

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ALGA *Chaetomorpha californica***

**MÓNICA NATALIA AGUILAR ERASO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA  
EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2003**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ALGA *Chaetomorpha californica***

**MÓNICA NATALIA AGUILAR ERASO**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA  
EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
Popayán  
2003**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ALGA *Chaetomorpha californica***

**MÓNICA NATALIA AGUILAR ERASO**

Trabajo de grado para optar al título de

*Químico*

Director

**Dr. LUIS ALBERTO LENIS VELÁSQUEZ**

Asesor

**M.Sc. RICARDO BENITEZ BENITEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA  
EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2003**

Nota de aceptación

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Popayán, 15 de Agosto de 2003

A mis padres Celia y Everardo,

A mis hermanos y amigos

en especial a Jairo mono,

con todo mi cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mis mas sinceros agradecimientos a la Universidad del Cauca por darme la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera Química.

A todo el departamento de Química por proporcionarme las herramientas necesarias para llevar a cabo con éxito mi carrera.

Agradezco especialmente al profesor Alberto Lenis V. Director de mi tesis, por su amistad, sus consejos, la paciencia y todo lo que de el aprendí durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al profesor Ricardo Benítez por sus conocimientos y por asesorar el trabajo. De igual forma gracias al Biologo Marino Andrés Felipe Ospina por su colaboración en la recolección del alga.

Al señor decano M.Sc. Alvaro Tascón y al respetable jurado por permitirme culminar el trabajo de grado.

A los Servicios Generales de la Universidad de La Coruña y Santiago de Compostela en España por la realización de todos los espectros.

Quiero darle las gracias a todas las personas que de una y otra forma me acompañaron y estuvieron conmigo en todo momento, gracias a mis padres en especial a mi madre Celia, por apoyarme en todas mis decisiones y animarme cada día, a todos mis hermanos por todo lo bueno que de ellos recibí, en especial a: Agnolia por su apoyo en especial el económico, Juliana y Sandra por sus consejos y apoyo económico y Claudia por escucharme todas mis cosas y por toda la compañía y años que compartimos juntas.

A doña Esperanza y don Alfonso ya fallecidos, les agradezco en el alma el habernos recibido con todo el cariño en su casa a Juliana y a mi.

A mis amiguitas Fanny, Wilma Y Alba Milena por todo el apoyo que me brindaron en todo momento, por toda la amistad que compartimos, en especial a Fanny por las traspasadas de estudio y rumba, el eterno 11, gracias por acompañarme en cada viaje de revisión bibliográfica. A su hermano José por prestarme su computador y por todo lo buen amigo por siempre.

A todos pero todos mis amigos, a los enanos como Carlos que siempre me presto su computador. Muchísimas gracias Jairo “mono”, por todo el inmenso apoyo que de ti recibí en todo momento, gracias por estar en mi vida.

Por último gracias a nuestro padre creador, por estar siempre conmigo.

## CONTENIDO

	<b>Pag.</b>
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	4
<b>2. OBJETIVOS</b>	7
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos Específicos	7
<b>3. MARCO TEORICO</b>	8
3.1 Algas	8
3.2 Manglares	24
3.3 Características espectroscópicas de metabolitos aislados de algas marinas	26
<b>4. METODOLOGÍA</b>	28
4.1 Recolección del material	28
4.2 Tratamiento previo	29
4.3 Extracción preliminar	30
<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	48
<b>5.1 METABOLITOS AISLADOS DE FRACCIÓN BUTANOLICA</b>	48
5.1.1 Determinación estructural del compuesto 1	48



<b>5.1.2</b>	<b>Análisis espectroscópico del compuesto 1</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>METABOLITOS AISLADOS DE FRACCIÓN ACUOSA</b>	<b>59</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Determinación estructural de FA 5-6</b>	<b>61</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análisis espectroscópico de FA 5-6</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>MATERIAL E INSTRUMENTAL</b>	<b>77</b>
<b>6.1.1</b>	<b>Reactivos</b>	<b>77</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Equipos</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>SUGERENCIAS</b>	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>83</b>

## LISTA DE TABLAS Y ESQUEMAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del alga <i>Chaetomorpha californica</i>	15
<b>Tabla 2.</b> Actividad citotóxica de las fracciones	33
<b>Tabla 3.</b> Subfracciones de la fracción FB	46
<b>Tabla 4.</b> Desplazamientos químicos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el compuesto <b>1</b> y 8-deuterio-adenosina	58
<b>Tabla 5.</b> Desplazamientos químicos de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC Y HMQC para el compuesto FA 5-6	74
<b>Esquema 1.</b> Fraccionamiento del extracto metanólico	32
<b>Esquema 2.</b> Fraccionamiento de la fracción <b>FB</b>	48
<b>Esquema 3.</b> Separación de fracción acuosa	60
<b>Esquema 4.</b> Propuesta estructural del compuesto <b>FA</b> <sub>5-6</sub>	76

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura de Fucoxantina	11
<b>Figura 2.</b> Estructura de Ácido algínico	11
<b>Figura 3.</b> Estructura de Ficoeritrina	12
<b>Figura 4.</b> Estructura de Ficocianina	12
<b>Figura 5.</b> Estructura de componentes de Agar	13
<b>Figura 6.</b> Estructura de Carragenina	13
<b>Figura 7.</b> Estructura de Zeaxantina	16
<b>Figura 8.</b> Estructura de $\alpha$ Caroteno	16
<b>Figura 9.</b> Estructura de $\beta$ Caroteno	16
<b>Figura 10.</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de fracción de hexano	35
<b>Figura 11.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ de fracción de hexano	36
<b>Figura 12.</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de fracción de cloruro de metileno	38
<b>Figura 13.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ de fracción de cloruro de metileno	39
<b>Figura 14.</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de fracción acuosa	41
<b>Figura 15.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ de fracción acuosa	42
<b>Figura 16.</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ de fracción <i>n</i> - Butanol	44

<b>Figura 17.</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H de fracción <i>n</i> - Butanol	45
<b>Figura 18.</b>	Cromatograma del compuesto <b>1</b>	49
<b>Figura 19.</b>	Espectro UV del compuesto <b>1</b>	50
<b>Figura 20.</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>1</b>	53
<b>Figura 21.</b>	Espectro RMN <sup>13</sup> C del compuesto <b>1</b>	55
<b>Figura 22.</b>	Espectro DEPT del compuesto <b>1</b>	56
<b>Figura 23.</b>	Espectro de masas del compuesto <b>1</b>	58
<b>Figura 24.</b>	Estructura de Adenosina	60
<b>Figura 25.</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H del compuesto <b>FA</b> 5-6	64
<b>Figura 26.</b>	Espectro DEPT 135 del compuesto <b>FA</b> 5-6	66
<b>Figura 27.</b>	Espectro JMOD del compuesto <b>FA</b> 5-6	68
<b>Figura 28.</b>	Espectro COSY <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H del compuesto <b>FA</b> 5-6	70
<b>Figura 29.</b>	Espectro HMQC del compuesto <b>FA</b> 5-6	72
<b>Figura 30.</b>	Espectro HMBC del compuesto <b>FA</b> 5-6	74
<b>Figura 31.</b>	Estructura de α - D – Glucopiranosil – (1→ 4) – α - D – Glucopiranososa	77

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A.C	Antes de cristo
Bu-OH	Butanol
°C	Grados centígrados
C	Carbono
<sup>13</sup> C	Carbono 13
#C	Asignación numérica para carbono
CH	metino
CH <sub>2</sub>	metileno
CH <sub>3</sub>	metilo
C.C.F.	Cromatografía de capa fina
cm	centímetro
COSY <sup>1</sup> H – <sup>1</sup> H	Correlación protón – protón
δ	desplazamiento químico expresado en ppm relativo al TMS
d	doblete
dd	doble doblete
DEPT	distorsiones encadenadas por transferencia de polarización
φ	Diametro interno

EIMS	Espectrometría de masas de impacto electrónico
FA	Fracción acuosa
FB	Fracción de <i>n</i> -Butanol
FCM	Fracción de cloruro de metileno
FH	Fracción de hexano
FM	Fase móvil
g	gramo
<sup>1</sup> H	Protón
H <sup>#</sup>	Asignación numérica para protón
AcOH	Acido acético
HMBC	Correlación Carbono - Protón larga distancia
HMQC	Correlación directa carbono – protón
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (resolución)
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50% de las células evaluadas
<i>J<sub>a</sub></i>	Constante de acoplamiento
JMOD	Experimento <i>J</i> modulada en <sup>13</sup> C
Km <sup>2</sup>	Kilómetro cuadrado
M	Multiplicidad
m	Multiplete
Me-OH	Metanól
µg/mL	Microgramos por mililitro
mg	miligramo
MHz	Mega Herzio

mL	mililitro
min	Minuto
m/z	Relación masa carga
N	Nitrógeno
NR	No representativa
O	Oxígeno
P	Fósforo
Pag.	Página
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
t	Triplete
UV	Ultravioleta
W	Peso

## RESUMEN

En este documento se describen los resultados del primer estudio fitoquímico del alga *Chaetomorpha californica*, perteneciente a la división chloropytas, recolectada en las localidades de Punta Soldado y Agua Dulce pertenecientes a la bahía de Buenaventura (Costa Pacífica Colombiana).

Para abordar el estudio de este organismo se procedió a realizar la extracción con metanol, el extracto generado fue sometido a extracción con diferentes solventes en orden creciente de polaridad. Así se obtuvieron, las fracciones de hexano, cloruro de metileno, *n* – butanol y acuosa.

Para definir cuales fracciones se estudiarían se analizaron los resultados que sobre actividad citotóxica se realizaron a las diferentes fracciones, observándose claramente que las fracciones de *n* – butanol y la acuosa presentaron la mayor actividad (IC<sub>50</sub> 10 y 15 µg/mL) respectivamente.

La partición de la fracción de *n* – butanol y posterior purificación por HPLC de una de las subfracciones, se aisló el compuesto que se codificó como 1, cuyos datos espectroscópicos permiten deducir que se trata del nucleosido adenosina.



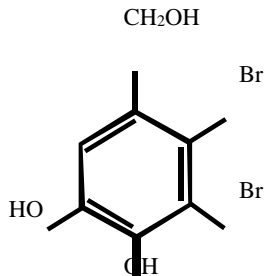
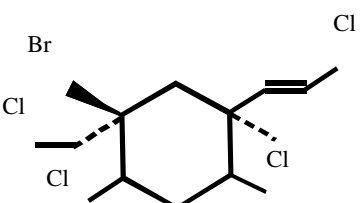
De igual forma de la fracción acuosa se logra purificar el compuesto denominado como FA5-6, la estructura propuesta corresponde al disacárido  $\alpha$  - D - Glucopiranosil - (1 $\rightarrow$ 4) -  $\alpha$  - D - Glucopiranososa, de acuerdo con el análisis de los espectros de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ , HMQC, HMBC).

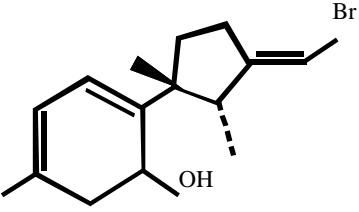
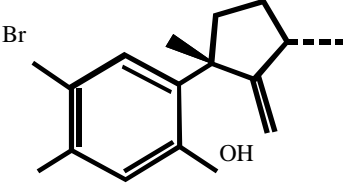
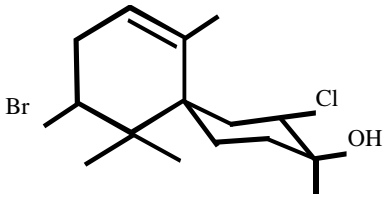
## BIBLIOGRAFIA ANTIGUA

(Cameron, et al. 1967; Irie, et al. 1966; Crew, et al. 1984; San Martin, et al. 1986; San Martin, et al. 1991)(**ver cuadro 1**).

(Perez, R. 1992). (Naylor, J. 1976), (Carté, B. 1996) , (Radmer, R. 1996; Ballesteros, et al. 1992), (Naylor, J. 1976). (Gerwick, et al. 1981; Bouaïcha, Et al. 1993), (Peña, et al. 1987; Peña, et al. 1988; Bula, et al. 1982), (Carté, B. 1996). (Ballesteros, et al. 1992), (Lara, G. 1995). (Lara, G. 1995). (departamento de Biología Marina. Ospina. A, 1997, Triantor (1978), (Whittaker, 1969), (Dawes, 1996), (Prahl et al.1990), (Thom.1982),

**CUADRO 1. Monoterpenos, Sesquiterpenos, Fenoles bromados de algas rojas.**

NOMBRE	ESTRUCTURA	ORGANISMO
Lanosol		<p><i>Polysiphonia lanosa</i>  <i>Odonthalia pentate</i>  <i>Cystoclonium purpureum</i></p>
Violacene		<p><i>Plocamium cartilagineum</i></p>

<b>Laurenisol</b>		<i>Laurencia nipponice</i>
<b>Isolaurintirol</b>		<i>Laurencia intermedia</i>
<b>Glanduliferol</b>		<i>Laurencia intermedia</i>

## INTRODUCCIÓN

La estabilidad de todos los ecosistemas está influenciada por los procesos biológicos en el mar. Dentro de dichos procesos está el que realizan las algas, que capturan dióxido de carbono de la atmósfera y lo convierten en biomasa; también están, los microorganismos

que transforman o degradan los nutrientes provenientes de los organismos muertos y detritus; así, el crecimiento de microorganismos y demás animales, la proliferación de la fauna marina y la luz solar, intervienen en los diferentes procesos biológicos que dan lugar a una interacción de las partes y transformación de la energía (Perez, R. 1992).

debido a características definidas preliminarmente como actividad citotóxica en cuanto el género reportada, rendimiento de extracción, facilidad de recolección e identificación.

## INTRODUCCIÓN

Aunque en Colombia se han estudiado diferentes extractos naturales derivados de plantas y animales terrestres, sólo hasta hace poco se inicio el estudio de organismos marinos, en especial las algas<sup>1</sup>, una fuente prometedora de nuevas moléculas con diferentes potenciales como abonos, aditivos para comida, material adhesivo, follaje y en especial en el campo farmacológico.

Las algas al igual que los demás organismos marinos son fuente promisoría de gran diversidad de nutrientes<sup>2</sup>. Comportandose como máquinas de almacenamiento eficiente de sustancias químicas; además porque están obligadas a sintetizar poderosas toxinas que utilizan en su defensa, frente a los predadores<sup>3</sup>.

Los adelantos tecnológicos han significado también un aumento de la exploración del mundo marino. En este punto, se ha veneficiado el muestreo y aislamiento de metabolitos por diferentes técnicas de separación, desde la cromatografía de capa fina

---

<sup>1</sup> BEJARANO, Adriana. Aporte de biomasa y detritus de las macroalgas bentónicas al ecosistema del manglar. Santiago de Cali, 1997., p. 95. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Sección de Biología Marina.

<sup>2</sup> UGARTE, Javier. Algas marinas: usos y biotecnología. España: Facultad de ciencias universitarias. Universidad de A Coruña. 2000. p. 17.

<sup>3</sup> LARA, German et al. Screening for toxic activity of some marine Benthic algae. En : food adition contamination. Tokyo : vol. 12, no. 3 (1995); p.485-490.

hasta la sofisticada cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permitiendo separar y purificar con eficiencia los productos naturales de interés. También se suma el perfeccionamiento de las técnicas espectroscópicas que permiten elucidar estructuralmente compuestos con cantidades mínimas de muestra, por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de masas (MS).

De otro lado, considerando que el desarrollo de nuevas investigaciones sobre algas marinas conduce al aislamiento e identificación de nuevos compuestos que podrían tener potencialidad en el campo farmacológico y constituirse en alternativas, para el tratamiento de diversas enfermedades. En este trabajo se aborda el estudio químico del alga marina *Chaetomorpha californica*, recolectada en las localidades de Punta Soldado y Agua Dulce (Bahía de Buenaventura). El extracto metanólico del alga se trabajó con cuatro solventes en orden creciente de polaridad, obteniéndose las fracciones en hexano, cloruro de metileno, *n* – butanol y acuosa.

Las fracciones de *n* – butanol y acuosa fueron seleccionadas para su purificación, con base en la actividad inhibitoria que demostraron en los ensayos pertinentes.

En una de las subfracciones de *n* – butanol codificada como **FB6**, se encontró el nucleósido adenosina (**1**), identificado por técnicas de espectroscopía RMN y masas.

De forma similar, en la fracción acuosa se encontró el compuesto  $\alpha$  - D - Glucopiranosil - (1  $\rightarrow$  4) -  $\alpha$  - D - glucopiranososa codificado como FA5-6, e identificado completamente por espectroscopía de RMN y de masas.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta el momento de efectuar este trabajo no se han realizado estudios sobre algas marinas en la Costa Pacífica en el Departamento del Cauca. En vista de ello y por la gran biodiversidad del medio, se consideró necesario iniciar investigaciones para encontrar nuevos organismos y/o metabolitos potencialmente útiles.

Los reportes que existen en el ámbito mundial sobre utilidad de este tipo de metabolitos son crecientes, lo cual se demuestra con la radicación de aproximadamente 200 solicitudes de patente en el periodo comprendido entre 1969 – 1993 para productos naturales de origen marino y de los cuales aproximadamente la mitad caen entre los compuestos con actividad antitumoral / antiviral. De estos compuestos patentados, 75 provienen de cordados (ascidias), 10 de moluscos, 4 de hemicordados y 3 de briozoos.

Recientemente se están encaminando esfuerzos para recopilar la información que sobre algas existe y que han presentado actividad similar a la descrita por otro tipo de organismos marinos<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Bongiorni, L. ; Pietra, F. Chemistry and Industry.1996, 15 Jan. p. 54



Nuestro país tampoco es ajeno a la explotación racional que se puede lograr en nuestras costas. Teniendo en cuenta la gran biodiversidad de la Costa Pacífica Colombiana, en flora algológica derivada del estudio de este tipo de especies<sup>5</sup>.

Particular relevancia tiene el trabajo realizado sobre la actividad antibiótica descrita para los extractos acetonicos en 18 especies de algas recolectadas en la costa de Michoacán (México). Una de estas algas corresponde a *Chaetomorpha antenina* y la cual presenta un halo de inhibición de 12 mm sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*<sup>6</sup>. En este genero también se ha descrito actividad citotóxica y antiviral<sup>7</sup>. Nuestro trabajo es el primer estudio fitoquímico sobre alga *Chaetomorpha californica* que se realiza en Colombia, y sobre el de la actividad biológica del alga y el potencial agroindustrial derivado de los productos que sean aislados. Se concentró en la separación y análisis espectroscópico, de los extractos de n – butanol y acuoso del alga marina *Chaetomorpha californica*, con el fin de identificar los compuestos aislados.

---

<sup>5</sup> COLMENARES, Ana y PEÑA, Enrique. Flora algológica en la bahía de Buenaventura, costa Pacífica Colombiana. Un recurso potencial aprovechable. En : I CONGRESO NACIONAL SOBRE ODIVERSIDAD. (2º Ed. : 1994 : Cali). Memorias del I congreso nacional sobre biodiversidad. Cali, 1994.

<sup>6</sup> LOZANO, Carlos et. al. Actividad antibacteriana de alga marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano [online]. 1ª ed. México: Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapala. Departamento de hidrobiología, Laboratorio de Ficología. 2000

<sup>7</sup> CARBOT, Andréu et al. Algas marinas del parque nacional morrocoy: usos en el diagnostico y terapéutica. Venezuela: universidad de los andes, 2000. p. 83.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar el estudio fitoquímico preliminar de las fracciones butanólica y acuosa del alga *Chaetomorpha californica*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar los metabolitos presentes en la fracción de *n*-butanol y acuosa del alga *Chaetomorpha californica*.
- Caracterizar espectroscópicamente los metabolitos aislados de las fracciones *n* – butanólica y acuosa del alga *Chaetomorpha californica*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 ALGAS

El término *alga* agrupa diversas divisiones del reino vegetal que comprende a plantas simples, sin raíces, tallo y hojas; además, carecen de tejidos especializados conductores de agua; presentan cuerpos unicelulares, coloniales, filamentosos o taloides, de aquí su nombre talofita<sup>8</sup>. En su mayoría efectúan fotosíntesis, contienen clorofila *a* y carotenoides, poseen estructuras reproductoras simples. Son especies autótrofas que viven en aguas dulces o saladas, y también en hábitat húmedo sobre la tierra, nieve o sobre las arenas del desierto. El mayor desarrollo y diversidad de estos organismos se observa en el hábitat marino, donde viven dos tipos de situaciones muy distintas; una flotando en la superficie del agua, son unicelulares y se las conoce con el nombre de algas planctónicas. En la otra, viven adheridas a las rocas o a los árboles de los manglares y se las conoce con el nombre de algas bentónicas<sup>9</sup>.

Las algas pertenecen a las formas menos evolucionadas del reino vegetal protista. Varían en tamaño, y van desde las formas unicelulares microscópicas hasta las grandes algas marinas multicelulares macroscópicas. Todas tienen órganos

---

<sup>8</sup> COPUL, Magaña. Relatos de la vida silvestre y del ambiente natural de Bahía Banderas. Jalisco : centro universitario de la costa, 2000. p. 121

<sup>9</sup> MENDOZA, Manuel. Las macroalgas marinas bénticas de la Argentina. En: Ciencia hoy. Argentina: Vol. 9, no. 50 (ene. – feb. 1999); p. 40 – 49.

reproductores unicelulares (si son multicelulares, todas las células del órgano reproductor son fértiles), carecen de muchas estructuras vegetales (cutícula, cubierta cerosa, gametangios multicelulares, entre otras), razón por la cual se diferencian de las plantas superiores<sup>10</sup>.

En términos globales la fotosíntesis es el proceso inverso de la combustión. En este la combinación de bióxido de carbono y agua nos da materia orgánica, dejando en libertad el oxígeno. Las algas tienen un papel significativo en este ciclo compensatorio. La constitución química de ellas varía según las estaciones y los factores climáticos regionales. Gracias a su composición se ha logrado aislar e identificar compuestos químicos de estos organismos, tales como fibra cruda y ácidos grasos (palmítico, esteárico, mirístico y oleico) además de micro concentraciones de arsénico y azufre. En estado natural las algas contienen en el talo una cantidad de agua que varía de un 70 a un 80% del peso total; el resto corresponde a materia seca, constituida por sales minerales y compuestos orgánicos como el almidón sintetizados a partir de agua, aire y luz suficiente. Los carbohidratos varían en concentración mucho más que los componentes inorgánicos según la estación, las proteínas que varían de igual forma con las estaciones del año, el estado metabólico de cada especie y según la región donde habitan y en general casi todos los complejos vitamínicos

---

<sup>10</sup> LEMOS, Juan. El Océano y sus recursos. México: progreso, 1997. capítulo 10.

conocidos (A; B; C; D; E, entre otros); La concentración varía según la especie, estación del año y profundidad del hábitat<sup>11</sup>.

Para investigar sobre algas marinas, es necesario determinar su clasificación, así como sus características citológicas, morfológicas, su composición química, movilidad (tipos de flagelos y su posición), la distribución y ecología (hábitat), y finalmente la influencia de los diferentes factores que intervienen tanto en la concentración de los componentes químicos que las constituyen como en su distribución y hábitat<sup>12</sup>.

Las comunidades de algas se han clasificado de varias formas, ya sea por la formación de gametos, la composición y forma de pared celular, número y lugar de los flagelos, estructura de sus cloroplastos, o por los pigmentos que posea y el tipo de productos de almacenamiento. La clasificación más utilizada es la que tiene en cuenta el tipo de pigmentos constituyentes<sup>13</sup>.

**3.1.1 Clasificación de las algas según sus pigmentos.** Dentro de las divisiones de algas se destacan las cianofitas o algas azul-verdes que, comúnmente, agrupan individuos microscópicos, razón por la cual se les denomina microalgas. También se

---

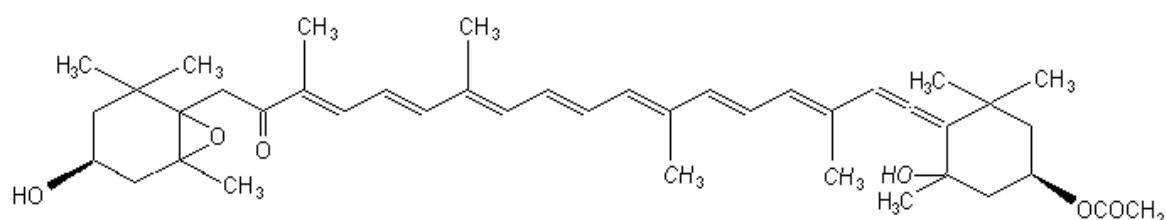
<sup>11</sup> ISEAS, Freddy et al. experiencias a campo, ficocoloides quelatados en terapéutica animal. En: M medicina Veterinaria. México: vol. 52, no. 1; (2001); p. 6.

<sup>12</sup> CANTERA, Jaime. CONTRERA, Rafael. Ecosistemas costeros. Santafé de Bogotá: Universidad Nacional, 1998. capítulo 5.

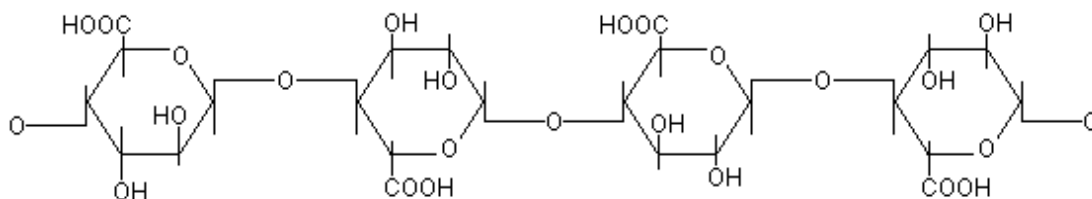
<sup>13</sup> GONZALES, Albert. Los sistemas de clasificación de los seres vivos. Madrid: akal, 1998. p. 55.

tienen las Chlorophytas o algas verdes, Phaeophytas o algas pardas y, por último, a las Rodophytas o algas rojas. Estas tres últimas divisiones incluyen organismos macroscópicos multicelulares, por lo que se les conoce con el nombre de macroalgas<sup>14</sup>.

- **Algas pardas.** Son fotosintéticas, poseen clorofila *a* y *c* además de carotenoides (fucoxantinas. Figura 1) en sus cloroplastos, y coloides (alginatos. Figura 2) en la pared de algunas de ellas.



**Figura 1.** Estructura de Fucoxantina

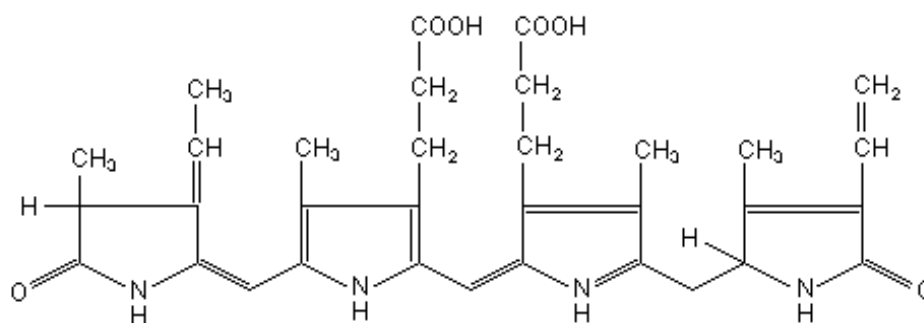


**Figura 2.** Estructura de Ácido alginico

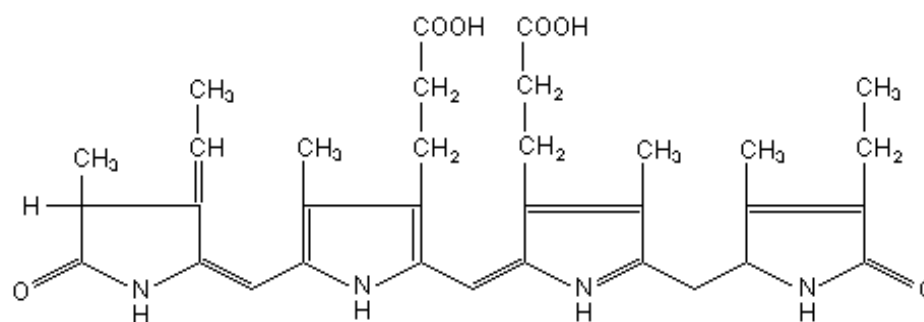
<sup>14</sup> COPUL, Op. Cit., p. 121.

Son algas eucarióticas, pluricelulares y morfológicamente muy diversificadas. Son comunes en aguas marinas frías, en especial en costas rocosas en zonas de marea, donde se pegan a través de rizoides formando bosques. Su importancia en el ámbito comercial se da especialmente a que proveen algina, polisacárido utilizado como agente espesante<sup>15</sup>.

- **Algas rojas.** Los cloroplastos de este tipo de algas contienen biliproteínas (ficoeritrina y ficocianina principalmente. Figuras 3 y 4) que contribuyen a enmascarar el color verde de la clorofila.



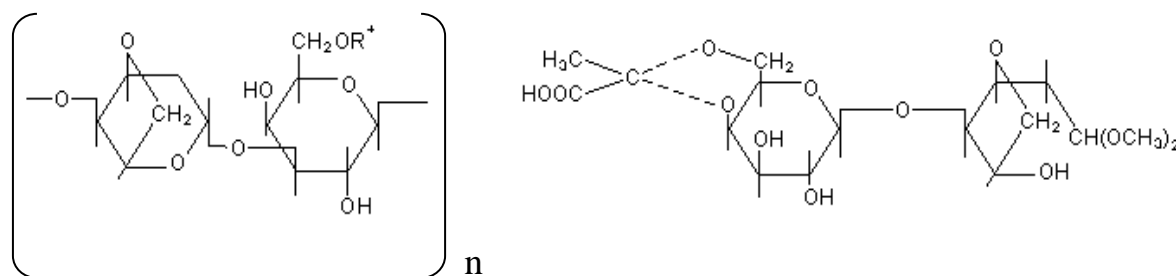
**Figura 3.** Estructura de Ficoeritrina



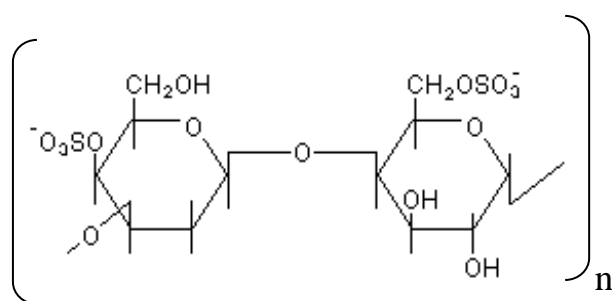
**Figura 4.** Estructura de Ficocianina

<sup>15</sup> DIAZ, Ignacio. El bosque de las laminarias. En: Espacio submarino. Argentina. (21, febrero, 2001); p. 5.

Son organismos eucarióticos, se encuentran presentes especialmente en el medio marino (mares tropicales cálidos), aunque existen muchas especies en aguas marinas muy frías y unas pocas en agua dulce y en el suelo. Constituyen el grupo más diverso entre las algas. En las paredes celulares presentan polisacáridos complejos que sirven como cemento (coloide) que cohesiona la estructura del alga. Los ficocoloides (agar y carragenatos. Figuras 5 y 6) son los principales productos de interés comercial en estas algas; adicional a esto, se suma la utilidad como fuente importante de alimento para el ser humano en algunos países orientales<sup>16</sup>.



**Figura 5.** componentes de Agar



**Figura 6.** Estructura de Carragenina

<sup>16</sup> ZARCO, Carlos. Algas rojas. Madrid: Universidad de Sevilla, 1998. capítulo. 2



- **Algas verdes.** La mayoría de algas verdes son pequeñas, unicelulares o filamentosas. Es un grupo muy heterogéneo de algas con clorofila b además de la clorofila a y una gran variedad de carotenoides. Existen aproximadamente 5,500 especies de ellas, y casi el 90 % vive en ambientes de agua dulce y el 10% restante en el hábitat marino (especialmente en aguas frías y templadas). Dado que tienen los mismos pigmentos y alimentos de reserva que las plantas superiores. Se considera en general que son las progenitoras de plantas terrestres<sup>17</sup>. Son particularmente importantes por que en ellas se han encontrado diferentes tipos de utilidad como agropecuario, alimentación humana y sistemas de regeneración ambiental entre otros. Recientemente en la industria farmacéutica, su uso a aumentado, esto debido a que se han encontrado metabolitos con actividad farmacológica diversa<sup>18</sup>. El alga *Chaetomorpha californica* pertenece a esta división; su ubicación dentro de la taxonomía general se presenta en la tabla 1.

---

<sup>17</sup> MENDOZA, Op. Cit., p. 40 – 49.

<sup>18</sup> JEREZ, José. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. En: Medio ambiente. Canarias. Islas Canarias. Vol.2, no. 9 (2000); p. 4.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del alga *Chaetomorpha californica*

<b>Clasificación</b>	<b>Característica</b>
Reino	Protista
Phylum	Chlorophyta
División	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Especie	<i>californica</i>
Sub Clase	
Orden	Cladophorales
Familia	Cladophoraceae
Género	<i>Chaetomorpha</i>

Fuente: PEREZ, Op. Cit., p. 10.

La división de Chlorophytas es quizás la clase más diversificada del reino vegetal, denominadas también clorofitos. Las características más relevantes de las algas pertenecientes a esta división se mencionan a continuación.

### 3.1.2 Características de las Chlorophytas<sup>19</sup>

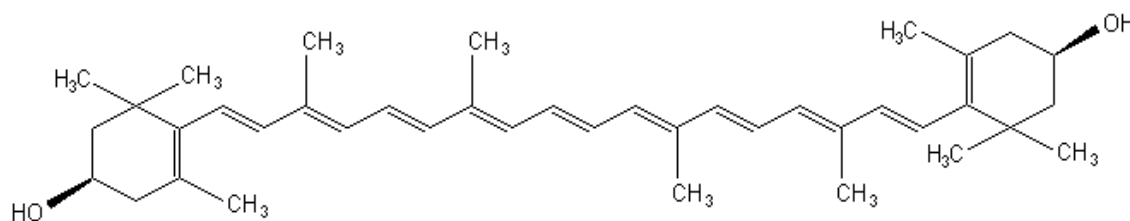
- **Estructura citológica.** La estructura celular es eucariótica; los cloroplastos tienen por lo general de tres a siete tilacoides agrupados en bandas de nueve, así como también pirenoides con gránulos de almidón periféricos. Los tilacoides pueden estar

---

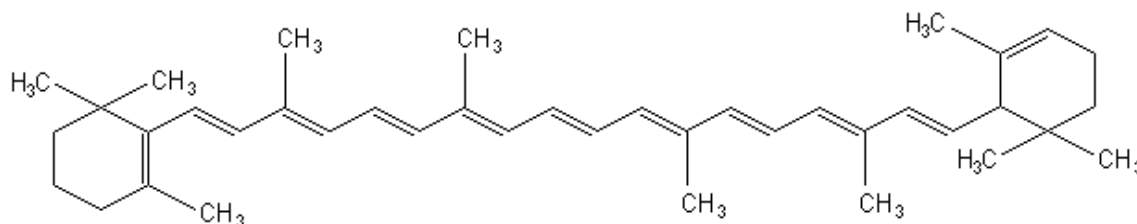
<sup>19</sup> DAWES, Clinton. *Batánica marina*. México: Limusa, 1995. p. 69.

bien organizados que se asemejan a plantas superiores. Los pirenoides constan de proteína y contiene el almidón sintetasa, enzima encargada de la producción del almidón.

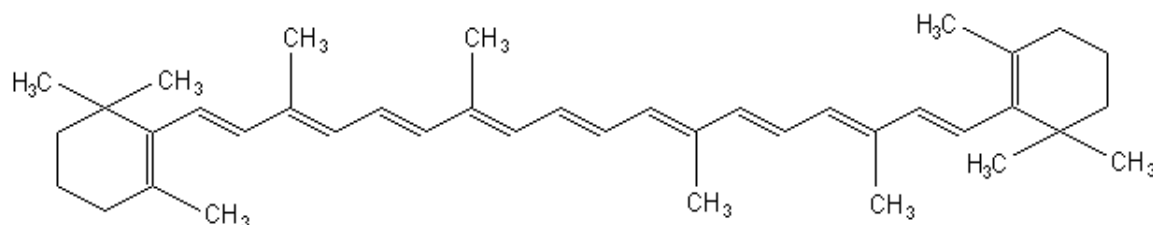
- **Pigmentos.** Estas algas poseen las clorofilas *a* y *b*, que les dan su típica coloración verde pasto. Contienen además zeaxantina (Figuras 7), los carotenos  $\alpha$  y  $\beta$  (Figuras 8 y 9), luteína, violaxantina y neoxantina. La sinfonoxantina, que es una xantófila especial, está también presente y es característica de las algas verdes cenocíticas (sifonáceas).



**Figura 7.** Estructura de Zeaxantina



**Figura 8.** Estructura de  $\alpha$  Caroteno



**Figura 9.** Estructura de  $\beta$  Caroteno

- **Movilidad.** La mayoría tienen células flageladas durante su desarrollo. En fase vegetativa, los flagelos están en pares, son acronemáticos (lisos y sin filamentos evidentes) y están fijos a la región apical de la célula. Los flagelos son de diferentes longitudes (isocontas). Las algas con huso abierto persistente, producen células móviles con flagelos insertados lateralmente y una raíz que consta de una sola banda ancha de microtúbulos. Las que tienen huso cerrado no persistente, producen células móviles con flagelos insertados anteriormente y raíces estrechas dispuestas simétricamente.

- **Pared Celular.** Para la gran mayoría, su pared está conformada por celulosa. Es de naturaleza proteínica o pectínica. El patrón de distribución de las microfibrillas de celulosa en pared celular se ha utilizado para separar grupos de algas verdes.

- **Nutrientes de Reserva.** El nutriente de reserva primario es el almidón verdadero, el cual está conformado por un polímero de glucosa no ramificado, amilosa que tiene enlace  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) y un polímero de glucosa que presenta ramificaciones con enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) y (1 $\rightarrow$ 4).

- **Morfología.** La mayoría son unicelulares o coloniales y pueden ser móviles o no. La mayoría son multinucleadas o cenocíticas (multinucleadas pero sin paredes transversales). Si el cuerpo vegetal (talo) consta de varios filamentos cenocíticos que estén en parte entrelazados, entonces la planta tiene estructura sifonosa.

- **Reproducción.** Puede ser sexual o asexual. La reproducción asexual se da por medio de zoosporas (móviles) y aplanosporas (no móviles). La reproducción sexual se da por medio de gametos móviles (isogametos, anisogametos, células huevo y células espermáticas).

- **Distribución y Ecología.** Las algas Chlorophytas multicelulares (cladoporales) que se componen de células multinucleadas, abundan en áreas submareales superiores (el 10% de *chlorophyceae* porque el resto es terrestre y de agua dulce), especialmente en aguas tropicales y subtropicales.

Las algas Chlorophytas se dividen en 3 clases principales: Prasinophyceae, Charophyceae y Chlorophyceae<sup>20</sup>.

- **Prasinophyceae.** Se caracterizan por su cubierta celular de una o más capas de escamas fibrilares, los flagelos se unen en regiones acanaladas de la célula, su raíz es microtubular, poseen un solo plasto y tienen pigmento únicos. Un ejemplo de esta clase son las pyramimonas y prasinocladus.

- **Charophyceae.** Esta clase es pequeña, su morfología es compleja; algunas especies viven en aguas salobres, se ha encontrado que controlan la presión de turgencia en la vacuola celular. Estas algas abundan en el mar Báltico.

---

<sup>20</sup> HOFFMAN, Alicia y SANTELÍAS, Bernabé. Flora marina de Chile central. Chile: Universidad católica de Chile. 1997., p. 434.

- **Chlorophyceae.** Es la clase más grande de esta división. Las especies que se incluyen en esta clase (como *Chaetomorpha californica*) poseen talos unicelulares y filamentosos, carecen de paredes divisorias, su reproducción es asexual; se presentan especialmente en agua dulce, aunque existen algunas formas terrestres y marinas.
  
- **Orden Cladophorales.** Los organismos pertenecientes a este orden se caracterizan por poseer células multinucleadas y pared de celulosa altamente cristalina. Su ciclo de vida es principalmente aplodiploide isomórfico. Éste orden se divide a su vez en familias donde las Cladophoraceae son las mas importantes.
  
- **Familia Cladophoraceae.** Las características principales que las diferencian de las demás familias son: que constan de filamentos multicelulares ramificados; las células son multinucleadas y cada una posee un solo cloroplasto reticulado (en forma de red) con muchos pirenoides.

Los géneros se separan con base en la presencia y tipo de ramificación, producción de esporas, tipo de célula basal y rizoides de fijación de la planta.

- **Genero Chaetomorpha<sup>21</sup>.** Las algas marinas pertenecientes al genero *Chaetomorpha* se caracterizan porque la mitosis es cerrada y la membrana nuclear permanece intacta durante el alineamiento y separación de los cromosomas. Esta

---

<sup>21</sup> PEREZ, Op. Cit., p. 9.

división contiene tres clases, la clase más grande es la *Chlorophyceae*, la clase *Prasinophyceae* que comprende organismos unicelulares y la clase *Charophyceae* que comprende un pequeño grupo de algas de agua salobre (de baja salinidad hasta 5 ppm). Los organismos pertenecientes a esta división presentan flagelos de igual longitud y lisos (acronemáticos). Estas algas son verdes debido a la clorofila a y b que se encuentran en las lamelas de los cloroplastos, llamadas tilacoides. Las sustancias de reserva se parecen al almidón que se encuentra en plantas superiores.

### **3.1.3 Parámetros que pueden influir en la composición de algas marinas.**

Cualquier característica del ambiente de las algas marinas puede afectar sus tasas respiratoria y fotosintética, morfología o composición. Es por eso que se debe tener en cuenta al iniciar una investigación.

- **Parámetros Físicos<sup>22</sup>.** Varios factores físicos tienen importantes papeles en la formación y continuidad de las comunidades vegetales marinas. Algunos de los más importantes son la luz, temperatura, las olas, las mareas y la corriente.

**Luz.** La luz del sol que incide sobre la superficie del océano tiene como límites de longitud de onda entre 340 nm (luz ultravioleta) hasta casi 1100 nm (luz infrarroja).

A medida que la luz penetra en el agua cristalina, ambos márgenes del espectro son

---

<sup>22</sup> RAMÍREZ, Mauricio. Distribución y composición de la flora algal asociada a ecosistema del manglar de la Costa Pacífica Colombiana. Santiago de cali, 1997., 73 p. Trabajo de grado (biólogo marino). Universidad del valle. Facultad de Ciencias. Sección de Biología Marina.

absorbidos, pero permanentemente las longitudes de onda largas. Los efectos de luz sobre las plantas marinas se dividen según las respuestas funcionales y estructurales, teniendo en cuenta la tolerancia, actividad metabólica, reproducción y distribución; ya que la mayoría de las algas tienen un límite de tolerancia a la intensidad de la luz; decolorándose a mayor intensidad y dejando de crecer a una baja intensidad de la misma. Las actividades metabólicas están relacionadas con la luz, incluyendo la producción de pigmentos, tasas fotosintéticas, movimiento (reorientación) de cloroplastos, bioluminiscencia y respuestas fototácticas. La calidad de luz y duración del día (fotoperíodo) intervienen en la reproducción.

Las respuestas estructurales de las algas a la luz comprenden en sí cambios en tamaño, diferencias morfológicas y cambios citoplásmicos. Las algas etioladas o alargadas se producen cuando se cultivan en luz tenue. El desplazamiento de los plastos se da en especies de algas profundas.

**Temperatura.** La tolerancia a los extremos de temperatura puede ser una respuesta funcional, especialmente durante los períodos de calor y frío extremos. Los procesos de fotosíntesis, respiración, crecimiento (incluyendo germinación de esporas) y reproducción son afectados por cambios de temperatura. Por lo general las algas de mayor tamaño se encuentran en latitudes más frías; en muchos casos, las concentraciones de proteínas (aleuronas) son mayores en algas de aguas frías. Las respuestas fotosintéticas a la temperatura pueden ser útiles a la hora de determinar patrones de crecimiento estacional ó para señalar las diferencias entre poblaciones, su



tasa de crecimiento difiere con la temperatura. Los cambios fisiológicos en respuesta a cambios de temperatura están controlados enzimáticamente (aloenzimas, isozimas); aunque algunas algas poseen enzimas que no funcionan o sufren alteraciones a temperaturas extremas.

**Olas.** Las olas resultan del efecto del viento sobre el agua. El viento es desviado a medida que sopla sobre el perfil de la ola, causando diferencias de presión, proporcionando energía a las olas. Otros tipos de olas comprenden las gravitacionales (mareas), geológicas (terremotos, derrumbes) y meteorológicas (tormenta).

Las olas afectan las algas marinas de varias formas: 1) las arrastran, transportándolas de un lugar a otro; 2) arrastran el sedimento, erosionando y maltratando el medio; y 3) las golpean desprendiendo sus partes. El oleaje, es uno de los factores más importantes porque causa variaciones directas en la composición de las comunidades y en la estructura ecológica. La altura de las olas, la velocidad con que llegan a la zona costera y la fuerza del impacto determinan el grado de afección para todo tipo de vida dentro del medio.

Además permite la distribución de las algas y demás organismos en los diferentes medios oceánicos en comunidades, influyendo en la formación de nuevas especies.

**Mareas.** Los movimientos verticales del mar, debidos a las mareas, determinan la cantidad de humedad que recibe cada zona de la costa ocasionando una distribución

vertical desigual (zonación). Así durante la marea alta, las zonas más altas de las costas permanecen más tiempo sin la influencia del agua marina, mientras que las zonas más bajas están cubiertas por el agua todo el tiempo, estableciéndose no solo una diferencia de humedad, sino también una diferencia en las características asociadas al agua marina y que actúan exclusivamente durante las horas de pleamar, como la salinidad, la temperatura y la acción del oleaje. Durante la bajamar, los seres vivos que habitan las zonas más altas, deben resistir el rigor de los factores climáticos como el viento, las precipitaciones y la insolación. Las algas marinas que se encuentran en áreas de corrientes mareales fuertes, la fuerza de impacto pronunciada remueve o reduce el número y tamaño de las especies de algas.

- **Parámetros Químicos**<sup>23</sup>. Existe una estrecha relación entre el agua de mar y los organismos marinos, influyendo en su fisiología y bioquímica. Es necesario entonces conocer las propiedades del agua de mar.

**Composición del agua de Mar.** La salinidad normal del agua del océano esta entre 33 y 34 ppm. Dentro de los iones inorgánicos, los seis principales (cloro, sodio, magnesio, azufre, calcio y potasio) forman el 90% del total de sal en agua de mar, y los 3 elementos menores (bromo, estroncio, y boro). Dentro de los gases que se encuentran disueltos en el agua de mar los más representativos son el nitrógeno, oxígeno y bióxido de carbono. La solubilidad de estos gases depende de 3 factores

---

<sup>23</sup> TORRES, Eduardo y KHUM, Guillermo. Factores que intervienen en la composición de la flora marina. En: toxicología. Madrid. Vol. 2, no. 5 (julio. 1998); p. 17.

principales, la temperatura, presión parcial del gas y la salinidad (concentración de sal por kilogramo de agua de mar). Respecto al bióxido de carbono es necesario tener en cuenta también las reacciones químicas.

**Nutrientes.** Los nutrientes de agua de océano, son el directo interventor en la formación de la pared celular de diatomeas. Los nutrientes necesarios y primarios para las algas y demás plantas marinas son el oxígeno, carbono, nitrógeno y fósforo, con las proporciones de 212 **O**: 106 **C**: 15 **N**: 1 **P** en agua de mar.

**Contaminación.** Los graves episodios de contaminación por diferentes vías industriales, además de proceder de fuentes naturales, vertido de materiales de desecho, excreciones animales y humanas, afectan la composición y estructura de los manglares. De la costa pacífica colombiana no se ha estimado el daño que causa la contaminación.

### **3.2 Manglares**

Los manglares son asociaciones vegetales costeras de los trópicos y subtrópicos que perteneciendo a grupos taxonómicos diferentes, tienen características comunes entre las que se destacan; una morfología que facilita el sostenimiento en sustratos inestables, una marcada tolerancia de agua salada y salobre, adaptaciones para el intercambio de gases en sustratos anaeróbicos y embriones capaces de flotar.

La interacción de ciertos factores medioambientales tales como la amplitud y rango de penetración de las mareas, composición del suelo, oferta de agua dulce, protección de la acción directa del oleaje y el acarreo de arena y flujo de nutrientes, entre otros, hace que se puedan presentar manglares con diferentes grados de desarrollo y composición específica<sup>24</sup>.

Los principales tipos de bosques para la costa Pacífica de Colombia son: los manglares de borde, los cuales se establecen sobre sustratos erosionados, normalmente en bahías protegidas o rodeando Islas con plataformas bajas. En este tipo de manglar se presenta una franja frontal con sustratos inestables, dominada por el mangle rojo, mientras que la plataforma esta dominada por el mangle piñuelo.

Los manglares ribereños que bordean los ríos o los esteros y debido al suministro continuo de nutrientes que provienen de los aportes marinos y fluviales adquieren un notable desarrollo. Este tipo de manglar es colonizado por mangle rojo, especialmente por algas del género *Rhizophora harrisonii*, con árboles que pueden alcanzar hasta 45 m de altura. Por último, los manglares de barras situados detrás de las barras, playas o dunas arenosas que actúan como trampas de sedimentos ocasionando la formación gradual de planos lodosos protegidos del oleaje en los que se fijan embriones de manglares. Otros tres tipos de manglares se han descrito en el Pacífico Colombiano

---

<sup>24</sup> ZAPATA, Jairo. Análisis comparativo de estructura y composición de un manglar de barra y otro de rivera en la Isla soldado, Buenaventura. Santiago de Cali, 1998., 5 p. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad del valle. Facultad de Ciencias. Sección de Biología Marina.

(invertidos, enanos y de islotes), pero en realidad son solamente diferentes estados de los ya mencionados<sup>25</sup>.

Los sitios específicos de estudio se localizaron en la Isla Soldado y Agua dulce, ubicadas a la entrada de la bahía de Buenaventura; se encuentra cubierta principalmente por bosque de mangle. El lado oriental de la isla presenta durante parte del ciclo de marea un pantano fangoso de múltiples esteros que favorecen la formación de manglares de rivera, mientras que los extremos norte y occidental muestran una amplia zona de barras o playas arenosas que reciben la acción continua de las olas y que permite la formación de manglares de barras en la parte interna protegida<sup>26</sup>.

### **3.3 Características espectroscópicas de metabolitos aislados de algas marinas**

Dentro de los metabolitos más comunes presentes en este tipo de organismos se destacan los carbohidratos, y principalmente los polisacáridos, este tipo de compuestos presentan señales características en los espectros de RMN <sup>1</sup>H entre 3.0 y 5 ppm, la multiplicidad con este tipo de protones es muy compleja dada la similitud química de este tipo de protones.

---

<sup>25</sup> CANTERA, Op. Cit., Tomo. 2.

<sup>26</sup> SAAVEDRA, Camilo. Algunos factores en la distribución y biomasa de las macroalgas intermareales asociadas al manglar, Pacífico Colombiano. Santiago de cali: Universidad del valle. 20001. p. 45.

En los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para este tipo de compuestos se pueden apreciar desplazamientos comprendidos entre 50 y 75 ppm; una característica adicional se manifiesta en el carbono anomérico cuyo desplazamiento químico puede estar entre 90 y 105 ppm.

Otro tipo de moléculas constitutivas de esta especie son los sesquiterpenos cuyo desplazamiento químico en RMN  $^1\text{H}$  se observa entre 1.2 y 3 ppm para los grupos metilénicos y metinos de la molécula, complementadas con las producidas por los protones vinílicos alrededor de 5ppm. Por su parte los desplazamientos químicos de los carbonos vinílicos<sup>27</sup> en RMN  $^{13}\text{C}$  se muestran entre 110 y 140 ppm.

#### 4. METODOLOGÍA

---

<sup>27</sup> LENIS, A. Nuevos furano terpenos y saponinas de origen marino con actividad citotóxica. Facultad de Ciencias .Departamento de Química fundamental. Universidad de Acoruña. España. 2000.

## **4.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL**

### **4.1.1 Área de Estudio**

La costa del Pacífico Colombiano forma parte de una gran cuenca de 80000 km<sup>2</sup>, denominada la cuenca del pacífico que incluye toda la zona costera desde el borde del mar hasta el piedemonte de la cordillera Occidental. Está comprendida entre el río Juradó y el Guáitara, afluentes del río Patía, y está limitada al oriente por el nacimiento del río San Juan, y al occidente por la desembocadura del río Mira en cabo manglares. La fase de campo del presente estudio se llevó a cabo en la Bahía de Buenaventura, localizada en la región central la costa Pacífica Colombiana entre las coordenadas 3° 53' Norte y 77° 06' Oeste, la cual presenta una forma alargada de 8 km de ancho y una profundidad que varía entre los 2 y 10 m. La región norte se caracteriza por presentar formaciones terciarias las cuales conforman acantilados separados del borde marino por planos lodosos y pequeños parches de mangle y de borde. La región sur es una zona costera baja con elevado aporte de aguas dulces provenientes de los ríos Dagua, Limones, Caimán, Potedó y Anchicayá. Presenta bosques ribereños establecidos sobre formaciones cuaternarias. Por otra parte, el alga *Chaetomorpha californica* se recolectó en los bosques de manglar (mangle rojo) de las localidades de Punta Soldado y Agua Dulce.

Este organismo crece notoriamente en forma de mechones colgados de las raíces aéreas de los árboles del mangle rojo (manglar ribereño y de borde) y esto hace fácil su recolección e identificación.

### **4.1.3 Recolección**

Para la recolección del alga se hizo una cuidadosa escogencia de la especie, con la finalidad de obtener muestras libres de lodo, de otras especies y basura; luego, se retiraron los individuos fijos a las raíces del mangle, y aproximadamente tres kilogramos se empacaron en bolsas plásticas individuales y se trasladaron a la estación de Biología Marina de la Universidad del Valle en Buenaventura.

## **4.2 TRATAMIENTO PREVIO**

### **4.2.1 Limpieza**

Consistió en lavar las algas con agua de mar y seguidamente con agua dulce. Las muestras se colocaron en baldes y se les adicionó agua de mar hasta cubrirlas, posteriormente se masajearon suavemente para retirar el lodo. Este proceso se repitió hasta que el agua salió clara. Posteriormente las muestras se pasaron a un tamiz (0.4 cm) y se volvieron a lavar con agua dulce a presión, retirando los restos de lodo, piedras, palos, hojas, basuras y otras especies. Finalmente una vez escurridas se empacaron en bolsas plásticas y se llevaron a temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  para su selección; que consistió en resuspender pequeñas cantidades de muestra en una bandeja limpia y con ayuda de pinzas para disección se retiraron todas las impurezas posibles y nuevamente se empacaron y almacenaron a temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2.2 Secado**



El material después de empacarlo en bolsas de papel manila estéril, se prensó en papel periódico estéril y se secó en un horno a 45 °C por 96 horas, luego se trituró en un molino casero esterilizado y el polvo resultante inmediatamente se envasó en frascos de vidrio estériles.

### **4.3 EXTRACCIÓN PRELIMINAR**

#### **4.3.1 Obtención del extracto bruto**

Los frascos con el material triturado se llenaron con metanol y se hicieron recambios cada 24 horas, hasta no obtener coloración significativa en el metanol. En total se hicieron cinco recambios y el extracto resultante se guardó en el frasco de vidrio a -5 °C. El extracto se filtró con papel filtro y se concentró por rotaevaporación a 50 °C, obteniéndose 6 g del extracto bruto.

#### **4.3.2 Fraccionamiento del extracto metanólico obtenido**

Para el proceso de fraccionamiento, se recurrió al sistema de Kupcham modificado<sup>28</sup>, que consiste en emplear diferentes solventes con incremento de la polaridad. Inicialmente el extracto metanólico obtenido se solubilizó en 300 mL de una solución metanol/agua al 10%, esta solución se extrajo dos veces con hexano (300 mL cada vez) como es ilustra en el Esquema 1. Después de separar las fases, se concentró la fracción de hexano (FH). La fracción remanente metanol/agua al 10% restante diluyó

---

<sup>28</sup> PRIETO, Rosa maría. Nuevos brianos de la *Gorgonia Briareum* sp y sesecoesteroides con actividad citotóxica procedentes del coral blando *sinular* sp. Departamento de Química fundamental e Industrial. Universidad de A Coruña. 1996. P. 44.

mediante adición de agua hasta obtener una relación metanol/agua 40%. La nueva mezcla obtenida se extrajo dos veces con volúmenes de 400 mL de cloruro de metileno, la fracción de cloruro de metileno (FCM) se separó y concentró y a su fracción remanente (metanol/agua al 40%) se le eliminó el metanol por rotaevaporación, generándose la fracción acuosa, la cual fué sometida a una extracción con *n*-butanol (previamente saturado con agua). Esta operación se realizó dos veces, empleando 300 mL del alcohol en cada una. Con esto se generaron dos fracciones, la acuosa (FA) y la *n*-butanólica (FB). El procedimiento se representa en el Esquema 1. Todas las fracciones obtenidas son llevadas a sequedad, guardadas al vacío y refrigeradas (temperatura de -5 °C).

El 96% de rendimiento en la extracción se determinó considerando los gramos iniciales de masa seca (6 g) como el cien por ciento o valor teórico y la suma de los gramos obtenidos en cada una de las fracciones FH (W= 2.06 g), FCM (W= 1.97 g), FA (W= 1.33 g) y FB (0.4 g) como el valor real.

**Esquema 1.** Fraccionamiento del extracto metanólico

En cada fracción se evaluó la citotoxicidad sobre células tumorales Kb (células tumorales bucales humanas) y P338 (líneas celulares de linfoma de ratón). Los ensayos fueron realizados en los laboratorios de BIOMAR en Santiago de Compostela España (ver tabla 2).

En la determinación de la actividad citotóxica se tuvo como referencia los valores fijados por el Instituto Nacional contra el cáncer (NCI), considerando que un extracto es activo si presenta un IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria) inferior a 15 µg/mL y un compuesto puro como activo si IC<sub>50</sub> es inferior a 4 µg/mL.

**Tabla 2.** Actividad citotóxica de las fracciones

<b>Fracción</b>	<b>FH</b>	<b>FCM</b>	<b>FA</b>	<b>FB</b>
<b>Actividad citotóxica (IC<sub>50</sub>, µg/mL)</b>	NR*	20	15	10

\* NR: No representativa

Estos resultados sobre la actividad citotóxica de las diferentes fracciones analizadas, indican baja actividad en las fracciones de hexano y cloruro de metileno, y una leve actividad de la fracción acuosa y butanólica.

De igual modo se realizaron espectros RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de cada una de las fracciones utilizando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) para FH y FCM, y metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) para las fracciones de FA y FB, esto con el fin de obtener una aproximación sobre actividad de las sustancias que se encuentran en cada una de las fracciones. Debe señalarse que todos los espectros corresponden a mezclas, y por ello la complejidad en algunos de ellos. Del análisis de estos espectros se concluyó lo siguiente:

- Fracción de Hexano (FH)

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 10) de esta fracción se observan señales entre 135 – 120 ppm que podrían corresponder a los carbonos vinílicos de un sistema terpénico, al mismo tiempo, las señales a campo alto corresponderían a carbonos metilénicos y metínicos. Por el contrario no se observa el carbono carbonílico de ácido graso característico en este tipo de fracciones, probablemente por la baja relajación de este elemento.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 11) de esta fracción se aprecian señales entre 3.0 – 1.5 ppm características del sistema metilénico presente en una estructura terpénica<sup>29</sup>. También en este espectro se evidenciaron protones vinílicos a 5.2 ppm.

---

<sup>29</sup> Ibid. LENIS, A. Nuevos furano terpenos y saponinas de origen marino con actividad citotóxica. Facultad de Ciencias .Departamento de Química fundamental. Universidad de Acoruña. España. 2000.

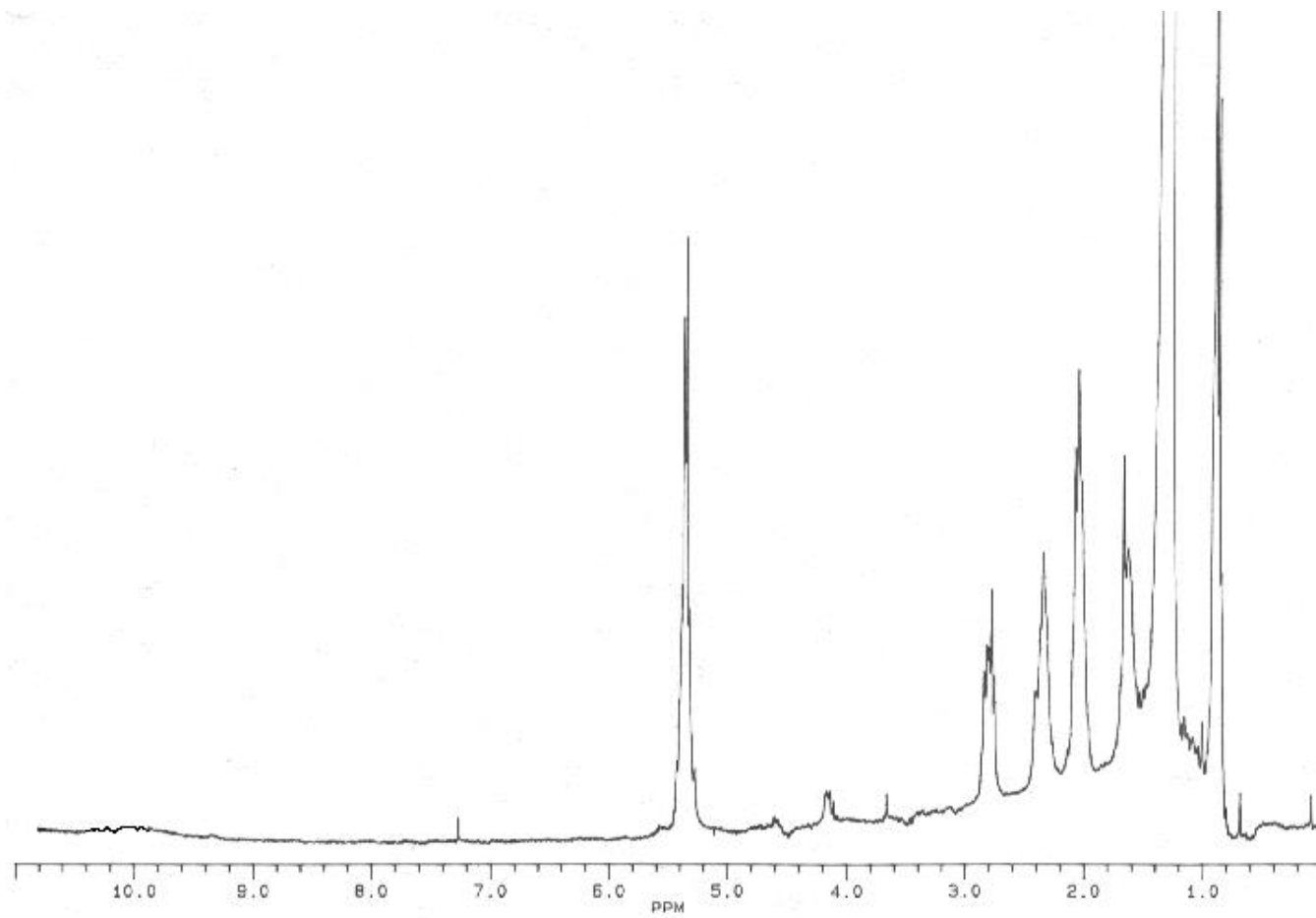


- Fracción de Cloruro de Metileno (FCM)

En esta fracción se observa con mayor claridad la presencia en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) la señal característica de ácido graso a 173 ppm de grupo carbonilo, entre 135 – 120 ppm carbonos vinílicos, igualmente carbonos metilénicos y metílicos comprendidos entre 40 – 14 ppm.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13) para esta fracción es muy similar al observado en la fracción de hexano. A campo bajo se observa una señal (5.40 ppm) que puede pertenecer a protones vinílicos.





**Figura 11.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de Fracción de hexano, disolvente  $\text{CDCl}_3$

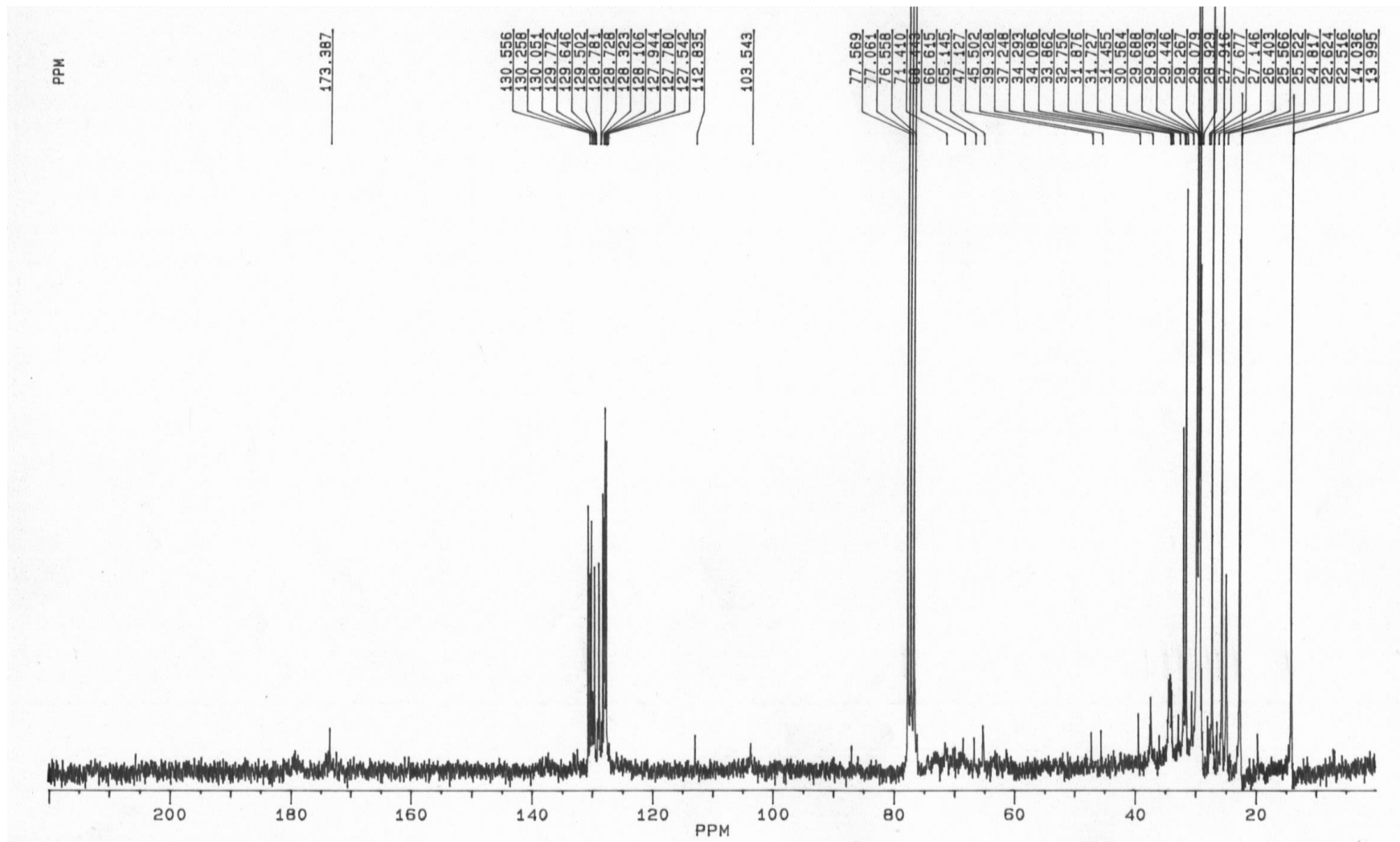
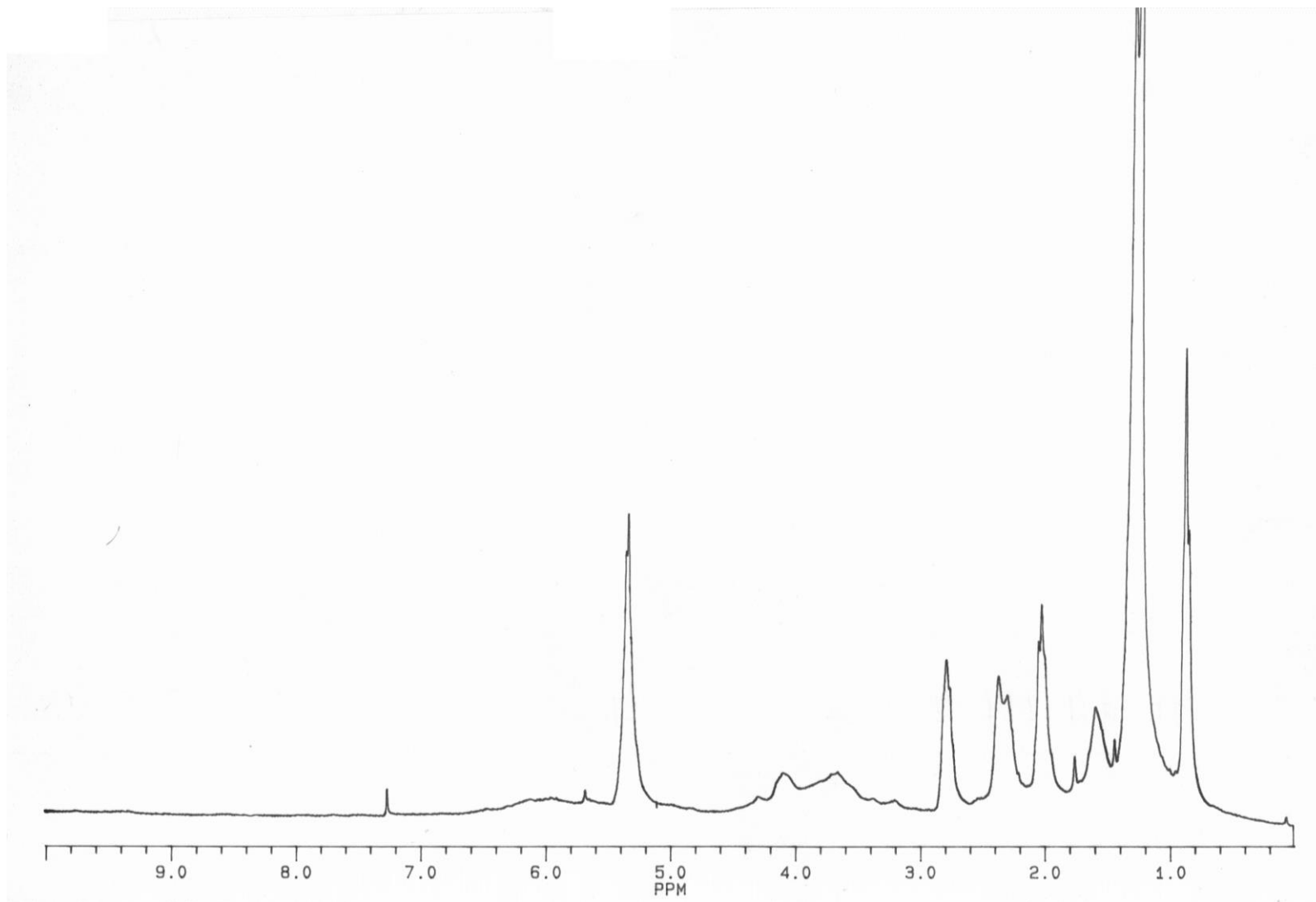


Figura 12. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de Fracción de cloruro de metileno, disolvente  $\text{CDCl}_3$

\* Fracción Acuosa

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 14) se aprecian las señales comprendidas entre 80 y 60 ppm que son características de un sistema polihidroxiado. Igualmente otras dos señales a 104.14 y 99.4 ppm están involucradas en este sistema.

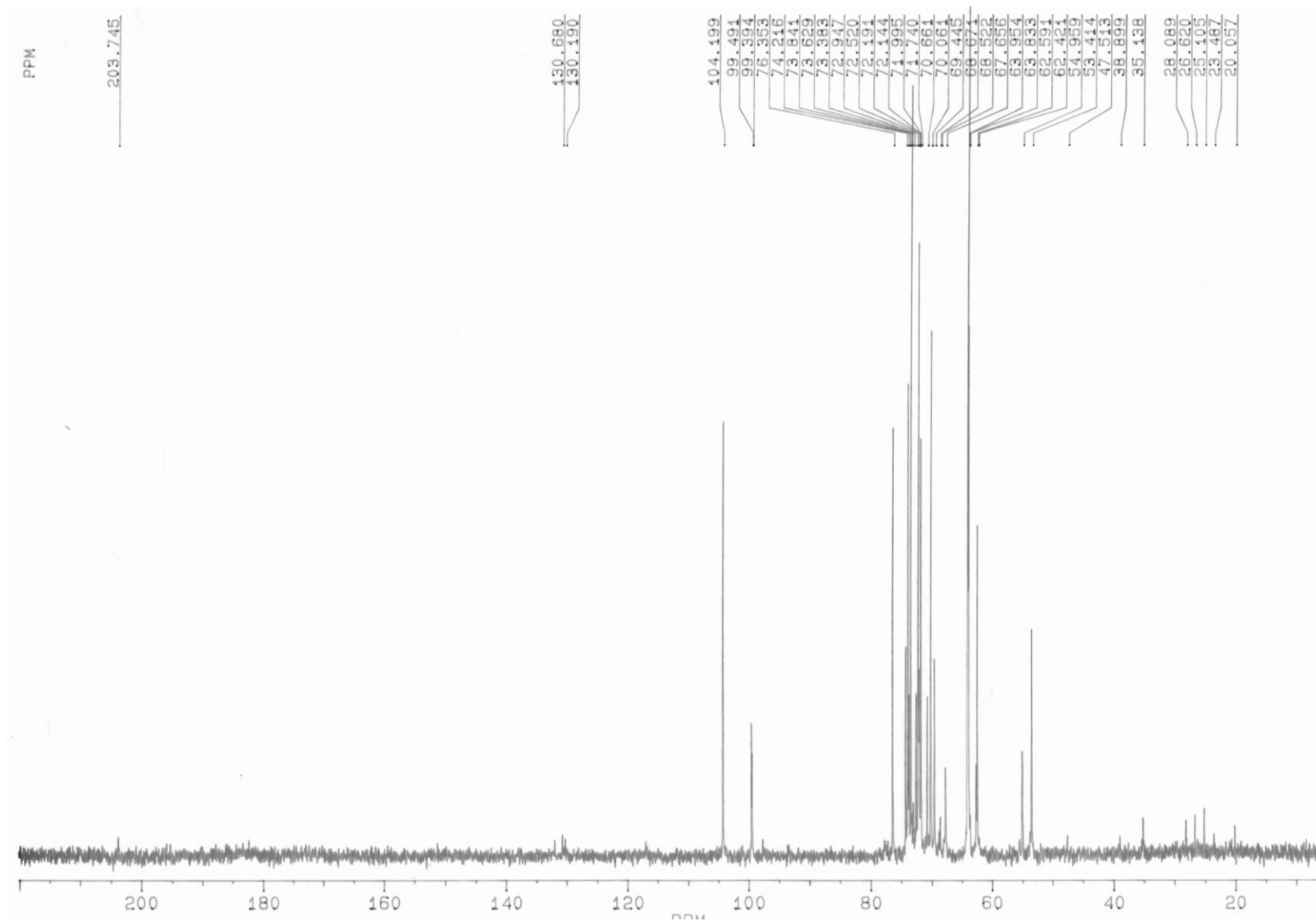
En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 15) de esta fracción se confirma la presencia del sistema polihidroxiado observado en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Apreciándose señales entre 4.0 y 3.0 ppm, características de un sistema de esta naturaleza<sup>30</sup>. También se visualiza la presencia de un protón anomérico cerca de 5.0 ppm.



**Figura 13.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de Fracción de cloruro de metileno, disolvente  $\text{CDCl}_3$

---

<sup>30</sup> BOCK, Klaus and PEDERSEN, Christian: Advances in carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Vol. 41. department of Organic Chemistry, University of Denmark.



**Figura 14.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de Fracción Acuosa, disolvente  $\text{CD}_3\text{OD}$

\* Fracción de *n* – Butanol (FB)

Se observa claramente en el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 16) la presencia de los siguientes grupos funcionales<sup>31</sup>. A 175.8 ppm grupo carbonilo, a 105.1 y 100.1 ppm dobles enlaces debidos a carbonos vinílicos, igualmente a campo bajo se observa carbonos metilénicos y metílicos.

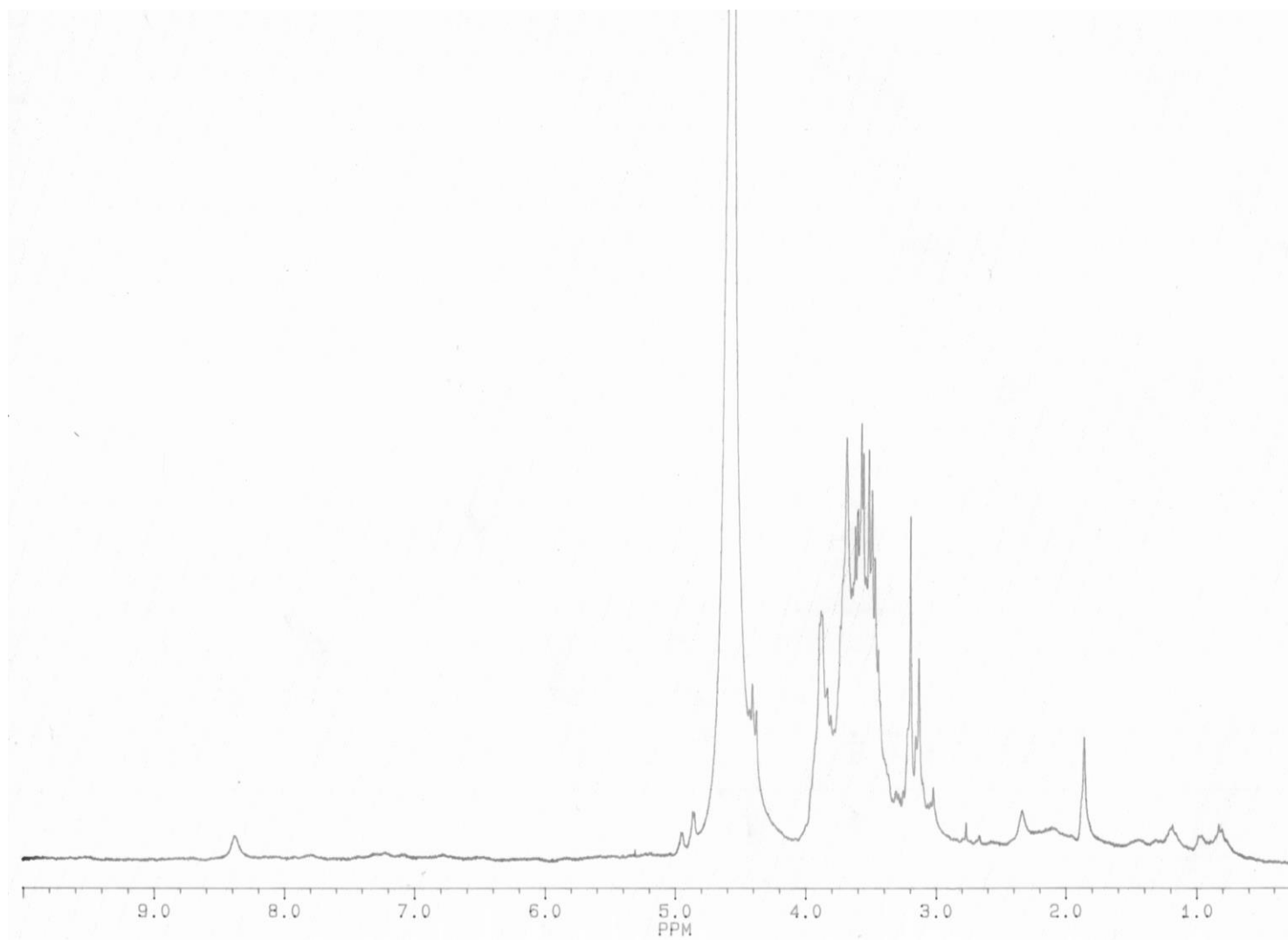
El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 17) es el más complejo con relación a los obtenidos de las otras fracciones, pero se deja entrever la presencia de un sistema polihidroxiado<sup>32</sup> entre 4.5 y 3.0 ppm.

Debe señalarse que una de las características en la fracción de *n* – butanol procedente de organismos marinos generalmente es la presencia de aminoácidos libres y nucleósidos entre otros; estos claramente proceden de los procesos metabólicos desarrollados por estos organismos.

---

<sup>31</sup> BREITMAIER, Eberhard. Carbon – 13 NMR Spectroscopy. Ed. VCH. Alemania. 1987. p. 379 - 423

<sup>32</sup>ChemDraw Ultra 6 [CD - ROM]. [Cambridge, MA]: Cambridge soft corporation, 2000.U.S.A



**Figura 15.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de Fracción Acuosa, disolvente  $\text{CD}_3\text{OD}$



### 4.3.3 Obtención de subfracciones

Teniendo en cuenta el criterio de la actividad citotóxica antes mencionado para las fracciones de hexano, cloruro de metileno, acuosa y *n* - butanol, se decidió el estudio de estas dos últimas ya que los valores obtenidos están en el rango fijados por el NCI (Instituto Nacional contra el cancer) como positivo para esta actividad.

La fracción FB (400 mg), se hizo pasar por una columna Sephaex LH 20 (3.6 cm  $\phi$  x 52 cm L), empleando como eluente metanol/agua (8:2), obteniéndose ocho subfracciones las cuales se agrupan de acuerdo con lo observado en cromatografía de capa fina (eluente: butanol, ácido acético, agua, 12:3:5 y revelante: Lieberman). En la tabla 3 se relacionan las fracciones y los pesos.

**Tabla 3.** Subfracciones de la fracción FB

Código	Peso (mg)	Código	Peso (mg)
FB1	36	FB5	7
FB2	6.4	FB6	62
FB3	32.5	FB7	39
FB4	13	FB8	11

Cada subfracción se analizó por cromatografía de capa delgada (C.C.D) y revelado con lámpara de luz ultravioleta, posteriormente se purificaron por HPLC, aislando diferentes metabolitos. Las condiciones de inyección y de separación se describen en el esquema 2.



## 5. ANALISIS DE RESULTADOS

### 5.1 METABOLITOS AISLADOS DE LA FRACCIÓN FB

De la fracción FB se lograron separar 8 subfracciones a través de columna Sephadex LH-20 empleando la mezcla agua: metanol (8:2) como fase móvil. De estas subfracciones se separaron 14 mezclas (ver Esquema 2). El único compuesto que se logra obtener más puro procede de la purificación por HPLC de la subfracción FB6 (w = 62 mg), donde se empleo una columna Novapack C<sub>18</sub> y como fase móvil metanol/ acetonitrilo (4:6); de esta purificación se obtuvieron dos compuestos B6(1) y B6(2). Este último se obtuvo con mayor pureza al hacerlo pasar nuevamente por HPLC variando la fase móvil a metanol/ acetonitrilo (2:8), así se obtiene el compuesto más significativo que se asignó como **1** (w = 7.8 mg), presentando un tiempo de retención de 4. 419 min (Figura 18).

#### 5.1.1 Determinación estructural del compuesto 1

En la elucidación estructural del compuesto **1**, se utilizaron las técnicas espectroscópicas de masas por impacto electrónico (EIMS) y resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) y análisis en luz Ultravioleta UV.



### **5.1.2 Análisis espectroscópico del compuesto 1**

El espectro de UV fue realizado en dilución con agua destilada y presentó una absorción a 256 nm (Figura 19). Esta longitud de onda indica la presencia de dobles enlaces conjugados que posiblemente correspondan a un compuesto aromático. El ensanchamiento de la banda sugiere una superposición de líneas o quizás se deba a efectos de átomos y/o sustituyentes con carácter electrondonante.

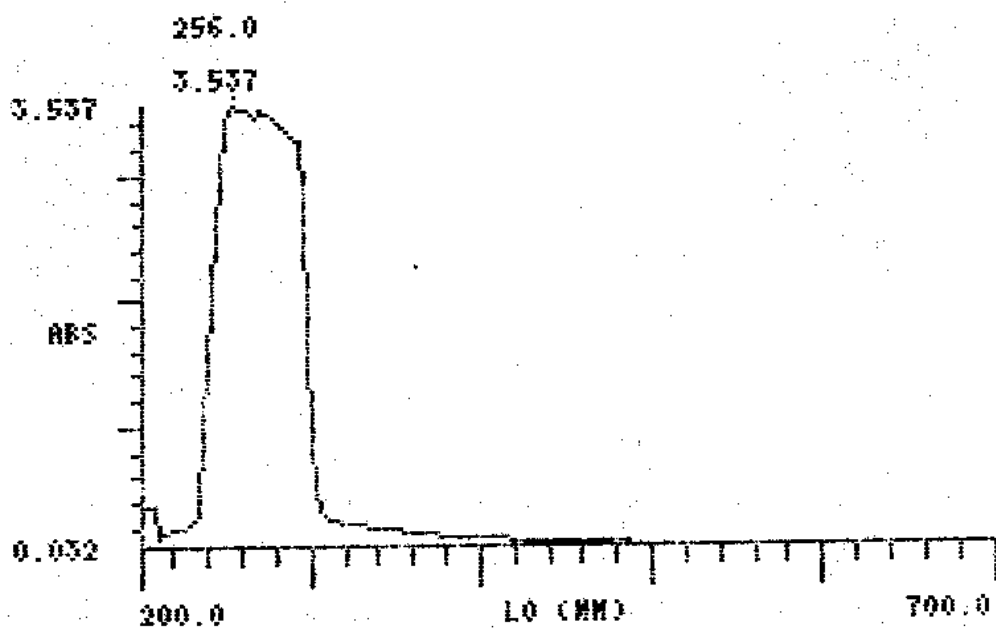


Figura 19. Espectro UV del compuesto 1

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, disolvente:  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 20) del compuesto **1**, muestra 4 señales entre  $\delta$  3.5 – 4.5 que en conjunto con la señal a  $\delta$  5.96 (típico de protón anomérico,  $J = 5.00$  Hz), indican la presencia de un sistema polihidroxilado. Igualmente a campo bajo se observan otras 2 señales a 8.15 y 8.50 ppm correspondientes a protones vinílicos. Las señales a  $\delta$  3.91 (m, 1H),  $\delta$  5.20 (t, 1H,  $J = 3.65$  Hz) y a  $\delta$  3.70 (t, 1H,  $J = 5.3$  Hz) coinciden con las absorciones de los protones H-4, H-3 y H-2 de una ribosa<sup>33</sup>. El protón de H-2 está un poco desplazado a campo bajo por la acción del sistema purínico cercano. La señal a  $\delta$  3.8 (ddd, 2H) señala la presencia de protones diastereotópicos (geminales) perteneciente a un sistema exo furanoide ( $\text{CH}_2$ ). La señal a  $\delta$  5.96 (d, 1H,  $J_a = 5.00$  Hz) es típica de protón anomérico H-1 de un azúcar de 5 carbonos. A campo bajo hay unas señales  $\delta$  8.31 (s, 1H) y  $\delta$  8.17 (s, 1H), que señalan la presencia de protones purínicos H-2 y H-8 respectivamente.

---

<sup>33</sup> [http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs\\_sea.creframe\\_sea](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.creframe_sea)

Por su parte el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (250 MHz, solvente:  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 21, Pág. 55) del compuesto **1** exhibe un total de 9 señales de carbono, las señales de los carbonos a 153.61, 133.10, 130.00, 142.9 y 154,9 ppm sugieren la presencia de un aglicon anular insaturado. Otras señales significativas a 88.21, 75.51, 72.67 y 61.55 ppm que permiten establecer la presencia de un sistema furanoide polihidroxiado, la naturaleza de las multiplicidades para cada una de estas señales se deduce por medio del experimento DEPT (Figura 22, Pág. 56). En este experimento la señal de carbono a 61.55 ppm que confirma la existencia del único carbono metilénico característico de un carbohidrato. También aparecen 8 señales que sugieren la presencia de carbonos cuaternarios y metínicos, el tipo de multiplicidad deducidas se describe en la tabla 4.

**Tabla 4.** Multiplicidades en el espectro DEPT para el compuesto **1**

$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	DEPT Multiplicidad	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	DEPT Multiplicidad	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	DEPT Multiplicidad
154.90	d	133.10	q	75.51	d
153.61	d	130.00	q	72.67	d
142.90	q	88.21	d	61.55	t

q: Carbono Cuaternario

t: Carbono Terciario

d: Carbono Primario



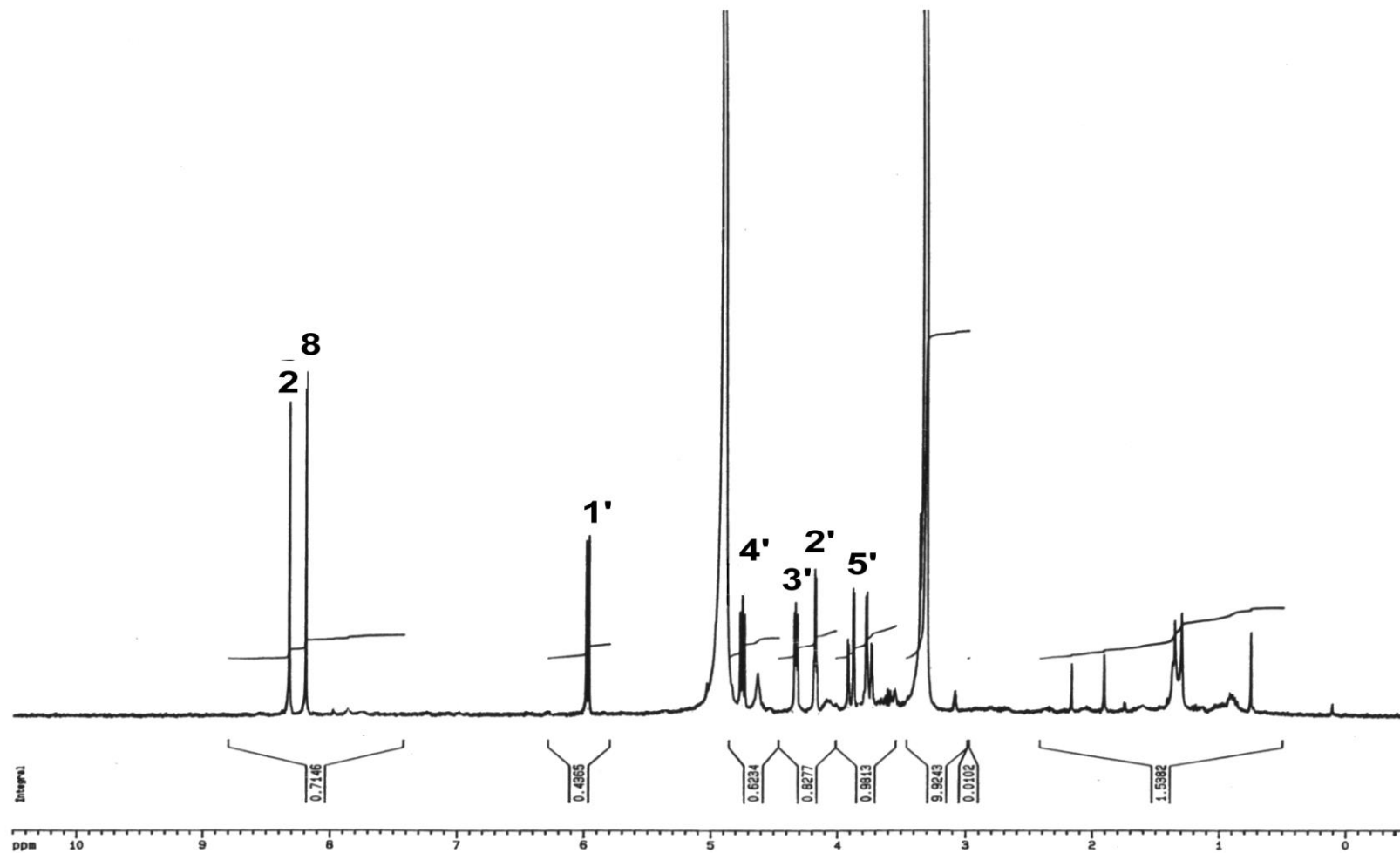


Figura 20. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 1

De otro lado, el espectro de masas por impacto electrónico (EIMS) (ver Figura 23, Pág. 58) muestra un pico base de masa 135  $m/z$  (100%), el cual presumiblemente corresponde a un sistema purínico. También fueron observados fragmentos representativos en  $m/z = 214$  (75%), 164 (45%) y 116 (24%).

Estos datos son consistentes con los descritos para el nucleósido adenosina, que aparecen en la base de datos del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial avanzada del Japón<sup>34</sup>. En el espectro de Impacto electrónico que existe en esta base se observan las señales más características con  $m/z$  135 (100%), 164 (80%), 136 (72%) y 178 (28%) que son coincidentes con las observadas por el compuesto aislado.

---

<sup>32</sup> Ibid: [http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs\\_sea.creframe\\_sea](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.creframe_sea)

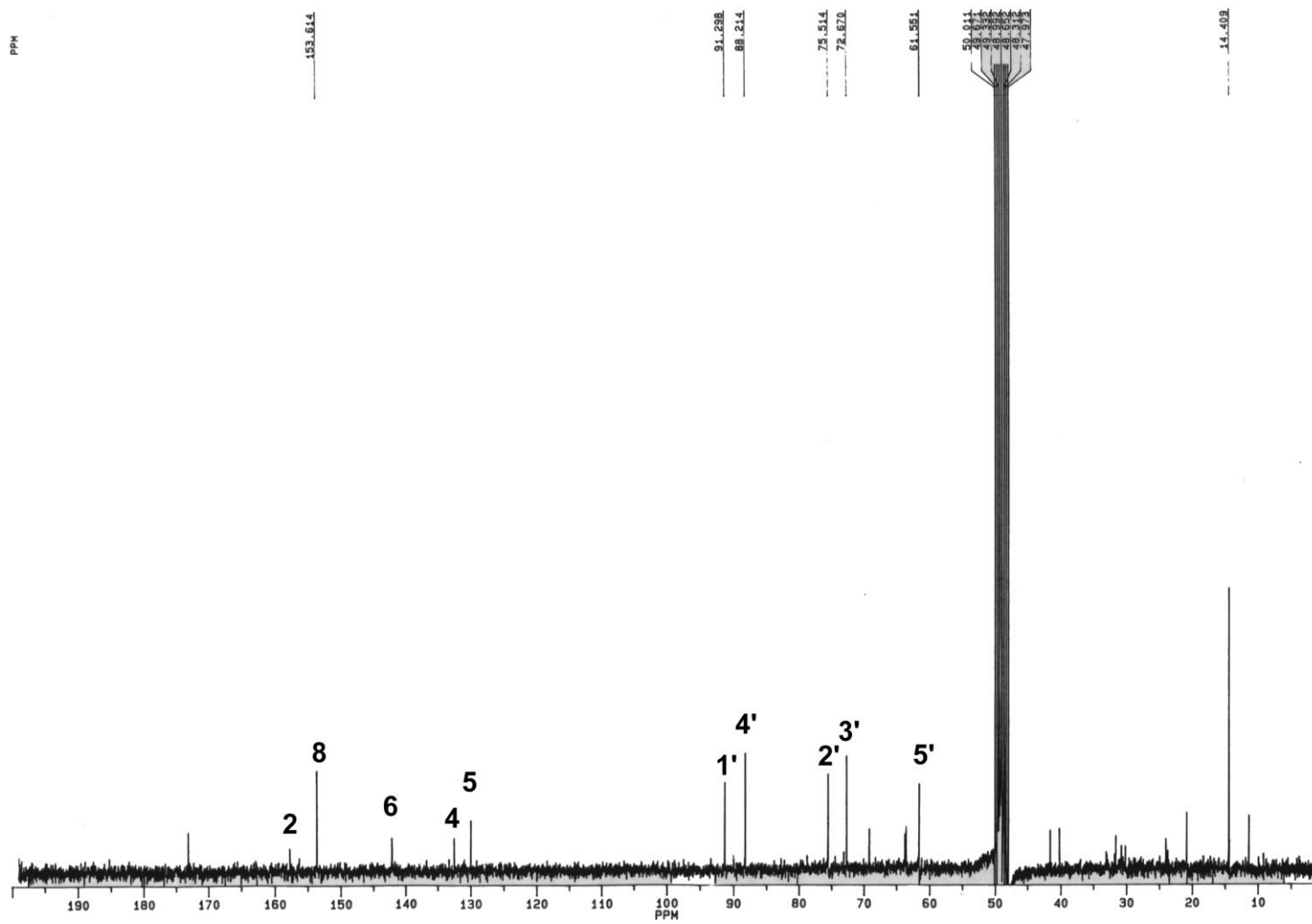
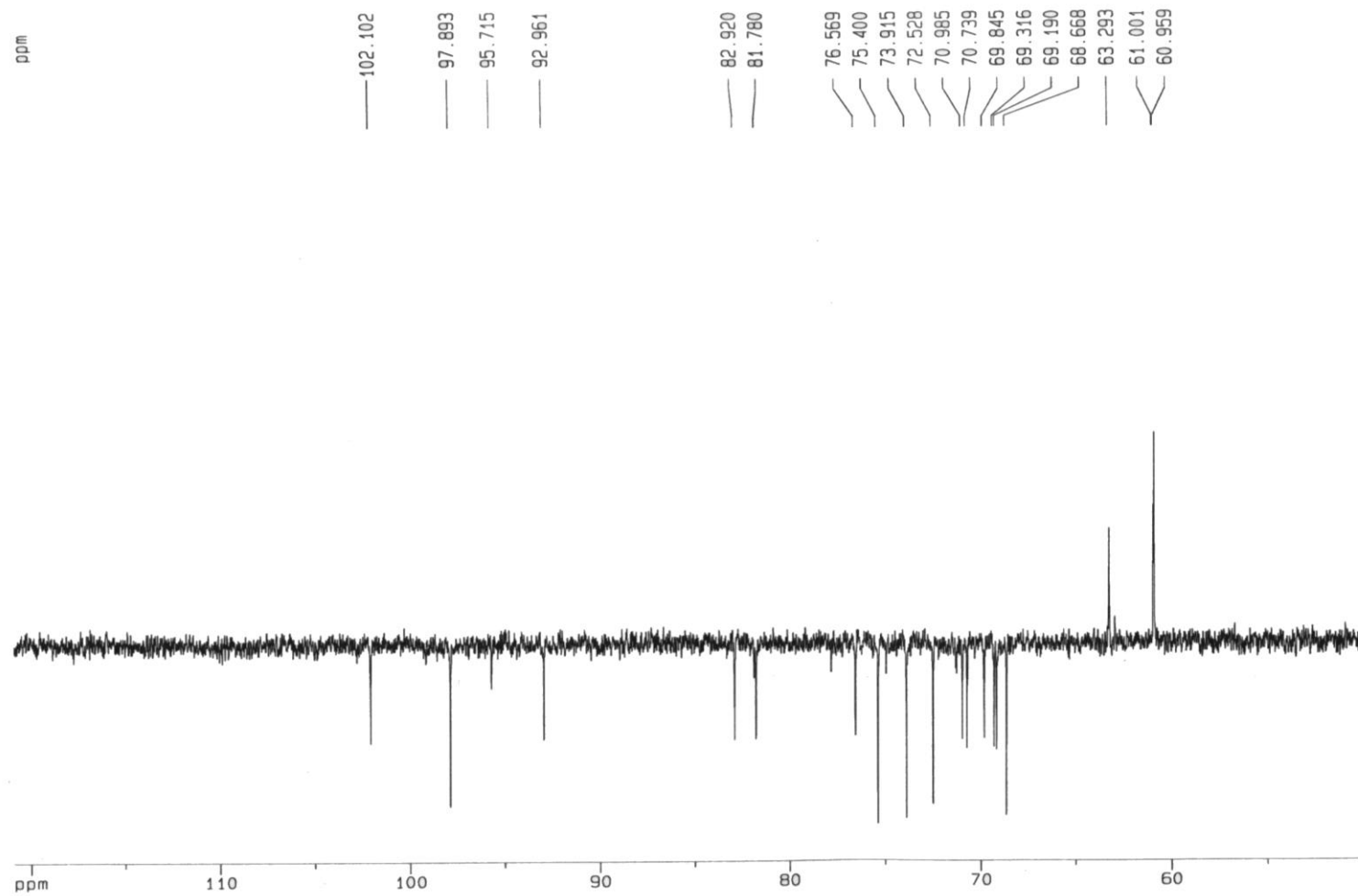


Figura 21. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1



**Figura 22.** Espectro DEPT del compuesto **1**

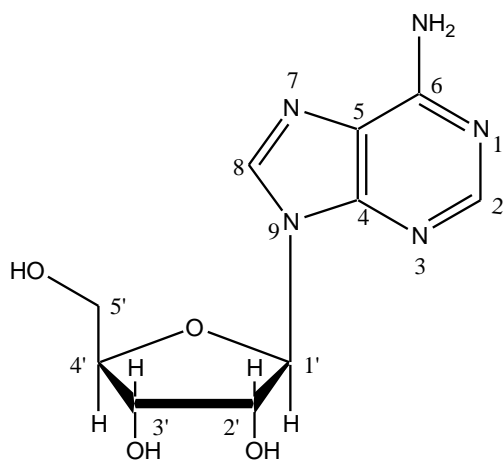
El análisis de los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como los obtenidos en el espectro de MS contrastados con los descritos en la bibliografía<sup>35</sup>, nos permiten establecer la estructura como la del nucleósido adenosina (Figura 24).

Esta comparación se recoge en la tabla 5. en ella se puede apreciar muy claramente la similitud existente entre los datos experimentales.

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para **1** y adenosina

Compuesto <b>1</b>				Adenosina		
C#	RMN $^1\text{H}$ (CD <sub>3</sub> OD)	M	RMN $^{13}\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD)	RMN $^1\text{H}$ (DMSO – d <sub>6</sub> )	RMN $^{13}\text{C}$ (D <sub>2</sub> O)	RMN $^{13}\text{C}$ (DMS – d <sub>6</sub> )
2	8.31	s	153.61	8.381	152.09	153.16
4			133.10		134.98	149.84
5			130.00		129.62	120.09
6			142.90		141.41	140.72
8	8.17	s	154.90	8.168	152.09	156.86
1'	5.985	d	92.00	5.907	88.94	88.75
2'	4.12	t	75.51	5.510	74.32	74.26
3'	4.30	t	72.67	5.240	71.09	71.41
4'	4.75	m	88.21	3.993	86.27	86.65
5'	3.80	dd	61.55	3.580	62.04	62.41

<sup>35</sup> [http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs\\_sea.creframe\\_sea](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.creframe_sea)



**Figura 24.** Estructura del nucleosido Adenosina

## 5.2 METABOLITOS AISLADOS DE FA

Con el fin de facilitar el proceso de separación de los posibles metabolitos de la fracción acuosa (382.8mg), se realizó la acetilación de 50 mg de esta fracción (seca). Los reactivos empleados son anhídrido acético (1.5 mL) y piridina (1.5 mL), el proceso duró 8 horas con agitación constante. El seguimiento se hizo por cromatografía de capa fina. El análisis de las placas cromatográficas transcurrido este tiempo indican la ausencia del producto pentaacetilado. La causa principal de la no reacción quizás sea debida a que el anhídrido acético empleado en la reacción haya estado hidrolizado. El experimento no se repitió por falta de reactivo en buenas condiciones. Ante esto se decide realizar la separación de 200 mg de la fracción acuosa a través de una columna empleando Sephadex G-25, utilizando como fase móvil: metanol/agua (6:4). El seguimiento se realizó por C.C.F, el eluyente empleado fue una mezcla de *n*-butanol/ácido acético y agua en una relación de 12:3:5 y el revelante, reactivo de Lieberman. Se obtuvieron de esta forma dos compuestos

codificados como: FA<sub>5-6</sub> (36.8 mg) y FA<sub>21-36</sub> (185.6 mg) (ver esquema 4). El proceso de purificación a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), no se pudo llevar a cabo por fallas en el equipo. El compuesto codificado como FA<sub>5-6</sub> fue sometido a análisis espectroscópico debido al mayor grado de pureza que presentó en cromatografía de capa fina.

### **Esquema 3.** Separación de fracción acuosa

### 5.2.1 Determinación estructural de FA<sub>5-6</sub>

En la elucidación estructural del compuesto FA<sub>5-6</sub>, se utilizan las técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, JMOD, COSY <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H, HMQC y HMBC).

### 5.2.2 Análisis espectroscópico de FA<sub>5-6</sub>

Se debe indicar que en los diferentes espectros realizados para este compuesto se observó la presencia de otro posible compuesto en menor proporción, por tanto en ésta propuesta estructural se tiene en cuenta la incidencia de este en el número de protones y carbonos para la estructura final.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, disolvente: DMSO) (Figura 25, Pág. 64), mostró un total de 7 señales en un rango de 3.0-5.0 ppm que sugieren la presencia de un sistema polihidroxilado. El análisis de este espectro indica que la señal a  $\delta$  4.88 integra para dos protones anoméricos cuya constante de acoplamiento ( $J= 3.6$  y  $4.0$  Hz)<sup>36</sup> corresponden con una disposición  $\infty$  para ellos. A  $\delta$  4.55 aparece una señal ancha y característica de un protón de un grupo hidroxilo, la señal a  $\delta$  4.24 (doblete) integra para un protón, que corresponde a un metino. A  $\delta$  3.78 (multiplete), aparece una señal que integra para dos protones, sugiriendo la presencia de otro metino. La señal a  $\delta$  3.62 (multiplete) integra para dos protones, correspondientes a metinos de

---

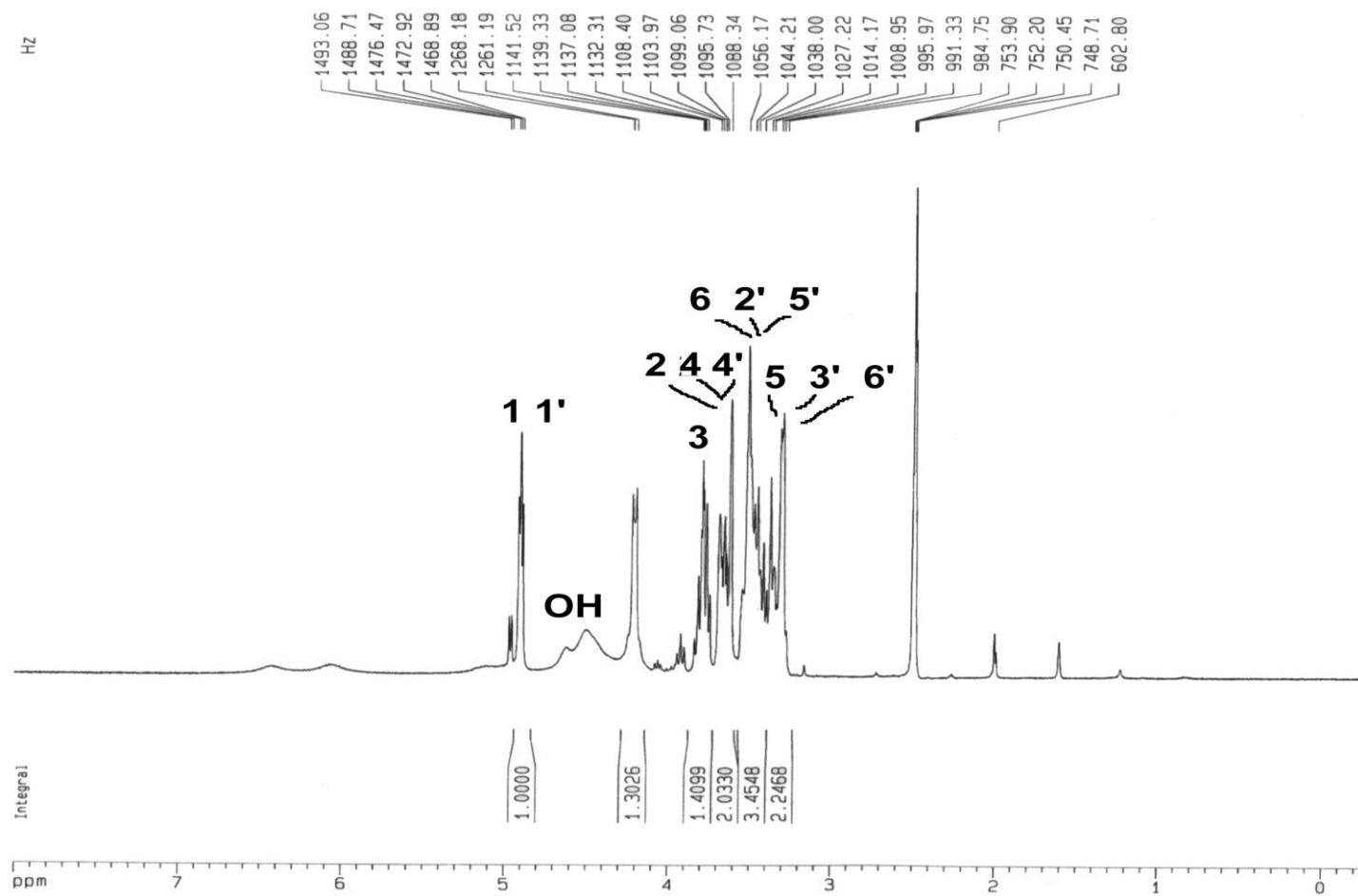
<sup>36</sup> FRIEBOLIN, H. Basic one – and two – dimensional NMR spectróscopy. Ed. VCH. Alemania. 1991. p. 80 – 81.



sistema polihidroxiado. A  $\delta$  3.45 se observa una señal que integra para 3 protones, donde dos de ellos pueden pertenecer a protones geminales y el restante a un metino. A  $\delta$  3.30 se observa un multiplete que integra para 5 protones, dos protones geminales y tres metínicos.



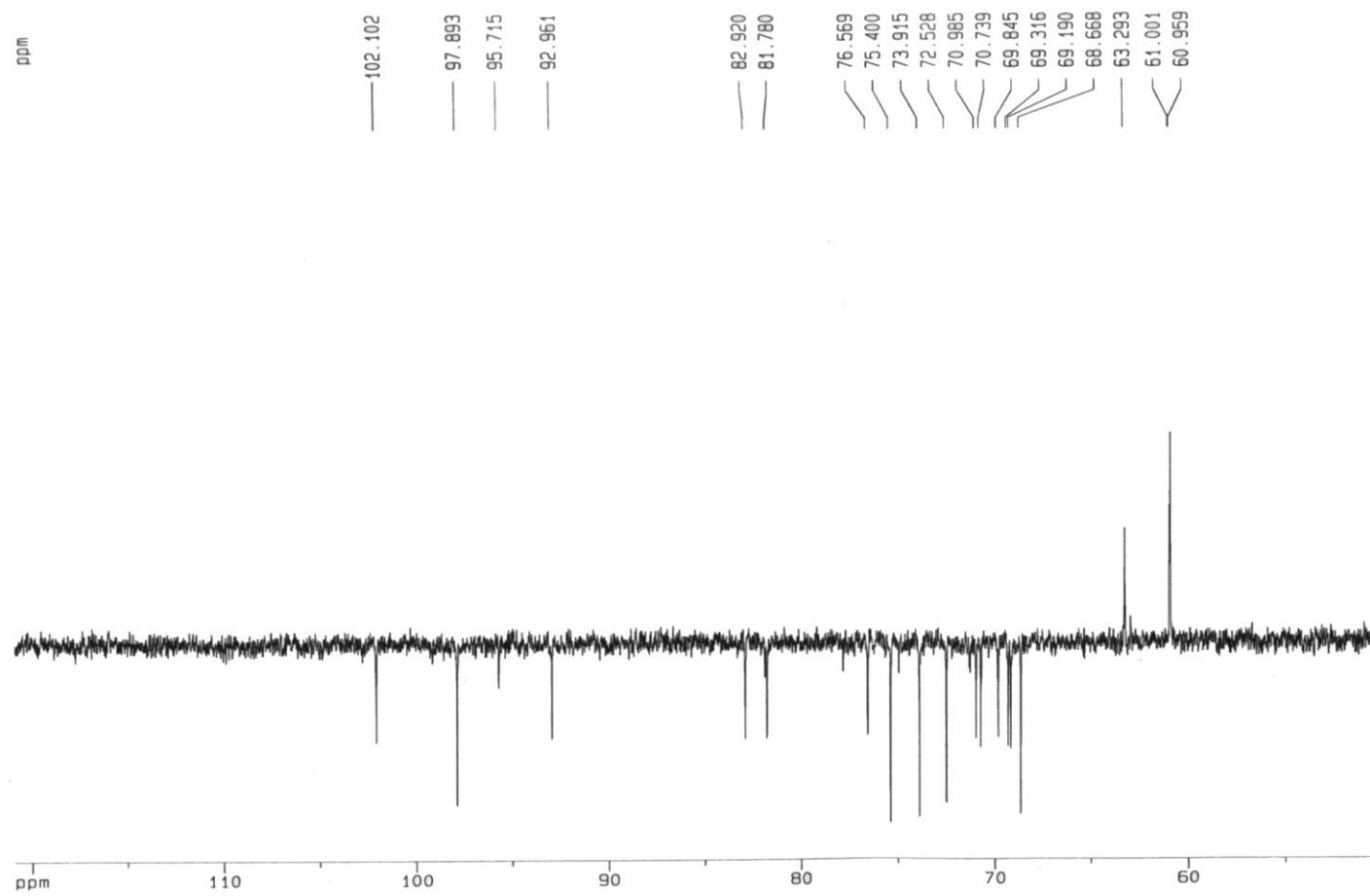
En el experimento DEPT (300MHz, disolvente: DMSO) (Figura 26, Pág. 66) se observaron un total de 19 señales de carbono. Dentro de este mismo experimento, aparecen otras señales muy pequeñas características de otro compuesto que se encuentra en menor proporción. Para este estudio se aborda el análisis de las señales más intensas. Este experimento permite observar señales de carbono significativas como las señales de carbono a 63.29 y 61.00 ppm que permiten establecer la presencia de dos carbonos metilénicos. Las otras señales sugieren la presencia de carbonos metínicos, descartándose la presencia de grupos metilos (por espectro de RMN  $^1\text{H}$ ).



**Figura 25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto FA 5 - 6

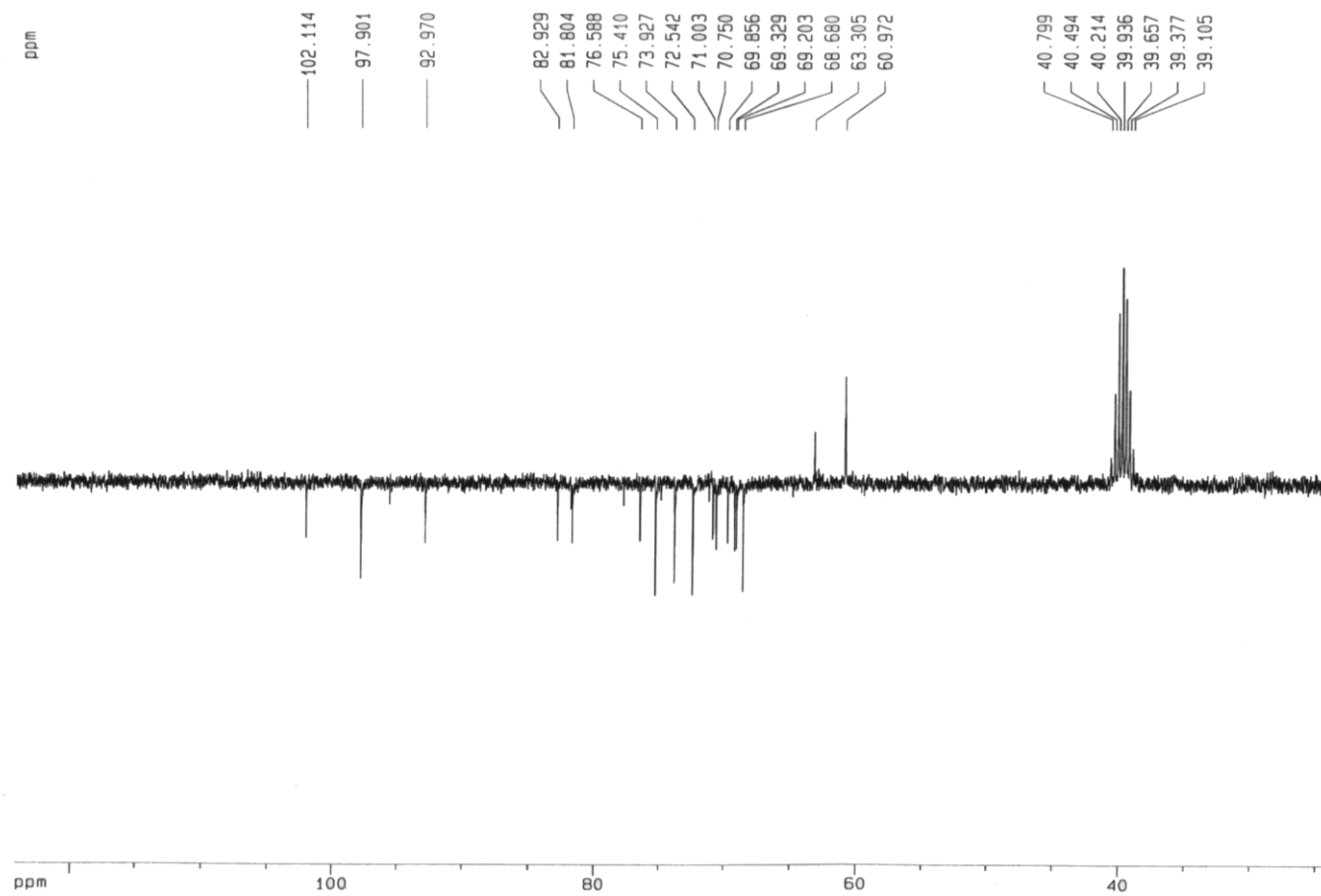
En el experimento JMOD (300MHz, disolvente: DMSO) (Figura 27, Pág. 68) a diferencia del experimento DEPT en el cual las señales de carbono secundarios están hacia arriba, mientras que los carbonos primarios y terciarios se ubican hacia abajo, en este experimento se pueden observar las señales de carbonos cuaternarios y secundarios para un compuesto ubicadas hacia arriba y las señales de carbonos primarios y terciarios hacia abajo. Teniendo en cuenta el resultado en el espectro, se establece la ausencia de carbonos cuaternarios y metilos para la molécula.

Los experimentos ántes mencionados permiten suponer de acuerdo con el número y tipo de señales de carbono observadas la presencia de un sistema O - glicósido.



**Figura 26.** Espectro DEPT del compuesto FA 5-6

En el experimento COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , (300MHz, disolvente: DMSO) (Figura 28, Pág. 70), se observaron un total de 8 correlaciones. En el espectro las correlaciones protón-protón más notorias están: la señal a  $\delta$  3.45 que tiene una correlación con la señal que está a  $\delta$  3.62, la correlación entre la señal a  $\delta$  4.88 correspondiente a los protones anoméricos con las dos señales que están a  $\delta$  3.62 y  $\delta$  3.45, hace suponer que estas dos señales correspondan a los protones de la posición dos para cada unidad de monosacárido. Igualmente se logra observar una correlación entre los protones metínicos a  $\delta$  3.62 y 3.78 ppm .

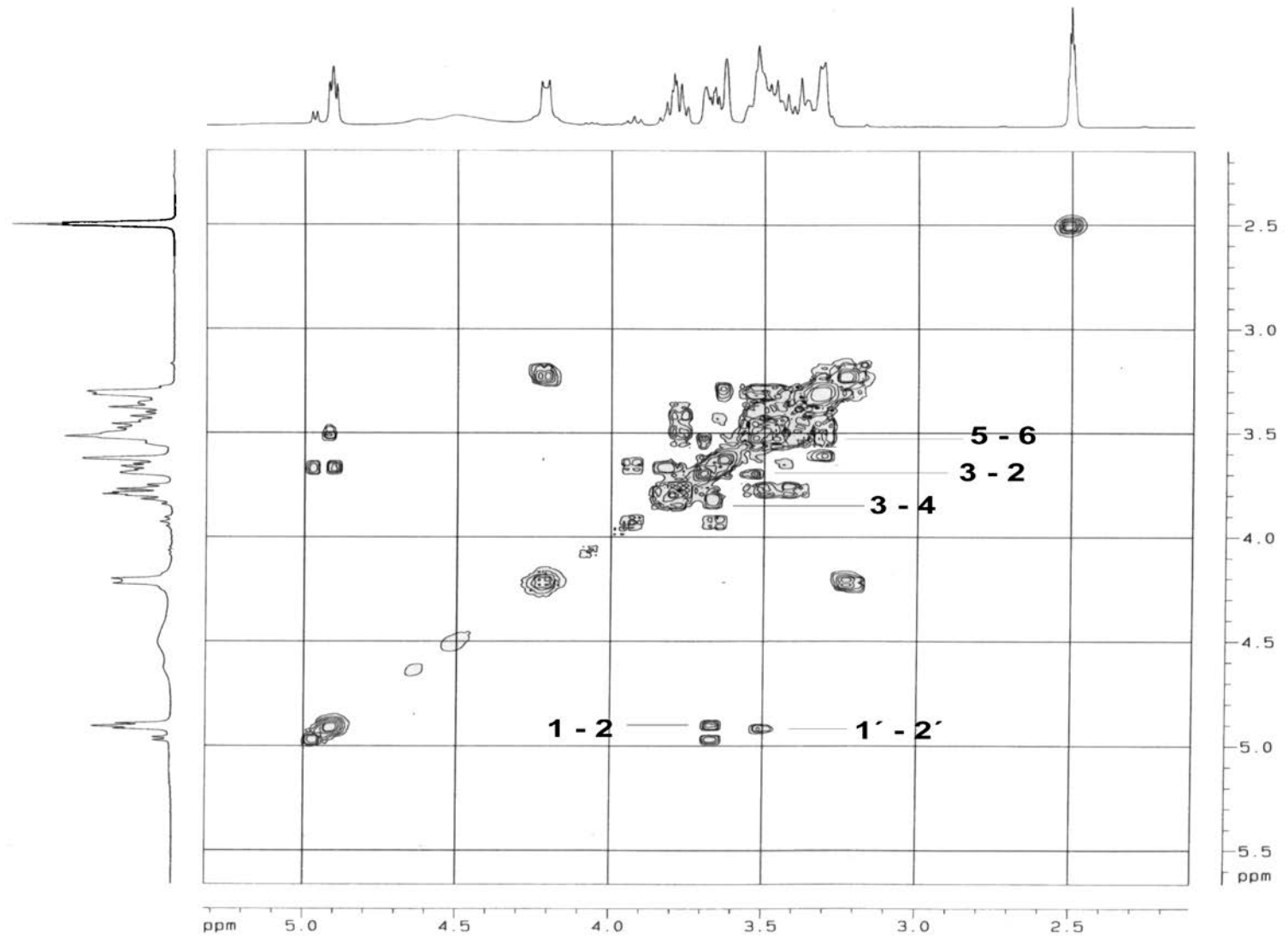


**Figura 27.** Espectro JMOD del compuesto FA 5 - 6



Con el experimento de HMQC (300MHz, disolvente: DMSO) (Figura 29, Pág. 72), se produjo un espectro en el que se observan correlaciones directas entre carbono y protón, como las exhibidas a 102.10 y 92.96 ppm, que están correlacionadas directamente con la señal de protón anomérico a 4.88 ppm, la señal a 76.57 ppm tiene relación directa con la radiación del protón a 3.78 ppm (CH), la señal a 75.40 ppm tiene relación con el protón que absorbe a 3.62 ppm. La señal de carbono a 72.53 ppm tiene relación con el protón que está a 3.30 ppm (CH). Igualmente se observa la relación entre el desplazamiento químico de carbono a 69.85 ppm y el de protón a  $\delta$  3.45 (CH).

La señal a 69.19 ppm tiene relación con la de protón a  $\delta$  3.40 (CH). Las señales de carbono a 63.29 y 61.00 ppm tienen relación con protones que aparecen en  $\delta$  3.30 y  $\delta$  3.45 respectivamente, corroborando la presencia de dos carbonos metilénicos.



**Figura 28.** Espectro COSY  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  del compuesto FA 5 -6

En la correlación HMBC ( $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$  a larga distancia) (300MHz, disolvente: DMSO, Figura 30, Pág. 74) se puede observar y determinar los carbonos que tienen correlación con los protones vecinos y corroborar información de espectros anteriores. Del espectro se destacan las siguientes correlaciones: la señal de carbono a 69.85 pp. tiene una correlación con la señal de protón a  $\delta$  4.88 pp. y la señal de carbono que aparece a 68.67 pp. con el protón que está a  $\delta$  4.88. Estas correlaciones permiten proponer que las dos unidades de carbohidrato  $\alpha$  se encuentran unidas a través de un enlace glicosídico  $\alpha$  (1 – 4); la señal de carbono a 70.74 ppm, tiene una correlación con el protón a  $\delta$  3.62 y el protón anomérico  $\delta$  4.88, esta correlación permite suponer que se trata de la posición del carbono número tres de una de las unidades de monosacárido. La señal de carbono a 61.00 ppm que corresponde al metileno de uno de los carbohidratos aparece correlacionada con la señal de protón a  $\delta$  3.30; pudiéndose tratar entonces del carbono de la posición cinco de una de las unidades. La señal de carbono a 75.40 ppm que tiene correlación con la señal de protón anomérico  $\delta$  4.88, permite suponer que se trate del carbono dos de una de las dos unidades de carbohidrato. Por último la señal a 63.29 ppm de carbono metilénico tiene una correlación con el protón que aparece a  $\delta$  3.45.

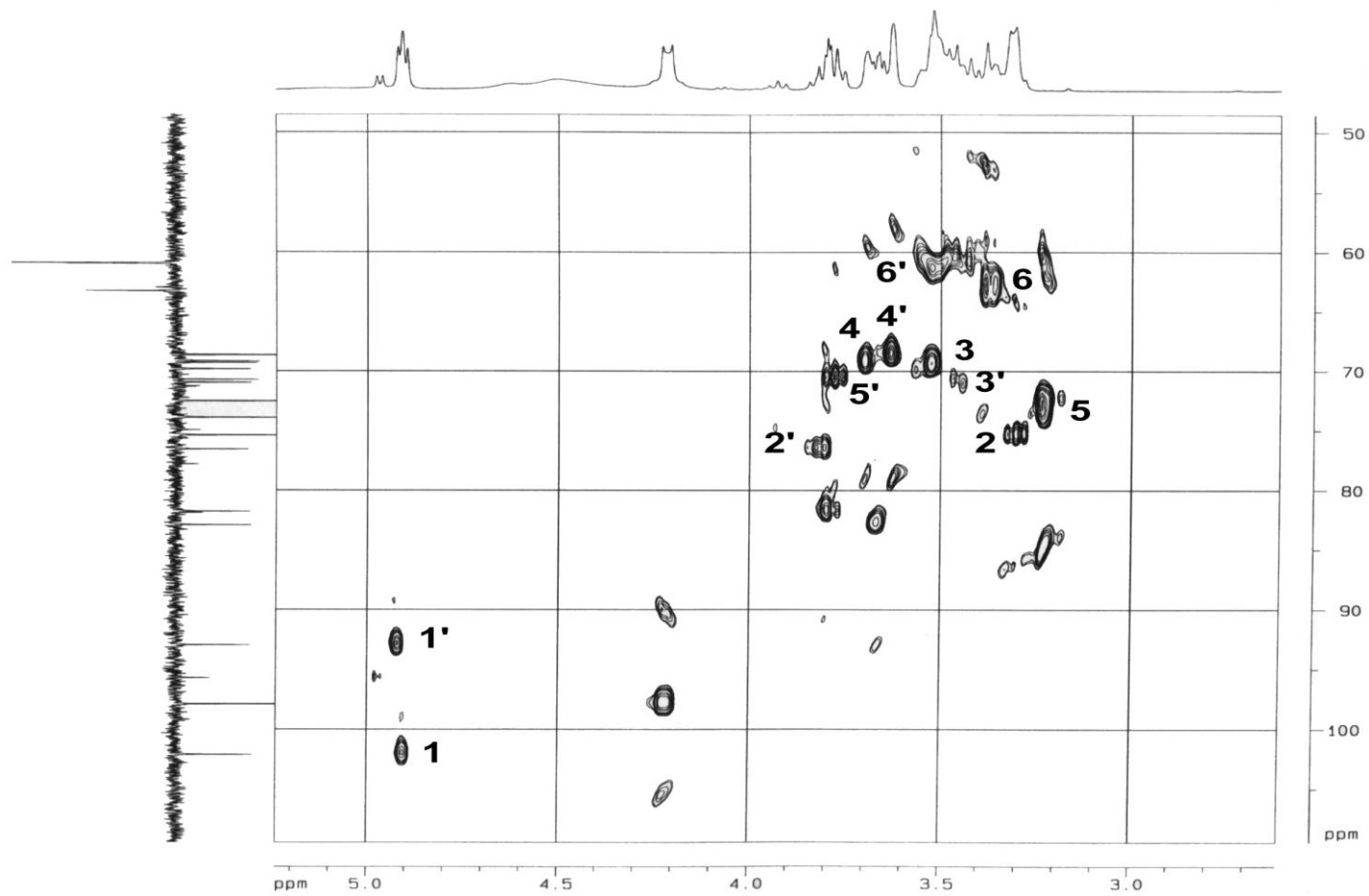


Figura 29. Espectro HMQC del compuesto FA 5 - 6

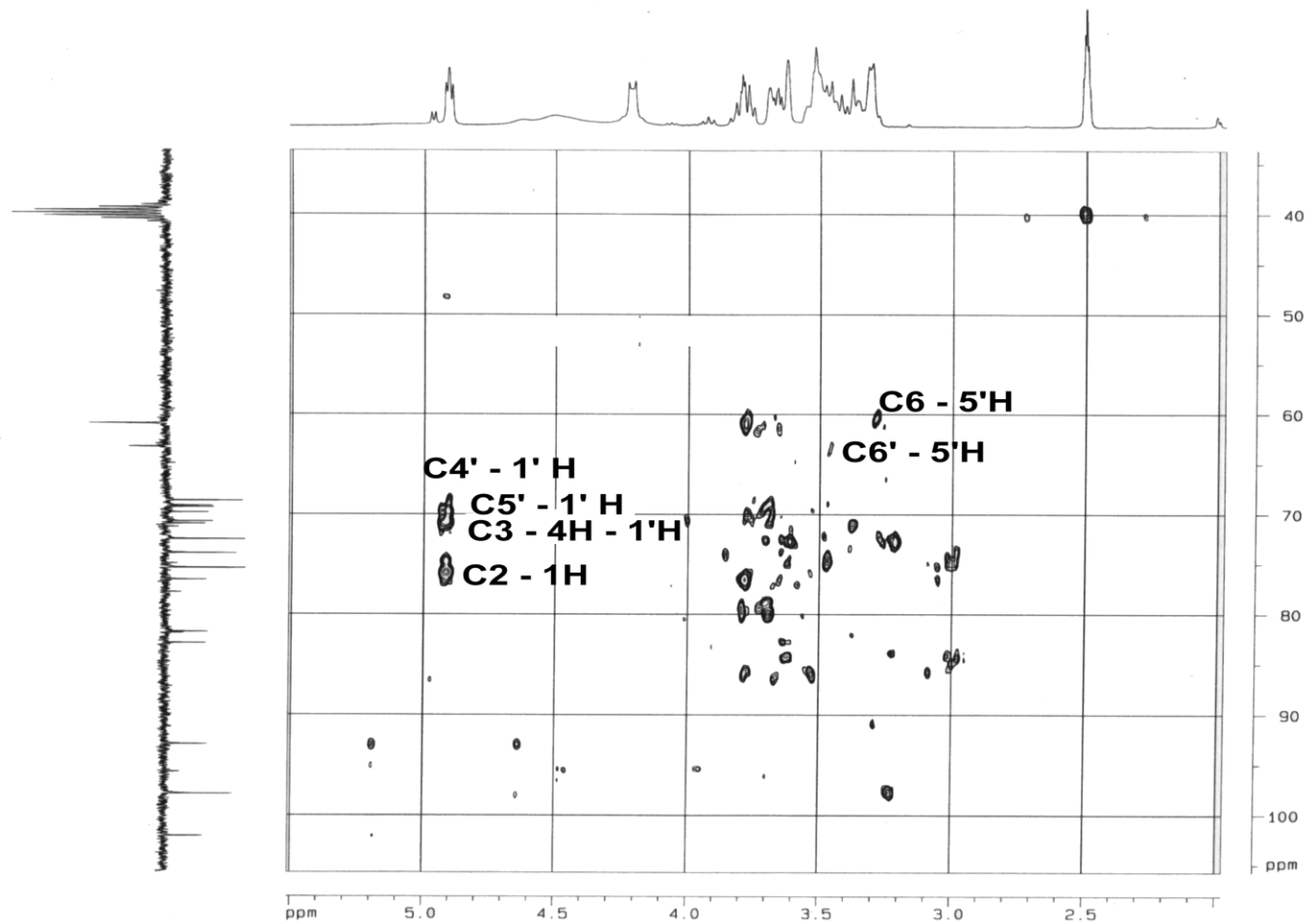
Todas la correlaciones anteriores (COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ , HMQC y HMBC) así como los desplazamiento químicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC Y HMQC para FA 5-6

# H	$\delta$ $^1\text{H}$	M*	COSY	# C	$\delta$ $^{13}\text{C}$	Tipo	HMQC	HMBC
1 y 1'	4.88	d	3.62-3.45	1	102.10	CH	4.88	
OH	4.55	d	3.30		97.89	CH	4.24	
3	3.78	m	3.45	1'	92.96	CH	4.88	
2, 4 y 4'	3.62	m	3.30		82.02	CH	3.62	
6, 2' y 5'	3.45	m			81.78	CH	3.78	
5, 3' y 6'	3.30	d	3.45	2'	76.57	CH	3.78	4.88-3.62
				2	75.40	CH	3.30	
					73.92	CH		
				5	72.53	CH		
				3'	70.99	CH	3.45-3.30	
				3	70.74	CH	3.45-3.30	4.88
				5'	69.85	CH	3.45	4.88
					69.34	CH	3.45	4.88
				4	69.19	CH	3.62	4.88
				4'	68.67	CH	3.62	3.45
				6'	63.29	CH <sub>2</sub>	3.30	3.30
				6	61.00	CH <sub>2</sub>	3.45	
					60.95	CH <sub>2</sub>		

**M** = Multiplicidad

Uno de los valores quizás más relevantes consignados en la tabla 6, lo constituye la presencia de la correlación en HMBC entre uno de los protones anoméricos a 4.88 ppm con el carbono a 68.67 ppm. Esta permitió establecer la posible conexión entre las dos unidades de monosacaridos.



**Figura 30.** Espectro HMBC del compuesto FA 5 - 6

Con el fin de sistematizar el tratamiento de los datos de desplazamiento químico de RMN, se procedió a numerar los carbonos y los protones unidos a estos, para uno de los monosacáridos como 1', 2', 3', 4', 5' y 6'.

Teniendo en cuenta que los sistemas de espines se han establecido a través de los experimentos de RMN, (COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ , HMQC, JMOD, DEPT,  $^{13}\text{C}$  Y  $^1\text{H}$ ) se realizó la comparación de estos datos experimentales con los teóricos, encontrándose que las señales analizadas eran consistentes con dos unidades de glucosa alfa piranoide, unidas por un enlace O – glucosídico. Estos resultados se describen en el esquema 4. en el se indican los valores teóricos en negrilla frente a los experimentales tanto para protón como para carbono trece. Igualmente se resaltan de una manera gráfica las correlaciones de HMBC y COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  (flechas bidireccionales segmentadas).

De esta forma se logra proponer la estructura (Figura 31) como  $\alpha$  - D - Glucopiranosil – (1  $\rightarrow$  4)  $\alpha$  - D - glucopiranososa.

## 6. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 6.1 MATERIAL E INSTRUMENTAL

#### 6.1.1 Reactivos

El material básico de estudio de esta investigación fue el siguiente:

- Alga *Chaetomorpha californica*: material recolectado en la Bahía de Buenaventura, localizada en la región central de la Costa Pacífica de Colombia entre las coordenadas 3° 53' y 3° 48' N y 77° 06' y 77° 20' W. El sitio específico de recolección se llevó a cabo en las localidades de Punta Soldado y Agua Dulce.
  
- Los reactivos químicos utilizados en esta investigación fueron productos del grado analítico y HPLC (MERCK, J.T. BAKER, SIGMA, CARLO ERBA, OXOID, ALDRICH)
  - Grado HPLC: acetona, acetonitrilo, agua desionizada, butanol, hexano, metanol.
  - Analíticos: acetato de etilo, agua destilada, acetona, acetonitrilo, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, diclorometano, etanol.
  - Cromatográficos: Amberlita XAD-2, Sephadex LH-20, Sephadex G-25, Silica gel, Placas cromatográficas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm, 20 cm x 20 cm).



- Revelantes: reactivo de Lieberman (4 Volúmenes de anhídrido acético por cada Volumen de ácido sulfúrico concentrado), ácido fosfomolibdico (4% ácido fosfomolibdico en etanol) y ninhidrina (0.3 g ninhidrina en 95 mL de 2,4,6 – colidina y 5 mL ácido acético)<sup>37</sup>.

### 6.1.2 Equipos

Los equipos utilizados para la separación y el análisis de los diferentes metabolitos obtenidos fueron:

- Cromatógrafo HPLC Hewlett Packard Ref. HP 1100. Unidad de análisis Industriales.
- Espectronic Genesys 5 UV visible (200 – 1100 nm). Laboratorio de Biología celular y Molecular.
- Rotaevaporador (Buchi 10026957). Laboratorio de Química de Productos Naturales.
- Estufa Memmert, modelo 5128. Laboratorio de Química de Productos Naturales.
- Balanza Metter PJ 360, Delta Range. Laboratorio de Química de Productos Naturales
- Columna  $\mu$ - parasil Nova Pak C<sub>18</sub> 86290 (waters). Laboratorio de Química de Productos Naturales

---

<sup>37</sup> Thin – Vayer Chromatography. 2° Ed. Vol. 15. 1978. p. 116 – 118.

## **7. PERSPECTIVAS**

Con esta investigación y sus resultados le surgen al grupo de Química de Productos Naturales de la Universidad del Cauca las siguientes perspectivas:

Continuar con el estudio fitoquímico y Espectroscópico de algas marinas y otros organismos marinos de la Costa Pacífica Colombiana, teniendo en cuenta que es el primer estudio que se lleva a cabo en esta institución y en el sur occidente Colombiano.

Aislar diferentes compuestos con potencial químico como actividad farmacobiológica y aquellos de importancia industrial como carragenanos, que posiblemente se encuentren en este tipo de organismos.

Aumentar el estudio hacia este tipo de organismos provenientes de nuestra costa pacífica con el fin de aprovechar las reservas de nuestra costa, que nos proveen de una gran cantidad de material y de gran valor.

Este trabajo de tesis al igual que los demás trabajos busca no sólo servir a los estudiantes de Química sino también a los de otras áreas como Biología y Medicina.

## 8. SUGERENCIAS

En esta sección menciono aspectos que en mi concepto se deben tener en cuenta para realizar una investigación en mejores condiciones:

Adquirir equipos tales como UV-VIS, RMN y espectroscopia de masas, esto para evitar enviar las muestras a otros lugares y en este caso a otro país (España), y así evitar inconvenientes de tiempo.

Apoyar los diferentes proyectos que se proponen dentro de cada grupo de investigación de química, ya que la investigación es un factor importante dentro de la formación de un estudiante de ciencias exactas y educación, y de otras facultades como la de salud.

Abordar el estudio de la fracción de cloruro de metileno a fin de complementar el presente trabajo.

## 9. CONCLUSIONES

Del estudio del alga *Chaetomorpha californica*, recolectada en la Costa pacífica Colombiana (Localidades: Punta Soldado y Agua Dulce, Buenaventura), se lograron aislar e identificar un nucleosido y un sistema polihidroxiado, cuyo estudio espectroscópico (UV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , DEPT, JMOD, HMQC, HMBC y masas) permitió identificarlos como el nucleosido adenosina (**1**) y un disacárido, del que se propone como  $\alpha$  - D - Glucopiranosil - (1  $\rightarrow$  4) -  $\alpha$  - D - glucopiranososa.

Se realiza por primera vez la separación y elucidación estructural a través de espectroscopia de los compuestos procedentes del alga perteneciente al género *chaetomorpha*, de especie *Chaetomorpha californica*.

Los resultados de las pruebas de actividad citotóxica para las fracciones de hexano, cloruro de metileno, acuosa y *n* - butanólica indican la baja actividad en las fracciones de hexano y cloruro de metileno, y una leve actividad para la fracción acuosa y butanólica. Esto con base en los parámetros fijados por el Instituto Nacional contra el cáncer.

## BIBLIOGRAFIA

1. BEJARANO, Adriana. Aporte de biomasa y detritus de las macroalgas bentónicas al ecosistema del manglar. Santiago de Cali, 1997., p. 95. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Sección de biología marina.
2. CANTERA, Jaime y CONTRERA, Rafael. Ecosistemas costeros. Santafé de Bogotá: universidad nacional, 1998. capitulo 5.
3. CANTERA, Op. Cit., Tomo. 2.
4. CARBOT, Andréu et al. Algas marinas del parque nacional morrocoy: usos en el diagnostico y terapéutica. Venezuela: universidad de los andes, 2000. p. 83.
5. COLMENARES, Ana y PEÑA, Enrique. Flora algológica en la bahía de Buenaventura, costa Pacífica Colombiana. Un recurso potencial aprovechable. En : I CONGRESO NACIONAL SOBRE ODIVERSIDAD. (20. : 1994 : Cali). Memorias del I congreso nacional sobre biodiversidad. Cali, 1994.
6. COPUL, Magaña. Relatos de la vida silvestre y del ambiente natural de Bahía Banderas. Jalisco : centro universitario de la costa, 2000. p. 121
7. COPUL, Op. Cit., p. 121.
8. DAWES, Clinton. Botánica marina. México: Limusa, 1995. p. 69.
9. DIAZ, Ignacio. El bosque de las laminarias. En: Espacio submarino. Argentina. (21, febrero, 2001); p. 5.
10. EBERHARD, Breitmaier y Wolfgang, Voelter. Carbon – 13 NMR spectroscopy, high- resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry. New York. 1987. p. 378 – 409.
11. GONZALES, Albert. Los sistemas de clasificación de los seres vivos. Madrid: akal, 1998. p. 55.

12. HOFFMAN, Alicia y SANTELIAS, Bernabé. Flora marina de Chile central. Chile: Universidad católica de Chile. 1997., p. 434.
13. INVERTABRADOS PROTISTAS. (20. : 2000 : México). Memorias del II seminario de adaptación al medio de los protistas de vida libre. México : universidad Comahue, 2000.
14. ISEAS, Freddy et al. experiencias a campo, ficocoloides gelatados en terapéutica animal. En: M medicina Veterinaria. México: vol. 52, no. 1; (2001); p. 6.
15. JEREZ, José. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. En: Medio ambiente. Canarias. Islas Canarias. Vol.2, no. 9 (2000); p. 4.
16. LARA, Germán et al. Screeninng for toxic activity of some marine Benthic algae. En : food adition contamination.Tokyo : vol. 12, no. 3 (1995); p.485-490.
17. LEMOS, Juan. El Océano y sus recursos. México: progreso, 1997. capítulo 10.
18. MENDOZA, Manuel. Las macroalgas marinas bénticas de la Argentina. En: Ciencia hoy. Argentina: Vol. 9, no. 50 (ene. – feb. 1999); p. 40 – 49.
19. MENDOZA, Op. Cit., p. 40 – 49.
20. PEREZ, Andrés. Actividad antimicótica del alga *Chaetomorpha californica*. Santiago de Cali, 1997., 24 p. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Sección de biología marina.
21. PEREZ, Op. Cit., p. 9.
22. PEREZ, maritza. Nueva composición de origen natural con aplicación en ultrasonido terapéutico. En : planta medica. Cuba. Vol. 5, no. 3 (2000); p. 114 – 17.
23. PRETSCH, E et al. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por metodos espectroscópicos. Barcelona: Universidad de Barcelona. 1993. p. C25 - H370.

24. PRIETO, Rosa. Nuevos brianos de la gorgonia *briareum* sp y secoesteroides con actividad citotóxica procedentes del coral blando *sinularia* sp. La Coruña, 1996. p. 47 - 106. Trabajo de grado (Licenciada en Ciencias Químicas). Universidad da Coruña. Departamento de Química fundamental e Industrial.
25. RAMÍREZ, Mauricio. Distribución y composición de la flora algal asociada a ecosistema del manglar de la Costa Pacífica Colombiana. Santiago de Cali, 1997., 73 p. Trabajo de grado (biólogo marino). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Sección de biología marina.
26. SAAVEDRA, Camilo. Algunos factores en la distribución y biomasa de las macroalgas intermareales asociadas al manglar, Pacífico Colombiano. Santiago de Cali: Universidad del Valle. 20001. p. 45.
27. TORRES, Eduardo y KHUM, Guillermo. Factores que intervienen en la composición de la flora marina. En: toxicología. Madrid. Vol. 2, no. 5 (julio. 1998); p. 17.
28. UGARTE, Javier. Algas marinas: usos y biotecnología. España: Facultad de ciencias Universitarias. Universidad de A Coruña. 2000. p. 17.
29. ZAPATA, Jairo. Análisis comparativo de estructura y composición de un manglar de barra y otro de rivera en la Isla soldado, Buenaventura. Santiago de Cali, 1998., 5 p. Trabajo de grado (Biólogo Marino). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Sección de biología marina.
30. ZARCO, Carlos. Algas rojas. Madrid: Universidad de Sevilla, 1998. capítulo. 2
31. <http://www.ston.ac/~kpa/modacol/html>
32. [www.mcs.anl.gov/home/towell/metabhome.html](http://www.mcs.anl.gov/home/towell/metabhome.html)
33. [www.chemfinder.cambridgesoft.com](http://www.chemfinder.cambridgesoft.com)
34. [www.isabeldeespana.org/ciencias/apuntes/apuntesbio2bach/glucidos.doc](http://www.isabeldeespana.org/ciencias/apuntes/apuntesbio2bach/glucidos.doc)
35. [www3.usal.es/dbbm/clasmed/bioq17.ppt](http://www3.usal.es/dbbm/clasmed/bioq17.ppt)
36. [www.poco.phy.cam.ac.uk/research/starch/whatis.html](http://www.poco.phy.cam.ac.uk/research/starch/whatis.html)
37. [www.equi.ucr.ac.cr/vermn](http://www.equi.ucr.ac.cr/vermn)