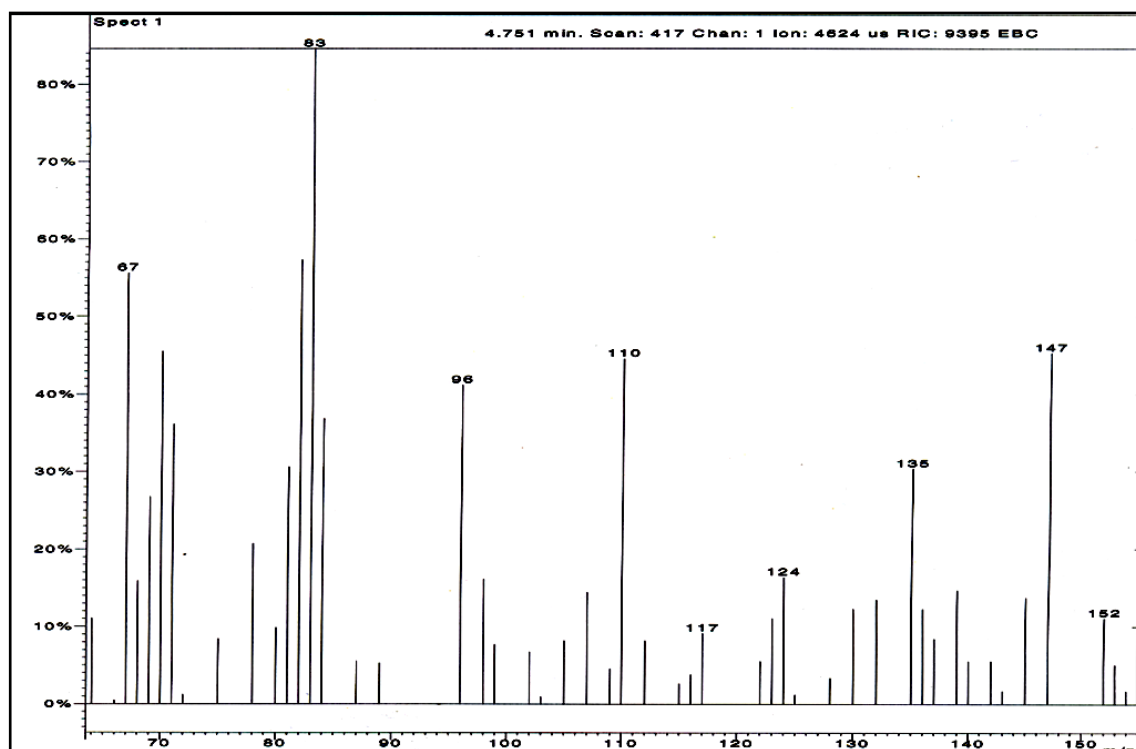


Espectro 18. Espectro ^{13}C y DEPT 135 del compuesto VI

Tabla 23. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H para el Compuesto VI comparado con el Xilitol

C	δ_{Cexp}	δ reportado	δ reportado	δ reportado	Asignación
	[ppm](mult.) D ₂ O	[ppm] ⁵³ DMSO-d ₆	[ppm] ⁵⁴ CD ₃ OD	HMDB ³⁷ [ppm]D ₂ O	
1-5	63,1 (d)	63,0	66,8	65,4	CH ₂ -OH
2-4	70,9 (t)	72,8	73,6	74,7	CH-OH
3	69,2 (t)	72,7	72,9	73,4	CH-OH

El análisis del compuesto por espectrometría de masas (EM) (espectro 19) presentó un ion molecular M^+ de m/z 152 junto con la data obtenida de los espectro de RMN ^1H , ^{13}C y el experimento DEPT 135; se estableció la fórmula molecular de compuesto como $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$, permitiendo caracterizar el compuesto **V** como xilitol.



Espectro 19. Espectro de masas para el compuesto V Xilitol

El polialcohol caracterizado (figura 23) ha sido reportado para las algas pardas *Canistrocarpus cerviconis*⁵⁵ y *Padina boergesenii*⁵⁶. Este alditol, posee diversas aplicaciones comerciales en la industria farmacéutica y de alimentos, ya que es usado como edulcorante por su bajo valor calórico.⁵⁷ El xilitol se utiliza también como un sustituto de la sacarosa en los alimentos para diabéticos debido a que no se requiere de insulina para su metabolismo. Este tiene aproximadamente la misma sensación de dulzura relativa con respecto a la sacarosa.

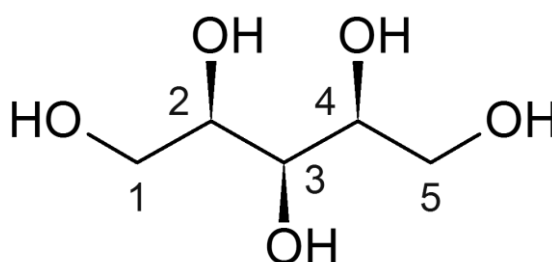


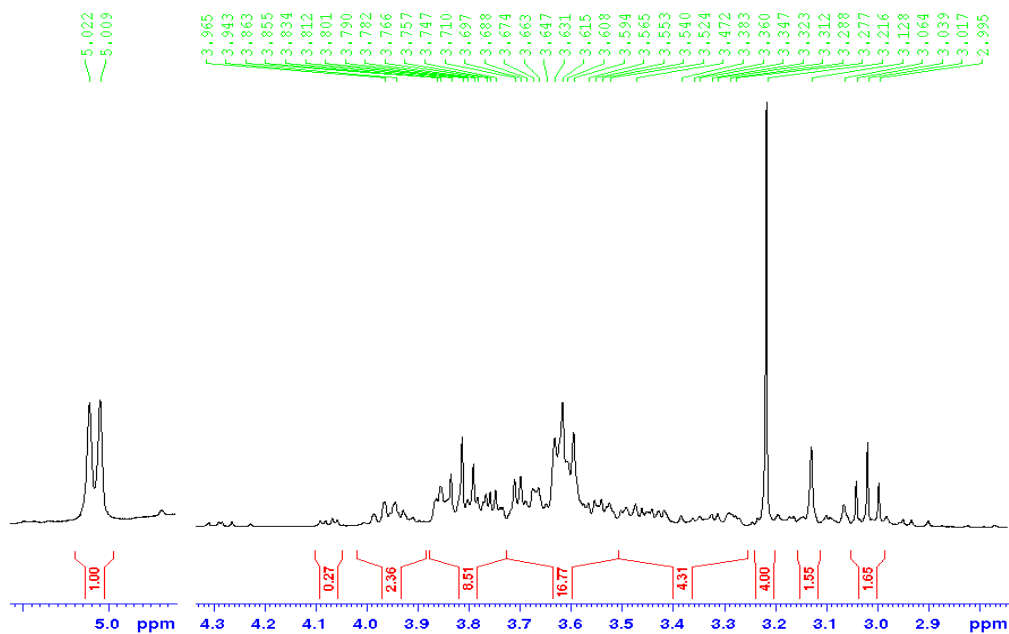
Figura 23. Estructura del compuesto VI Xilitol

Compuesto VII: Polisacárido de tipo Agarano

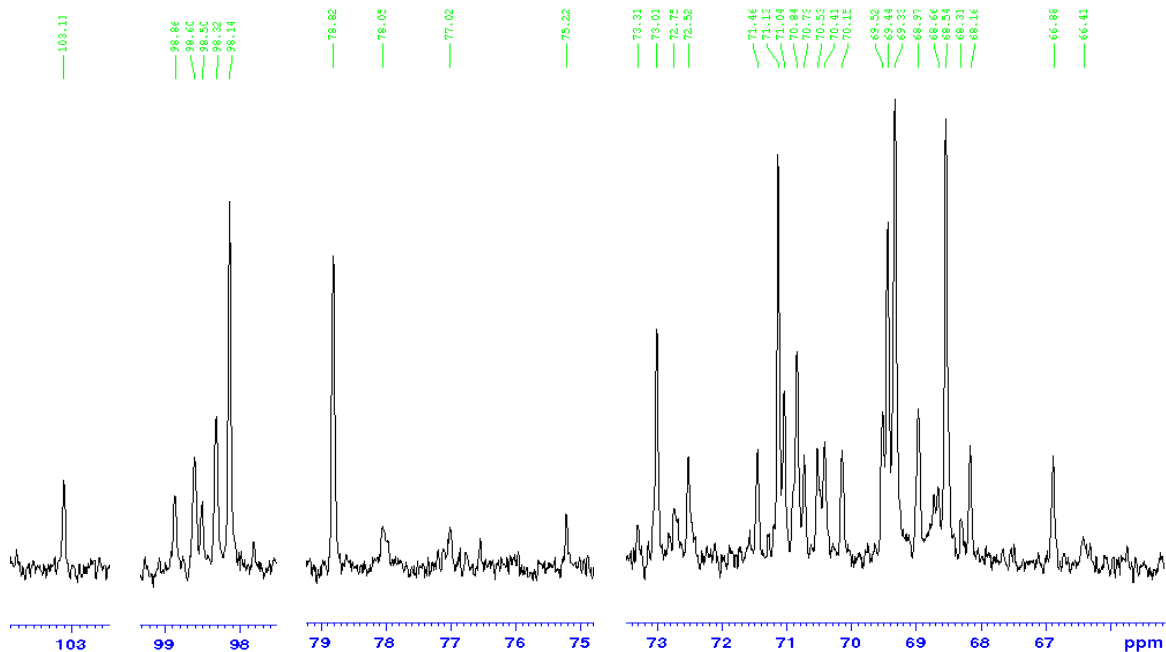
El compuesto aislado del residuo hidrometanólico es altamente higroscópico con apariencia mucilaginosa y color caramelo, particularmente al estar completamente seco aumenta su volumen en más de 10 veces, es soluble en agua y metanol. Revela con una coloración verdosa con p-anisaldehído y morada con timol, lo cual implica que se puede tratar de compuesto del tipo polisacárido.

En los espectros de RMN de ^1H (espectro 20) para el compuesto **VII**, se observa una zona donde se acumulan varias señales características de protones vecinos a heteroátomos, como el oxígeno en este caso. Se aprecia una señal centrada en 5,02 ppm con multiplicidad doblete con una constante J de acoplamiento igual a 3,90 Hz, característico de protones anoméricos. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 21) se revela una numerosa cantidad de señales en la zona de carbohidratos de 60 a 80 ppm y carbonos anomérico cercanos a los 100 ppm. La identificación de la estructura del polímero comienza con la identificación de las

unidades monoméricas, con las técnicas en una dimensión, se pudo detectar la presencia de 4-O-metil- α -L-galactosa (LM4).



Espectro 20. RMN 1H para el Compuesto VII



Espectro 21. Espectro RMN 13C para el compuesto VII

Las unidades monoméricas mencionadas son comparadas con la data experimental obtenida en la tabla 24 para RMN ^{13}C

Tabla 24. Comparación señales RMN ^{13}C del compuesto VII y unidades de LM4^a

C	δ_{C} (ppm) (m, J Hz) exp.	δ_{H} (ppm)rep. LM4⁵⁸
1	98,4	98,4
2	68,5	68,6
3	69,9	69,5
4	78,8	79,2
5	71,5	70,8
6	61,2	61,3
7	61,5	61,7

^aEspectros tomados en D₂O

Debido a la complejidad del espectro, sólo se pudo proponer la presencia de una sola unidad la 4-O-metil- α -L-galactosa (LM4), la cual se puede observar en la figura 23, se requiere de data más específica para poder asignar el resto de las señales faltantes y como las mismas unidades se interconectan, dicha data puede ser obtenida mediante la realización de un espectro RMN HETCOR. Estudios previos sobre los agares de *G. blodgettii*, destacan la presencia de unidades de L-3,6-anhidrogalactosa (LA), 2-O-metil-3,6-anhidro-L-galactosa y 6-O-metil-D-galactosa⁵⁸, conformando el polisacárido agarobiosa⁵⁹ mostrado en la figura 23.

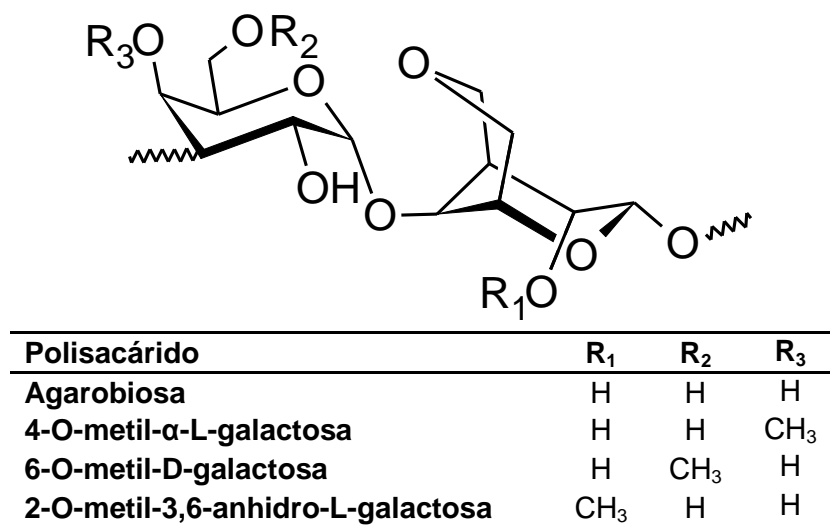


Figura 24. Agarobiosa y agarobiosa metilada reportada para agares de *G. blodgettii*

5.- CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó el estudio fitoquímico de extracto crudo de metanol del alga roja *Gracilaria blodgettii*, obteniendo cinco particiones: el extracto de hexano con un rendimiento del 0,03% con respecto al material seco, el residuo insoluble en la mezcla MeOH:H₂O (1:1) con 0,2% de rendimiento, extracto de diclorometano con 0,2% de rendimiento, extracto de acetato de etilo con 0,03% de rendimiento y finalmente, el residuo hidrometanólico con 0,8% de rendimiento.
- ✓ Del residuo insoluble en la mezcla metanol agua en iguales proporciones, destaca la presencia de clorofilas y se caracteriza un metabolito secundario del tipo esteroidal, el colesterol (I)
- ✓ Los ácidos palmítico, esteárico, eicosenoico y nervónico (II), fueron identificados como compuestos mayoritarios presentes en el extracto de hexano.
- ✓ Se propone la presencia de los ácidos grasos mirístico (III) y láurico (IV), en conjunto con un alcaloide del tipo bencimidazol (V), cuya estructura propuesta es nueva para la literatura de productos naturales.
- ✓ Para el residuo hidrometanólico se aisló un poliol conocido como el xilitol (VI) y un polisacárido del tipo agarano (VII), del cual se identificó una de sus unidades monoméricas como 4-O-metil-L-galactosa.

6.- RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar con el análisis de las fracciones obtenidas, es búsqueda de mejores separaciones a través de otras técnicas como HPLC, CG, Resinas poliméricas, entre otros.
- ✓ Realizar el análisis de cuantificación del contenido de ácidos grasos saturados e insaturados, por técnicas de CG-EM.
- ✓ Determinar la viabilidad alimenticia del alga *Gracilaria blodgettii*, mediante análisis proximal.
- ✓ Caracterizar los aceites esenciales de una muestra fresca del alga roja.
- ✓ Cuantificar los metales esenciales y no esenciales, ocluidos por el alga en su ambiente marino, permitiría determinar el valor nutricional en cuanto a minerales y el tipo de contaminación presente en la zona.
- ✓ Establecer un análisis estacional del alga, para medir un perfil de expresión de metabolitos anualizado.
- ✓ Establecer un protocolo para el análisis de polisacáridos, mediante espectroscopia 2D, hidrólisis y cuantificación de ésteres de sulfatos, cuantificación de unidades monoméricas y estudiar las propiedades reológicas de los geles.
- ✓ El uso en mayor cantidad de biomasa, para acumular mayor cantidad de metabolitos presentes, en función de poder caracterizar aquellos que fueron descartados o no detectados.

7.-BIBLIOGRAFÍA

1. Marcano, D. & Masahisa, H. Fitoquímica Orgánica. (2002) *UCV Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico*, Caracas, Venezuela.
2. Desjardine, K. L. J. W. Blunt, B. R. Copp, R. a Keyzers, M. H. G. Munro, and M. R. Prinsep. (2007) Bioactive Marine Natural Products. *Nat. prod. Rep.* 31.
3. Diccionario ambiental, glosario, términos medio ambiente. Available at: <http://www.ambientum.com/diccionario/listado/diccionario.asp?letra=f#>. (Accessed: 15th June 2015)
4. Erdtman, H. (1970). Some aspects of chemotaxonomy. *Pure and Applied Chemistry*, 6(4), 679-708.
5. Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 27, 165–237.
6. Lindorf, H., Parisca, L. & Rodríguez, P. (1999) Botánica: Clasificación, estructura y Reproducción. Ediciones Biblioteca de la U.C.V. Caracas, Venezuela.
7. Blunt, J. W. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, and M. R. Prinsep, (2009). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 26, 170–244
8. Bold, H. & Wynne, M. (1978) Introduction to the algae. Structure and reproduction. *Prentice-Hall, Inc.* Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
9. Curtis, H. & Barnes, S. (2001) Biología. Panamericana, 7 ma Edición. Editorial Médica. Buenos Aires, Argentina.

10. Herrera, A. (2009) Estudio fitoquímico del alga *Penicillus capitatus* Lamarck y evaluación de su posible actividad antiinflamatoria Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.
11. Izco, J. M. Barreno, M. Brugués, J. Costa, F. Devesa, T. Fernández, X. Gallardo, E. Llimona, S. Salvo, Talavera, and B. Valdés. (1997). Botánica. Editorial Interamericana. Madrid, España
12. Raven, P., Evert, R. & Richhorn, S. (1999) Biology of Plants. W.H. Freeman and Company Worth. New York, U.S.A.
13. Escuela de Biología UCV. Guía Web de Laboratorio de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, UCV. Algas Available at: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/labbiolvegetal/plantilla4/index/descargas.htm>. (Accessed: 15th June 2015)
14. Dreckmann, K. M. (2012) Los géneros *Gracilaria* e *Hydrountia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) en las costas mexicanas del Golfo de México y Caribe. *Monogr. Fisiol.* 4, 1–114.
15. Dreckmann, K. (1999) El género *Gracilaria* (Rhodophyta) en el Pacífico Centro-Sur de México. *Hidrobiológica* 9, 71–49.
16. Vera, B. & Ardito, S. (1997) "Catálogo de las algas marinas del Herbario Nacional de Venezuela, Acta Botánica de Venezuela (ed. Tamandúa) 25–108. *Fundación Instituto Botánico de Venezuela (FIBV)*. Caracas, Venezuela.
17. Guiry, M., Guiry, M. & Guiry, G. (2015) AlgaeBase World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. Available at: <http://www.algaebase.org>. (Accessed: 22nd June 2015)
18. Ji, N. Y. X. M. Li, K. Li, L. P. Ding, J. B. Gloer, and B. G. Wang (2007). Diterpenes, sesquiterpenes, and a C15-acetogenin from the marine red alga *Laurencia mariannensis*. *J. Nat. Prod.* 70, 1901–1905.

19. González, A. G., Martín, J. D., Martín, V. S., Norte, M. & Pérez, R. (1982). Biomimetic approach to the synthesis of rhodolaureol and rhodolauradiol. *Tetrahedron Lett.* 23, 2395–2398
20. Kladi, M. C. Vagias, P. Papazafiri, G. Furnari, D. Serio, and V. Roussis. (2007). New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron* 63, 7606–7611.
21. Ji, N. Y., Li, X. M., Cui, C. M. & Wang, B. G. (2007) Two new brominated diterpenes from *Laurencia decumbens*. *Chinese Chem. Lett.* 18, 957–959.
22. Ji, N. Y., Li, X. M., Cui, C. M. & Wang, B. G. (2007) Terpenes and polybromoindoles from the marine red alga *Laurencia decumbens* (Rhodomelaceae). *Helv. Chim. Acta* 90, 1731–1736.
23. Matsuo, Y., Suzuki, M. & Masuda, M. (1995). Enshuol, a Novel Squalene-derived Pentacyclic Triterpene Alcohol from a New Species of the Red Algal Genus *Laurencia*. *Chem. Lett.* (11), 1043-1044.
24. Suzuki, M. & Kurosawa, E. (1985). A C-15 non-terpenoid from the red alga *Laurencia okamurai*. *Phytochemistry* 24, 1999–2002.
25. Suzuki, M., Matsuo, Y., Takeda, S. & Suzuki, T. (1993). Intricatetraol, a halogenated triterpene alcohol from the red alga *Laurencia intricata*. *Phytochemistry* 33, 651–656.
26. Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y. & Wang, B. G. (2008). Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. *J. Nat. Prod.* 71, 28–30.
27. Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y., Gloer, J. B. & Wang, B. G. (2008). Urceolatin, a structurally unique bromophenol from *Polysiphonia urceolata*. *Org. Lett.* 10, 1429–1432.

28. Canelón, D. J., Ciancia, M., Suárez, A. I., Compagnone, R. S. & Matulewicz, M. C. (2014). Structure of highly substituted agarans from the red seaweeds *Laurencia obtusa* and *Laurencia filiformis*. *Carbohydr. Polym.* 101, 705–713.
29. Zancudo, E. (2009) Estudio químico y evaluación de la posible actividad antiinflamatoria del alga *Gracilariopsis hommersandii*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.
30. Khotimchenko, S. V. & Vas'kovsky, V. E. (2004). An inositol-containing sphingolipid from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 30, 168–171.
31. Hung, T. D. Hye, J. Eun, S, Shinde, M. Yoon, J. Hong, K. Dong, and Jung, Jung (2008). Anti-inflammatory constituents of the Red Alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *J. Nat. Prod.* 71, 232–240.
32. Sun, Y. Sun, Y. Xu, K. Liu, H. Hua, H. Zhu, and Y. (2006) Gracilarioside and gracilamides from the Red alga *Gracilaria asiatica*. *J. Nat. Prod.* 69, 1488–1491
33. Yotsu-yamashita, M., Haddock, R. L. & Yasumoto, T. (1993). Polycavernoside A: *Am. Chem Soc.* 115, 1147–1148.
34. Yotsu-Yamashita, M. T. Yasumoto, S. Yamada, F. F. a Bajarias, M. a. Formeloza, M. L. Romero, and Y. Fukuyo, (2004). Identification of polycavernoside A as the causative agent of the fatal food poisoning resulting from ingestion of the red alga *Gracilaria edulis* in the Philippines. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1265–1271
35. Nagai, H., Yasumoto, T. & Hokama, Y. (1997). Manauealides, some of the causative agents of a red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii. *J. Nat. Prod.* 60, 925–928

36. Shoeb, M. & Jaspars, M. (2003). Chlorinated C12 fatty acid metabolites from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *J. Nat. Prod.* 66, 1509–1511.
37. Wishart, D. S. Knox, A. C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D. D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J. A. Cruz, E. Lim, C. A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. de souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhtudinov, L. Li, H. J. Vogel, and I. Forsythei. (2009). HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 37, 603–610.
38. Gibbons, G., Goad, L. & Goodwin, T. (1967). The sterols of some marine red algae. *Phytochemistry* 6, 677–683.
39. Plouguerné, E., Kikuchi, H., Oshima, Y., Deslandes, E. & Stiger-Pouvreau, V. (2006) Isolation of Cholest-5-en-3-ol formate from the red alga *Grateloupia turuturu* Yamada and its chemotaxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 714–717.
40. Bhakuni, D. S. & Rawat, D. S. (2007). Bioactive Marine Natural Products. *Nat. prod, report* 31.
41. Jamieson, G. R. & Reid, E. H. (1972). The component fatty acids of some marine algal lipids. *Phytochemistry* 11, 1423–1432
42. Shanab, S. M. M. (2007).Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds (Egyptian Isolates). *Int. J. Agric. Biol.* 9, 220–225
43. Pereira, H. et al. (2012). Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: Potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Mar. Drugs* 10, 1920–1935
44. Santoyo, S. L. Barreira, F. Figueiredo, L. Custodio, C. Vizetto-Duarte, C. Polo, E. Aschwin, and J. Varela. (2013). Antiviral compounds obtained from

- microalgae commonly used as carotenoids sources. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1–34.
45. Lee, D. Y.-W. Lee, X. Lin, E. E. Paskaleva, Y. Liu, S. S. Puttamadappa, C. Thornber, J. R. Drake, M. Habulin, A. Shekhtman, and M. Cank. (2009). Palmitic acid is a novel CD4 fusion inhibitor that blocks HIV entry and infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 1231–1241
 46. Lin, X., Paskaleva, E. E., Chang, W., Shekhtman, A. & Canki, M. (2011). Inhibition of HIV-1 infection in ex vivo cervical tissue model of human vagina by palmitic acid; implications for a microbicide development. *PLoS One* 6.
 47. Lozano, I., Wacyk, J. M., Carrasco, J. & Cortez-San Martín, M. a. (2015). Red macroalgae *Pyropia columbina* and *Gracilaria chilensis*: sustainable feed additive in the *Salmo salar* diet and the evaluation of potential antiviral activity against infectious salmon anemia virus. *J. Appl. Phycol.* doi:10.1007/s10811-015-0648-8
 48. Aydoğmuş, Z., Topcu, G. & Güven, K. C. (2008). Studies on chemical constituents of *Gracilaria verrucosa*. *Nat. Prod. Res.* 22, 1589–96
 49. Safar, M., Bertrand, D., Roberta, P., Devaux, M. F. & Genot, C. (1994). Characterization of Edible Oils, Butters and Margarines by Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 371–377.
 50. Afaq-Husain, S., Shameel, M., Usmanghani, K., Ahmad, M. & Ahmad, V. U. (1991). Phycochemical Studies on *Scinaia fascicularis* (Børg.) (Bonnemaisoniales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 34, 27–33
 51. Afaq-Husain, S., Shameel, M. & Khan, R. (1992). Phycochemical Investigations on Four Species of *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 35, 141–146

52. Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z. & Waaland, J. R. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *J. Sci. Food Agric.* 92, 2500–2506
53. Hong, L., Yan-Jing, B., Yu-Ying, Z. & Ru-Yi, Z. (1998). The Chemical Constituents from the Roots of *Bupleurum chinense* DC. *J. Chinese Pharm. Sci.* 7, 98–99.
54. Khetwal, K. S., Neelima, M. & Pant, N. (2000). Constituents of high altitude Himalayan herbs: Part XI-Xylitol and lignan from *Bupleurum tenue*. *Indian J. Chem.* 398, 448–450.
55. Valdivieso, G. (2008) Estudio fitoquímico y evaluación de la posible actividad antiinflamatoria del alga *Canistrocarpus cervicornis*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.
56. Rodriguez, R. (2007). Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del alga parda *Padina boergesenii*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela.
57. Garrett, E. C. & Serianni, A. S. (1990). Alditols: elimination of magnetic equivalence in ^1H - and ^{13}C -N.M.R. spectra of symmetric compounds through (^{13}C)-substitution. *Carbohydr. Res.* 208, 23–35
58. Freile-Pelegrián, Y. & Murano, E. (2005). Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. *Bioresour. Technol.* 96, 295–302
59. Lahaye, M., Rochas, C. & Yaphe, W. (1986). A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell walls of *Gracilaria spp* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Can. J. Bot.* 64, 579–585.