

EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL ALGA *Bostrychia calliptera*

DIANA MARIA CHITO TRUJILLO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006

EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL ALGA *Bostrychia calliptera*

DIANA MARIA CHITO TRUJILLO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de
Química.

DIRECTOR:

Ph.D LUIS ALBERTO LENIS V.

ASESOR:

M.Sc. RICARDO BENITEZ B.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2006

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVOS	17
1. MARCO TEORICO	18
1.1. ALGAS	18
1.1.2. CLASIFICACIÓN	21
1.2. <i>Bostrychia</i> Montagne (1842)	27
1.2.1. <i>Bostrychia calliptera</i> (Montagne) Montagne, 1850	27
1.2.2. Clasificación Sistemática	28
1.2.3. Distribución mundial	28
1.2.4. Distribución en Colombia	28
1.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LAS ALGAS	29
1.4. ANTECEDENTES	30
1.4.1. De actividad biológica de algas marinas	30
1.4.2. De composición de algas del mismo género	31
1.5. PROCESO DE SEPARACION	31
1.5.1. Cromatografía en columna	31
1.5.2. Cromatografía en capa fina (CCF) o capa delgada (CCD)	31
1.6. PROCESO DE PURIFICACIÓN POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA	32
1.7. ANÁLISIS QUÍMICO	32
1.7.1. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	32
1.7.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional	33
2. SECCIÓN EXPERIMENTAL	34
2.1. REACTIVOS Y EQUIPOS	34
2.1.1. Reactivos	34
2.1.2. Equipos	36

2.2. METODOLOGÍA	37
2.2.1. Identificación del Organismo	37
2.2.2. Proceso de Recolección	38
2.2.3. Proceso de Extracción	39
2.2.4. Proceso de Separación	40
2.2.5. Pruebas Fitoquímicas Preliminares	44
2.2.6. Proceso de Purificación	46
2.2.7. Análisis Químico	47
3. RESULTADOS Y DISCUSION	48
3.1. Proceso de Separación y Purificación	48
3.2. Pruebas Fitoquímicas Preliminares	69
3.3. Análisis Espectroscópico	72
4. CONCLUSIONES	97
5. ANEXOS	100
6. BIBLIOGRAFIA	105

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación Sistemática de <i>Bostrychia calliptera</i>	28
Tabla 2.	Condiciones empleadas en el fraccionamiento de las subfracciones SFCAE y SFCE	43
Tabla 3.	Fases móviles y sistemas de detección para el reconocimiento de grupos funcionales por CCF	45
Tabla 4.	Subfracciones analizadas en HPLC	46
Tabla 5.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE	49
Tabla 6.	Altura de Plato Teórico y flujo para la curva de Van Deemter de SFCAE ₂	50
Tabla 7.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE ₆	57
Tabla 8.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE _{6,9}	58
Tabla 9.	Subfracciones obtenidas en el segundo proceso separación en CC de SFCAE	59
Tabla 10.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE _{6*}	60
Tabla 11.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE _{6*-5}	61
Tabla 12.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE _{5*}	62
Tabla 13.	Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE	68
Tabla 14.	Resultados de las Pruebas Fitoquímicas de SFCAE	71
Tabla 15.	Resultados de RMN ¹³ C, ¹ H, HMQC, HMBC de SFCAE _{6,9,6}	74
Tabla 16.	Resultados de RMN ¹³ C, ¹ H, HMQC, HMBC de SFCAE _{6*,4}	85

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura General de un Alga	18
Figura 2. Estructuras de pantofuranoïdes	20
Figura 3. Estructura Ficocianina	22
Figura 4. Estructuras Ficoeritrina	23
Figura 5. Estructura Fucoxantinas	24
Figura 6. Estructuras clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico	25
Figura 7. Estructuras en formas de silla	26
Figura 8. <i>Bostrychia calliptera</i> en raíces	38
Figura 9. Proceso de extracción del alga <i>BC</i>	39
Figura 10. Espectro UV de SFCAE ₂	50
Figura 11. Curva de Van Deemter para SFCAE ₂	50
Figura 12. Cromatograma de subfracción SFCAE ₂ .	52
Figura 13. Cromatograma de subfracción SFCAE ₂ degradada a longitudes de onda de (a).278nm (b). 254nm.	52
Figura 14. Espectro UV de SFCAE ₁	54
Figura 15. Espectro RMN ¹ H de subfracción SFCAE ₆	55
Figura 16. Espectro RMN ¹³ C de subfracción SFCAE ₆	56
Figura 17. Espectro UV de SFCAE _{6,9,6}	58
Figura 18. Espectro UV de SFCAE _{6*-4}	60
Figura 19. Cromatograma subfracción SFCAE _{5*-3}	63
Figura 20. Cromatograma pico de 4.7 minutos purificado de subfracción SFCAE _{5*-3}	63
Figura 21. Cromatograma pico de 5.6 minutos recolectado del proceso de purificación de subfracción SFCAE _{5*-3}	64

Figura 22.	Cromatograma pico de 6.8 minutos purificado de subfracción SFCAE _{5*-3}	64
Figura 23.	Cromatograma de subfracción SFCAE _{2**} inyectada en fase Reversa	65
Figura 24.	Cromatograma de pico de 5.1 minutos recolectado del proceso de purificación de subfracción SFCAE _{2**}	66
Figura 25.	Cromatograma subfracción SFCAE _{2**} inyectada en fase Normal	66
Figura 26.	Cromatograma picos recolectados del proceso de purificación de subfracción SFCAE _{2**} en HPLC fase Normal (a). 4,09 min (b). 4,4 min (c). 4,9 min (d). 5,3 min (e). 6.7 min.	67
Figura 27.	Cromatograma Subfracción SFCE inyectada en fase reversa	68
Figura 28.	Espectro RMN ¹ H de subfracción SFCAE _{6,9,6} .	73
Figura 29.	Espectro RMN ¹³ C de subfracción SFCAE _{6,9,6} .	75
Figura 30.	Espectro DEPT de subfracción SFCAE _{6,9,6} .	76
Figura 31.	Espectro HMQC de subfracción SFCAE _{6,9,6} .	78
Figura 32.	Espectro COSY ¹ H - ¹ H de subfracción SFCAE _{6,9,6} .	79
Figura 33.	Fragmento de la subfracción SFCAE _{6,9,6} formado empleando los experimentos HMQC y COSY.	80
Figura 34.	Estructura sugerida para la subfracción SFCAE _{6,9,6}	80
Figura 35.	Correlaciones HMBC de la estructura sugerida para la subfracción SFCAE _{6,9,6}	80
Figura 36.	Espectro HMBC de subfracción SFCAE _{6,9,6} .	81
Figura 37.	Fragmento 1 de la estructura sugerida para la subfracción SFCAE _{6,9,6}	82
Figura 38.	Unidad de Isopreno	83
Figura 39.	Esqueletos de Monoterpenos irregulares más comunes: a. crisantemil, b. artemisia, c. santolinil.	83
Figura 40.	Especies catiónicas del crisantemil	84

Figura 41.	Espectro de RMN ^1H de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	86
Figura 42.	Espectro HMQC de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	87
Figura 43.	Espectro RMN ^{13}C de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	89
Figura 44.	Espectro DEPT de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	90
Figura 45.	Espectro COSY ^1H - ^1H de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	91
Figura 46.	Estructura sugerida para la subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	92
Figura 47.	Correlaciones HMBC de la estructura sugerida para la subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	92
Figura 48.	Espectro HMBC de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$	93
Figura 49.	Biogénesis del ácido shikímico y sus derivados	94

LISTA DE ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

<i>BC:</i>	<i>Bostrychia calliptera</i>
CC:	Cromatografía en columna
CCD:	Cromatografía en capa delgada
CCF:	Cromatografía en capa fina
COSY ¹ H- ¹ H:	Correlación protón-protón
d:	Doblete
dd:	Doblete de dobletes
DEPT:	Distorsiones encadenadas por transferencia de polarización
dxh:	Diámetro x altura
F(C):	Fracción de cloruro de metileno
F(E):	Fracción de etanol
F(H):	Fracción de hexano
HMBC:	Correlación carbono-protón larga distancia
HMQC:	Correlación directa carbono-protón
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
Hz:	Herzio (s ⁻¹)
<i>J:</i>	Constante de acoplamiento
MHz:	Megaherzio
m:	Multiplete
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitro
mmHg:	Milímetros de mercurio
μm:	Micrómetros
nm:	Nanómetros
°C:	Grados centígrados
R _F	Factor de Retardo
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear

s:	Singlete
SFCAE:	Subfracción de Acetato de etilo
SFCAE _{1,n} :	Subfracción n proveniente de SFCAE ₁ , n: 1 a 7
SFCAE _{5*-n} :	Subfracción n proveniente de SFCAE _{5*} , n: 1-5
SFCAE _{6*-5,n} :	Subfracción n proveniente de SFCAE _{6*-5} , n: 1-4
SFCAE _{6*-n} :	Subfracción n proveniente de SFCAE _{6*} , n: 1-7
SFCAE _{6,9,n} :	Subfracción n proveniente de SFCAE _{6,9} n: 1 a 8
SFCAE _{6,n} :	Subfracción n proveniente de SFCAE ₆ , n: 1 a 12
SFCAE _{n**} :	Subfracción n proveniente de tercer proceso de separación de SFCAE, n: 1 a 6
SFCAE _{n*} :	Subfracción n proveniente de segundo proceso de separación de SFCAE, n: 1 a 8
SFCAE _n :	Subfracción n proveniente de SFCAE, n: 1 a 8.
SFCE:	Subfracción de Etanol
SFCE:	Subfracción de etanol
SFCE _n :	Subfracción n de etanol, n : 1 a 4
SFCH:	Subfracción de Hexano
t:	Triplete
td:	Triplete de dobles
UV:	Ultravioleta
UV-Vis:	Ultravioleta – visible

RESUMEN

En este estudio se desarrolló la investigación de la fracción de cloruro de metileno del alga *Bostrychia calliptera* con el fin de realizar un aporte a su composición química.

Para ello la fracción de cloruro de metileno (FC) fue sometida a una separación a través de cromatografía líquida en columna abierta empleando como fase estacionaria silica gel y como fase móvil los solventes: hexano, acetato de etilo y etanol en orden creciente de polaridad. La subfracción de acetato de etilo (SFCAE) por ser la de mayor peso nuevamente se sometió a sucesivas separaciones obteniendo en estos procesos las subfracciones SFCAE_{6,9,6} y SFCAE_{6*-4} puras. Estas subfracciones en placas de CCF desarrolladas sobre silica gel empleando como fase móvil hexano: acetato de etilo (7:5) y reveladas con luz UV de 254 y 365 nm y ácido fosfomolibdico mostraron una sola mancha con R_F de 0.26 y 0.36 respectivamente. Su posterior análisis por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ¹³C, ¹H, DEPT, COSY ¹H - ¹H, HMQC y HMBC permitió sugerir como las respectivas estructuras químicas las correspondientes a: C₁₇H₂₈O₃ (10-hidroxi-(7Z,9E,13Z)-trienoato de metilo) y C₁₀H₁₀O₃ ((E)- metil-3-(4-hidroxifenil) acrilato).

El proceso de purificación a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase normal a una longitud de onda de 280 nm de la subfracción SFCAE_{5*-3}, permitió obtener puros los compuestos que eluyeron de forma isocrática a tiempos de retención de 4.7 y 6.8 minutos empleando como fase móvil hexano: acetato de etilo (32:68). El análisis espectroscópico de RMN no registró señales significativas por lo que no fue posible sugerir posibles estructuras químicas para ellos.

Los compuestos elucidados se pueden considerar como derivados de las rutas biosintéticas del ácido mevalónico y shikímico. Dichos resultados nos animan a seguir investigando las fracciones restantes de este organismo.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los productos naturales han sido extraídos de plantas terrestres, mientras que el medio marino carece de una historia etnobiológica y etnomédica y aproximadamente solo hace 30 años se están desarrollando estudios que han demostrado que éste, es un excepcional banco de sustancias bioactivas. Cada año aparecen nuevos registros de metabolitos del mar, lo que indica, que el océano es un continuo y prolífico reservorio de productos naturales. ^[1]

Particularmente en las algas marinas algunos de los grupos de metabolitos aislados que se han encontrado son diterpenos, eicosanoides, lecitinas, esteroides y alcaloides. ^[1] Sin embargo, las algas marinas en la costa Pacífica son las menos conocidas del continente americano. En Colombia hay pocas especies reportadas en la literatura. Con certeza se sabe que el litoral pacífico colombiano es relativamente pobre en cuanto a composición de especies, si lo comparamos con la costa caribe^[2] la cual ha sido objeto de estudios en lo referente a análisis citoquímicos^[3]. Las posibles razones que podrían explicar dicha pobreza de especies son: 1) alta pluviosidad, 2) salinidad reducida del agua superficial debido a precipitaciones y desembocadura de ríos, y 3) condiciones desfavorables del sustrato. ^[2]

Bostrychia calliptera muestra valores relativamente altos de cobertura en Bahía Málaga, Bahía de Buenaventura y la Ensenada de Tumaco. La información sobre la composición química de las poblaciones naturales es útil desde el punto de vista científico y práctico, pues contribuye a dilucidar e interpretar el aporte de las comunidades bénticas vegetales al funcionamiento de los ecosistemas regionales y ofrece información de gran ayuda en la planificación y potencial utilización del recurso.

El presente estudio se constituye en el primer reporte químico del alga *Bostrychia calliptera*, que contribuye al conocimiento de la composición de esta especie de alga asociada al manglar consiguiéndose establecer de una manera preliminar sus propiedades y/o características químicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque aproximadamente el 70% de nuestro planeta está cubierto por los océanos, los organismos marinos permanecen todavía inexplorados pese a que constituyen un recurso prácticamente ilimitado que puede ser utilizado de forma beneficiosa, a través de la biotecnología, con el fin de desarrollar productos para la agricultura, compuestos farmacéuticos, materiales de investigación médica, enzimas industriales, etc., debido a la biodiversidad de las especies de las algas marinas, junto a la diversidad química y abundancia encontrada en cada especie ^[4-20].

En el pacífico colombiano *Bostrychia calliptera*, es una de las especies más abundantes, incluso en áreas contaminadas por metales pesados como las bahías de Tumaco y Buenaventura; sitios donde se han reportado niveles de mercurio, cobre y plomo que sobrepasan los considerados niveles normales en aguas marinas ^[21]. La abundancia y amplia distribución de esta especie hacen que tenga una posible utilidad como organismo bioacumulador de metales, además que sea sumamente importante para disminuir los niveles de contaminación por estos elementos en aguas estuarinas tropicales, una alternativa factible y de fácil obtención que podría mejorar las condiciones de saneamiento básico para los pobladores en muchas regiones costeras, incluyendo el litoral Pacífico colombiano.

Debido a que nuestro país esta constituido por una extensa zona marina de la cual hace parte la Bahía de Buenaventura cuyos organismos no han sido tan ampliamente estudiados, existe un amplio desconocimiento acerca de la composición de éstas especies por lo tanto es preciso dedicarle especial atención y evaluar los organismos existentes en ella. Por este motivo éste estudio se constituye en el primer reporte que desde el punto de vista químico se ha realizado sobre el alga *Bostrychia calliptera*, la cual es considerada un organismo perenne de la Bahía de Buenaventura. En él se plantea la

investigación de la fracción de cloruro de metileno del alga como proceso inicial para abordar el estudio de las sustancias presentes es éste organismo y así proporcionar información que en estudios posteriores permitan identificar las diferentes propiedades que estos presenten y de igual forma proporcionar nuevas materias primas o nuevos compuestos activos de utilidad múltiple para los seres vivos de forma natural o a través de su síntesis.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio preliminar de la fracción de cloruro de metileno del alga *Bostrychia calliptera* con el fin de determinar la estructura química empleando Resonancia Magnética Nuclear Mono y Bidimensional de por lo menos dos metabolitos secundarios separados y purificados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Separar los metabolitos presentes en la fracción de cloruro de metileno del alga *Bostrychia calliptera* por medio de cromatografía líquida en columna.
- Purificar las sustancias separadas por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
- Elucidar la estructura química de los compuestos puros a través de técnicas espectroscópicas como espectroscopia de resonancia magnética nuclear mono y bidimensional.

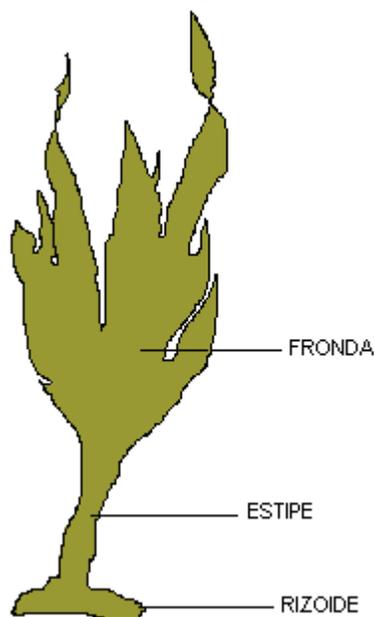
1. MARCO TEÓRICO

1.1. ALGAS

Un alga es una planta fotosintética, no vascular, sin raíces y que tiene estructuras reproductoras simples. Estos organismos marinos constituyen un total de veinticinco a treinta mil especies, con una gran diversidad de formas y tallas, y pueden existir como organismos unicelulares microscópicos (microalgas) y pluricelulares de gran tamaño (macroalgas). [22]

A pesar de que estos vegetales no poseen raíz, tallo, ni hojas, poseen una estructura general denominada talo en la que se pueden reconocer tres formas estructurales diferenciadas: la fronda, el estipe y el rizoide (Figura 1).

Figura 1. Estructura General de un Alga



Fronda: esta estructura es el símil de las hojas de las plantas superiores, generalmente poseen formas laminares que le permiten una alta captación de luz y dióxido de carbono, puesto que su principal función es realizar la fotosíntesis y abastecer de glúcidos al resto de la planta.^[23]

Estipe: este constituye el tallo, como en las plantas superiores y en algunas plantas más especializadas. Su función es la sujeción mecánica de la fronda, funciona como conductor de glúcidos desde la fronda al resto de la planta. A pesar de que no posee capilares como los tallos, cumple la función de transporte gracias al desarrollo de algunas células especializadas.^[23]

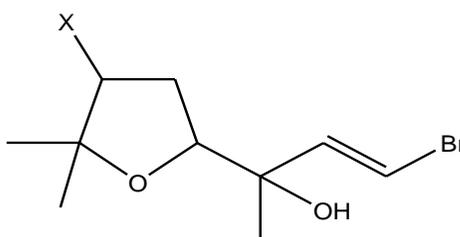
Rizoide: es de aspecto morfológico similar a la raíz de las plantas superiores y su función es la fijación del alga al sustrato. Esta estructura tiene una hendidura en la base la que le permite que funcione como una ventosa que se adhiere con mucha fuerza al sustrato, y además crece junto con la forma de éste, aprovechando las desigualdades del fondo para fijarse con más fuerza. Existen muchas formas de rizoide, sin embargo su forma general es cónica circular. Los rizoides desarrollan células meristemales que permiten el crecimiento de nuevos talos y frondas.^[23]

Las algas se caracterizan por su gran riqueza en proteínas, mucílagos, oligoelementos, vitaminas, y principios activos de importancia vital, tales como el yodo, fósforo, potasio, cloro, azufre, etc.^[23]

Últimamente, las investigaciones químicas que han sido llevadas a cabo sobre algas marinas (micro y macroalgas) han demostrado que estos organismos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras moleculares únicas, no encontradas en otros organismos. Además de ser las responsables de más de la mitad de la actividad fotosintética del mundo al pertenecer al llamado fitoplancton (parte vegetal del plancton marino), las microalgas son frecuentemente objeto de estudio científico

y de interés comercial debido principalmente a su gran diversidad taxonómica (cerca de 40,000 especies unicelulares) y bioquímica, cabe mencionar, un estudio realizado del organismo marino *Tethya aurantia*, cuyos principios activos demostraron actividad cardiodrepresora [24] y de igual forma un estudio químico del alga roja *Pantoneura plocamioides*, endémica del Antártico, que permitió el aislamiento de seis nuevos monoterpenos oxigenados denominados pantofuranoides los cuales debido a sus propiedades antisépticas y antioxidantes son empleados en la industria de la perfumería, en la elaboración de cosméticos, y en otras preparaciones farmacéuticas; las estructuras químicas elucidadas de éstos compuestos se muestran en la figura 2.[25]

Figura 2. Estructuras de pantofuranoides



PANTOFURANOIDE (1-3), X= Br

PANTOFURANOIDE (4-6), X= OH

Es por esto que las microalgas son el foco de atención de numerosas investigaciones farmacológicas donde sus extractos han sido probados como nuevas sustancias con actividad biológica, además de eso, las algas han sido explotadas desde hace ya más de un siglo como fuente de coloides que son usados exitosamente y con un amplio espectro de posibilidades como espesantes, gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria. Un valor añadido lo da el hecho de que las microalgas son fácilmente cultivables, con crecimientos muy rápidos, por lo que proveen una alternativa a la síntesis química para la producción a gran escala de estos compuestos activos. [21]

No hay que olvidar que las algas marinas son organismos que viven en un hábitat complejo y están sometidos a condiciones a veces extremas (cambios bruscos de salinidad, variación en la irradiación, periodos de emersión por efecto de las mareas, oleaje y predadores) por lo que tienen que saber adaptarse rápidamente a las nuevas circunstancias produciendo metabolitos que pueden ser de gran utilidad para el hombre ^[4-20, 26], responden fácilmente a las descargas de nutrientes y sustancias tóxicas, haciendo de ellas buenos indicadores de los cambios en la calidad del agua por ser organismos sensibles a las concentraciones de metales y abundar en los ambientes costeros; las algas marinas son ideales como organismos indicadores de polución en ambientes estuarinos y aguas costeras por presentar ciclos de vida cortos, lo que las hace indicadores adecuados para impactos a corto plazo. ^[27]

El papel de las algas como bioindicadores en la absorción y degradación de contaminantes ambientales se ha venido estudiando. Las macroalgas pueden acumular metales trazas varias miles de veces más, que su concentración en el agua de mar ^[28]. La bioacumulación, independientemente de los fenómenos que la provocan, tiene como resultado que un organismo o sus tejidos presentan concentraciones de especies químicas superiores a las del medio ambiente donde se desarrolla. Esta capacidad que presentan algunos organismos los hace convenientes para realizar programas de vigilancia en el medio acuático^[29].

1.1.2. CLASIFICACIÓN

Entre las algas existe una gran variedad de formas y tamaños, tipos de nutrición, respiración y reproducción, así como de los hábitat que ocupan. Poseen la clorofila que asociada con pigmentos, les proporciona sus colores característicos. Casi todas se desarrollan en medios acuáticos y sólo algunos géneros subsisten en ambientes terrestres siempre que contengan suficiente humedad ya sea en troncos de árboles o en el suelo. La mayoría son

microscópicas y forman parte del fitoplancton como primer eslabón de la vida marina aunque existen otras de varios metros de longitud.

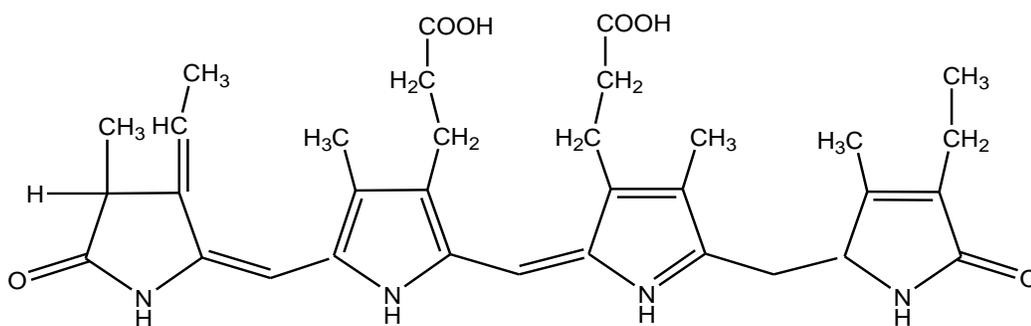
Los ficólogos definen a las algas como organismos fotosintéticos con Clorofila α y con estructura de talo no diferenciada en raíces, tallo u hojas como las plantas vasculares. Se clasifican en 11 grupos con categoría de división ^[30,31].

De entre ellos se destacan cuatro:

1. Cianofíceas (algas verde-azuladas)^[23]: Son organismos procariontes fotosintéticos que poseen clorofila α , están más próximos a las otras bacterias fotosintéticas que a algas eucariotas por lo que también se les denomina cianobacterias.

El nombre común viene del tono azulado que tienen debido a un pigmento biliproteico, ficocianina (Figura 3), que enmascara el color verde de la clorofila. Son organismos muy primitivos (aparecen en el periodo precámbrico, hace 3000 años) y cosmopolitas.

Figura 3. Estructura Ficocianina

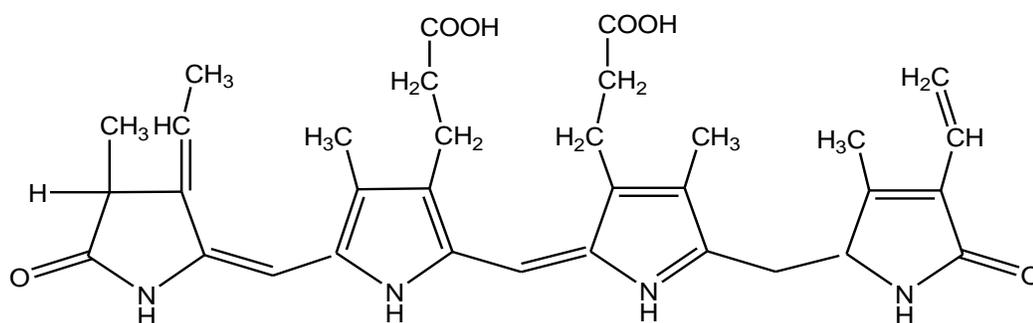


Entre las que tienen uso biotecnológico destaca *Spirulina* que se emplea como alimento por su alto contenido en proteínas (hasta el 70% del peso seco).

Muchos de estos organismos tienen capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al tener el sistema enzimático nitrogenasa [32].

2. Rodófitas (Algas rojas)[23]. El color pardo-rojizo viene dado por la existencia de biliproteínas, ficoeritrina (Figura 4) y ficocianina principalmente, que contribuyen a enmascarar el color verde de la clorofila.

Figura 4. Estructuras Ficoeritrina



Las algas rojas son organismos eucariotas, es decir que tienen membrana nuclear y, por regla general, están confinadas a hábitat marinos. Algunas son de gran belleza y, como los cianofitos, carecen de clorofila b y tienen pigmentos especiales rojos y azules. La mayoría se caracteriza por la presencia de puntos de conexión entre sus células que resultan de una división celular incompleta.

Las primeras algas rojas datan de la era paleozoica, periodo siluriano (hace 435-460 millones de años). En las paredes celulares presentan polisacáridos complejos cuya función principal es servir como cemento (coloide) que cohesiona la estructura del alga. Los ficocoloides (agar y carragenatos) son los principales productos de interés industrial en estas algas.

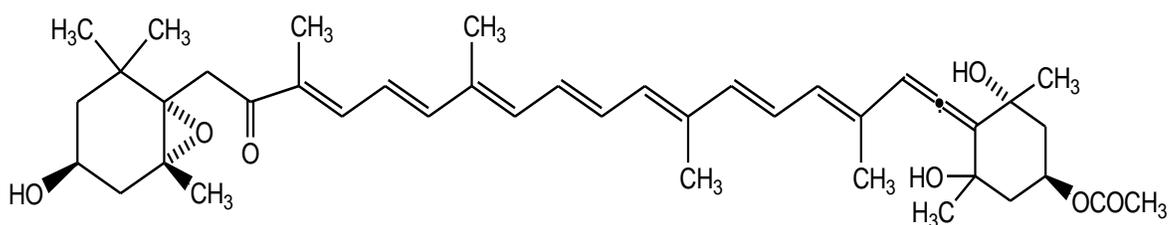
Las paredes celulares de ciertas algas rojas son la única fuente de donde se extraen estos dos carbohidratos polisacáridos de gran importancia económica. Ambas sustancias están químicamente relacionadas y tienen propiedades

suspensivas, emulsionantes, estabilizantes y gelificantes. El agar es conocido por su uso en la preparación de los medios de cultivo para los microorganismos; el carragenato por su empleo en la fabricación de productos lácteos, aunque también se usa en la industria textil, en cosmética, en farmacia y en tipografía. Varias algas rojas, de las cuales la más conocida es el *nori*, son importantes en la dieta de algunos pueblos, especialmente en Japón.

En este tipo de algas la principal especie es *Bostrychia calliptera* que puede llegar hasta el nivel de la máxima marca alta formando mechones colgantes dispuestos hacia el suelo. Otras especies que habitan en la misma asociación son: *Bostrychia tenella*, *Catenella caespitosa*, *Catenella. impúdica* y *Caloglossa stipitata*.

3. Feofíceas (algas pardas)^[23]: Las algas pardas, como las algas rojas, se encuentran principalmente en hábitat marinos. La coloración parda, de tonalidad muy variable, es debida a la presencia de ciertos pigmentos carotenoides, fucoxantinas (Figura 5). También carecen de clorofila b; además de la clorofila a poseen clorofila c.

Figura 5. Estructura Fucoxantinas



Las algas pardas se conocen por su crecimiento rápido, su inmenso tamaño y por sus tejidos relativamente complejos.

En la pared de algunas especies se encuentran coloides denominados alginatos, además muchas algas pardas poseen también interés agropecuario, en la alimentación humana, farmacología y cosmética.

El alginato, un polisacárido que se obtiene de los feofitos, se usa y comercializa del mismo modo que el agar o el carragenato. Las algas pardas son también fuente de vitaminas y minerales y se utilizan como fertilizantes. Algunas especies (como el kobu) constituyen un aporte alimenticio importante, especialmente en la comida japonesa.

Los alginatos son las sales del ácido algínico, polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas, el ácido β -D-manurónico (**M**) y el ácido α -L-gulurónico (**G**). Estos se agrupan en bloques de secuencias **MM**, **MG**, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques **GG**, **GM**, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4).

Las estructuras clásicas de Haworth para los dos monómeros se muestran en la Figura 6, mientras la Figura 7 ilustra las llamadas estructuras de silla que permiten ver en forma más clara el arreglo tridimensional de las moléculas:

Figura 6. Estructuras clásicas de las dos unidades monoméricas del ácido algínico

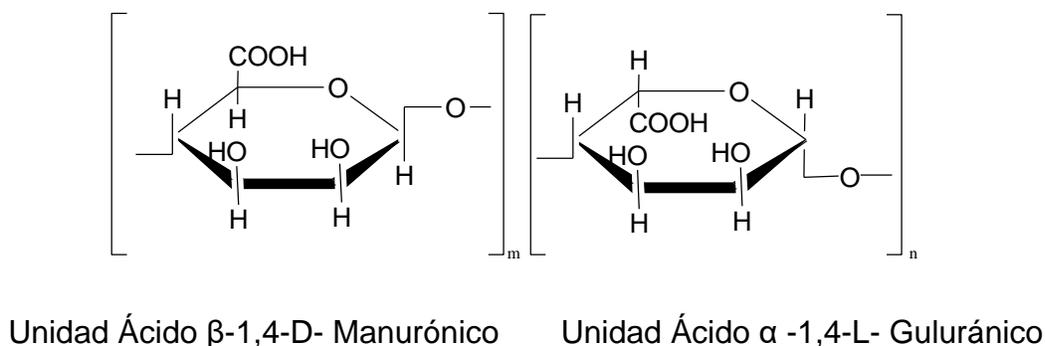
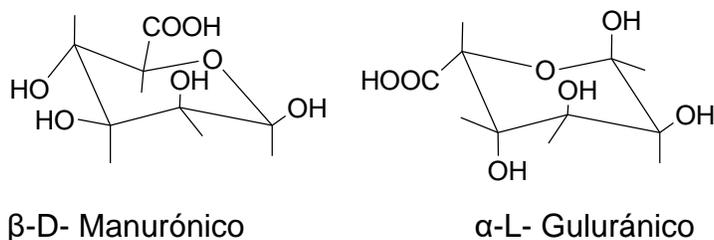


Figura 7. Estructuras en formas de silla

4. Clorofíceas (algas verdes)^[23]. Las algas verdes se asemejan a las plantas superiores en que tienen clorofila a y b además de almidón como material de reserva. La mayoría son unicelulares o coloniales y constituyen una parte importante del plancton de los hábitat de agua dulce. Muchos clorofitos unicelulares se agrupan en filamentos y son visibles como musgo de río o verdín de charca. Las algas verdes de agua dulce más evolucionadas son las carofíceas. En hábitat marinos las más desarrolladas se componen de sifones plurinucleados y alcanzan una longitud de 10 metros. Un género tiene las paredes celulares impregnadas con una forma de carbonato de calcio llamada aragonita y contribuye de modo importante a la formación de los arrecifes de coral. Algunos estudios indican que, probablemente, las carofíceas y otros clorofitos evolucionaron hacia los briofitos y las plantas superiores.

Son algas que han colonizado todos los ambientes, encontrándose el 90% de las especies en agua dulce y el 10% restante en aguas marinas. Las especies de agua dulce tienen una distribución cosmopolita.

Las especies que forman los manglares del Pacífico colombiano pertenecen a cinco familias Rhizophoraceae (*R. mangle*, *R. harrisonii* y *R. racemosa*), Avicenniaceae (*Avicennia germinans*, *A. tonduzii*), Combretaceae (*Laguncularia racemosa*, *Connocarpus erectus*), Theaceae (*Pelliciera rhizophorae*) y Caesalpinaceae (*Mora megistosperma*). Estas especies se distribuyen dependiendo de las características medio ambientales, como amplitud y rango

de protección de las mareas, composición del suelo, oferta de agua dulce, protección de la acción directa del oleaje y del acarreo de arena, flujo de nutrientes, microtopografía y clima entre otros.^[33]

Dentro de los principales organismos que tienen representantes notorios en los manglares del Pacífico colombiano están las Comunidades algales, constituidas por varias especies de algas que viven asociadas a las raíces aéreas de los árboles de mangle rojo o a los pneumatóforos de mangle negro. Las principales especies son las macroalgas: *Chaetomorpha californica* considerada una alga verde perteneciente a la clase Chlorophyceae; *Bostrychia calliptera* y *Catenella impúdica* consideradas algas rojas perteneciente a la clase Rhodophyceae.

1.2. *Bostrychia* Montagne (1842)^[34]

En éste género se encuentran especies de algas muy pequeñas, son generalmente color púrpura y habitan aguas salobres, manglares húmedos y en estuarios, hasta encontrarse en aguas dulces lejos del mar. Crecen sobre rocas, troncos y raíces de mangle. Están en forma colgante pero en partes donde les da poca luz.

1.2.1. *Bostrychia calliptera* (Montagne) Montagne, 1850, *Rhodomela calliptera* Montagne, 1840.^[2,34,35]

Se caracteriza por presentar talos vino-tinto que forman cojinetes de hasta 7cm de largo, ejes rastreros fijos por hápteros formados en la cara inferior de las ramificaciones; los ejes principales son corticados, tienen un diámetro de 450 micrómetros o más, corticados. Células corticales de forma irregular en vista superficial. Ramificaciones de los ejes principales dicótomos o policótomos; ramas laterales menores a 0.5 mm y de inserción dística, corticados en la parte basal y media, polisifónicos hasta los ápices. Segmentos del talo con dos

verticilos de cuatro células pericentrales. Tetraesporangios en estiquídios con ápices atenuados (Schnetter & Bula 1982).

1.2.2. Clasificación Sistemática ^[34]

Tabla 1. Clasificación Sistemática de *Bostrychia calliptera*.

Clasificación	Característica
Reino	Protista
División	Rhodophyta
Clase	Rhodophyceae
Subclase	Florideophycidae
Orden	Ceramiales
Familia	Rhodomelaceae
Género	<i>Bostrychia</i> (Montagne, 1838)
Especie	<i>Bostrychia calliptera</i> (Montagne) Montagne, 1850.

1.2.3. Distribución Mundial ^[34]

Atlántico: Sur América y África.

Pacífico: Norte y Centro América, Sur América, Japón, China y Filipinas y Australia.

1.2.4. Distribución en Colombia ^[34]

Departamento del Chocó: Bahía Cúpica, supralitoral, sobre rocas, cabo corrientes sobre rocas sombreadas, supralitoral.

Departamento del Valle: Bahía de Buenaventura: desembocadura del río Dagua; La Bocana, zona intermareal, sobre raíces de manglares. Isla Gorgona, supralitoral, sobre rocas húmeda y sombreada.

Departamento de Nariño: Isla de Gallo, zona intermareal, sobre rocas; Bahía de Tumaco, zona intermareal.

1.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LAS ALGAS

La biología marina se ha encargado de estudiar los fenómenos que se presentan en los seres marinos, tratando de generalizarlos para establecer sus leyes, y de investigar las causas que los producen.

Todo organismo habita en un medio ambiente determinado, constituido por el conjunto de seres vivos y por los factores físico-químicos que lo rodean e influyen directa o indirectamente sobre él. Si el organismo se encuentra adaptado al medio realizará de manera normal sus funciones. Todos los seres vivos deben alimentarse, respirar, sintetizar nuevas moléculas orgánicas y eliminar los productos metabólicos no requeridos, así como crecer y reproducirse. En el medio acuático se encuentra una serie de factores fisicoquímicos, como son la temperatura, la salinidad, el pH y las corrientes marinas, que intervienen en la distribución y composición de los diferentes organismos en sus aguas.

Sin embargo, el medio oceánico imprime a los seres que lo pueblan toda una serie de características indispensables para su supervivencia. Los vegetales presentan una gran diversidad de tamaños, formas y colores; los microscópicos son los más numerosos y constituyen el fitoplancton, encontrándose entre ellos las diatomeas, los flagelados fotosintéticos y las algas verde-azuladas. Una característica básica de estos organismos es la de presentar pigmentos depositados en organoides celulares, como los cloroplastos y los cromoplastos,

que les permiten realizar procesos fotosintetizadores, y otras es la de arreglar su estructura para presentar mayor superficie de absorción de los rayos solares y para la flotación.

Los vegetales macroscópicos, en su mayoría, pertenecen al grupo de las llamadas algas marinas, que crecen adheridas a firmes sustratos como rocas, conchas, pilotes, etcétera, y que, por lo tanto, están necesariamente confinadas a los continentes e islas, o a zonas superficiales submarinas donde puedan fijarse y tener luz suficiente para realizar la fotosíntesis.

1.4. ANTECEDENTES

1.4.1. De actividad biológica de algas marinas

Dentro de la bibliografía concerniente a la evaluación de la actividad biológica de diversos extractos de algas marinas se reporta:

- Actividad antimicrobial, insecticida, antitubercular y anticancerígena, atribuidas a monoterpenos polihalogenados lineales y cíclicos aislados de *Plocanium chondrococcus* y *ochtodes*.^[36]
- Actividad antibacterial en contra bacterias marinas del hábitat algal, atribuida a compuestos halogenados contenidos en algas del género *Laurencia*.^[37, 38]
- Efectos antitumorales de extractos del alga *Marginisporum crassissimum*.^[39]
- Efectos antitumorales de extractos del alga *Dictyota dichotoma*.^[40]

Con respecto a especies del mismo género es escasa la literatura citada se reporta la actividad antiviral en contra del virus del Herpes y anticoagulante de galactanos sulfatados extraídos del alga *Bostrychia montagnei*.^[41]

1.4.2. De composición de algas del mismo género

Las investigaciones desarrolladas con algas del género *Bostrychia* revelan la presencia de polioles como alditol, dulcitol y sorbitol, carbohidratos de bajo peso molecular como glucosa, fructosa, tetralosa, monoglicerato de sodio.^[42-48]

1.5. PROCESO DE SEPARACIÓN

1.5.1. Cromatografía en Columna ^[29, 49]

Es una técnica que separa uno de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (liquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser liquida o sólida. En la cromatografía en columna se utiliza un tubo cilíndrico, en cuyo interior se coloca la fase estacionaria y a su través se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil a través de la estacionaria se consigue: 1) por presión, 2) por capilaridad, 3) por gravedad ^[29].

1.5.2. Cromatografía en Capa Fina (CCF) o Capa Delgada (CCD) ^[50]

El proceso cromatográfico implica la distribución diferencial de un soluto o sustancia adsorbible entre dos fases, una de las cuales esta inmóvil o estacionaria (adsorbente o papel) y la otra móvil (disolvente o portadores). Así la fase móvil se pone en equilibrio con una porción de la fase estacionaria y luego fluye hacia siguiente porción estacionaria, donde vuelve a ponerse en equilibrio, y a continuación fluye hacia la tercera fase estacionaria y así sucesivamente, alcanzando el equilibrio de reparto en cada uno de ellos. En la separación cromatográfica, el disolvente, el adsorbente y los componentes de la mezcla que se está separando o resolviendo, interaccionan entre si y por ello constituyen un sistema cromatográfico.

Tanto en la cromatografía de adsorción, como en la de reparto, es muy importante la relación entre la velocidad de movimiento del soluto y la velocidad de movimiento del disolvente de desarrollo, o sea la siguiente expresión:

$$R_F = \frac{\text{Velocidad de movimiento del soluto}}{\text{Velocidad de movimiento del disolvente}}$$

1.6. PROCESO DE PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ^[49, 51]

Esta técnica consiste en hacer pasar la fase líquida sobre el sólido soporte o activo a retenido en una columna recta a altas presiones, el pequeño tamaño de partícula de la fase estacionaria que aunque muy empaquetada deja que la fase móvil la atraviese y de esta manera se aumenta la eficacia separativa.

En cromatografía líquida pueden distinguirse dos tipos generales según sea la naturaleza de la fase móvil:

- a) Cromatografía Líquida Normal: en ella la fase móvil es de naturaleza no polar, mientras que la fase estacionaria es fundamentalmente polar.
- b) Cromatografía Líquida en Fase Reversa: en la que la fase móvil es polar y la estacionaria no polar ^[49].

1.7. ANÁLISIS QUÍMICO

1.7.1. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Esta técnica es la herramienta mas poderosa de que se dispone para la determinación de la estructura de los compuestos orgánicos, a través de las variaciones de las posiciones de las absorciones de resonancia magnética nuclear, que se originan en la protección y desprotección de electrones, es decir, los desplazamientos químicos. Como el carbono e hidrógeno son los

componentes principales de las moléculas orgánicas, para los químicos son muy útiles el protón (^1H) y el carbono 13 (^{13}C) y de esta forma los espectros de resonancia magnética nuclear que se interpretan ^[52].

El experimento DEPT tiene en cuenta la población de ^1H para ver las señales de ^{13}C , edita las señales en orden para obtener respuesta de grupos CH, CH₂, y CH₃ de acuerdo al ángulo ϕ ($\pi/2$, $3\pi/2$, $\pi/4$) del pulso ^1H .^[53]

1.7.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear bidimensional

En un aparato de RMN tenemos más de un emisor de frecuencias con lo cual se puede irradiar con varias frecuencias diferentes si fuese necesario, pero también se puede hacer lo que se denominan secuencias de pulsos es decir se irradia la muestra se deja un cierto tiempo para que se relaje parcialmente y vuelve a irradiarse con frecuencias o campos diferentes antes de que acabe de relajarse. También cabe la posibilidad de considerar experiencias en las que la relajación de los núcleos varíe como función de dos tiempos de espera diferentes que van a dar lugar a unos espectros cuya representación debería ser tridimensional y que como convenio o convención se representan mediante curvas de nivel semejantes a los mapas topográficos y que se conocen como RMN bidimensionales. Dependiendo de las secuencias de pulsos usadas y de dichos tiempos de espera entre los pulsos se obtienen diferentes espectros siendo los dos más usados el espectro COSY homonuclear y la correlación heteronuclear (HMQC y HMBC). En el primero de ellos se observan los protones que están relacionados entre sí mediante acoplamientos y en el segundo nos indica que protones se relaciona con que carbono y viceversa en forma directa y a larga distancia.^[53]

2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Los reactivos y equipos empleados en el desarrollo de la metodología para lograr la elucidación estructural de metabolitos contenidos en la fracción de cloruro de metileno del alga *Bostrychia calliptera* se describen a continuación.

2.1.1. Reactivos

REACTIVOS GRADO COMERCIAL Y ANALÍTICO:

- ◆ Metanol, GR ACS, Merck, EM Science, Pureza 99.8%
- ◆ *n*-Hexano, GR ACS, Merck, EM Science, Pureza GC \geq 98.5%.
- ◆ Acetato de Etilo, Merck, EM Science, Pureza 99.8%.
- ◆ Etanol Comercial
- ◆ Etanol absoluto, ACS, Riedel-de Haen, Pureza 99.8%
- ◆ Alcohol butílico normal, Mallicnckrodt, AR, pureza 99.9%
- ◆ Acido acético glacial, Merck, EM Science, Pureza 99.8%.
- ◆ Cloroformo, GR ACS, Merck, EM Science, Pureza 99.8%.
- ◆ Benceno, ACS, Fisher Scientific, Pureza 99%.
- ◆ Placas cromatográficas de silica gel de 20 x 20 cm con indicador de fluorescencia.
- ◆ Theobromina, Eastmar Organic Chemicals.
- ◆ Acido sulfúrico, ACS, Fisher Scientific, Pureza 95.7%.
- ◆ Acido tartárico, Pureza 99.5%
- ◆ Nitrato de bismuto Pureza 99.5%
- ◆ Ninhidrina, Pureza 99.9%
- ◆ Acido bórico, Pureza 99.9%
- ◆ Acido cítrico, Pureza 99.5%
- ◆ Vainillina, Merck, Pureza 99.9%

- ◆ 2,4,6-colidina
- ◆ Catequina, Sigma, Pureza 98%
- ◆ Acido gálico, Sigma.
- ◆ Kieselgel G (Typ 60), Merck.
- ◆ Sephadex G-25, Pharmacia Biotech.
- ◆ Cartucho Waters Sep-Pak Vac 12 cc, Silica 2 g, 1.6x3.0 cm (dxh)

SOLVENTES GRADO HPLC:

- ◆ *n*- Hexano, GR para análisis, Merck, EM Science, Pureza GC ≥ 96 %
- ◆ Acetonitrilo, Mallinckrodt HPLC, Pureza 99.9%.
- ◆ Acetato de Etilo, Merck, EM Science, Pureza 99.8%.
- ◆ Metanol, Fisher Scientific, Pureza 99.9%.

REVELADORES:

- ◆ Ácido Fosfomolibdico: se disuelven de 1.5 a 5.0 g de ácido fosfomolibdico en 100 mL de etanol. Se rocía y calienta a una temperatura entre 125-150°C por 5 minutos.
- ◆ Lieberman-Burchard: 5 mL anhídrido acético y 5 mL ácido sulfúrico concentrado se agregan cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, mientras se enfría en baño de hielo.
- ◆ Dragendorff: mezclar partes iguales de las soluciones a y b.

Solución a: disolver 1.7 g de nitrato de bismuto (III) y 20 g de ácido tartárico en 80 mL de agua.

Solución b: disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua.

- ◆ Ninhidrina: disolver 0.3 g de ninhidrina en 95 mL de 2,4,6-colidina y 5 mL de ácido acético glacial.

- ◆ Reactivo Citrobórico: disolver 5 g de ácido bórico y 5 g de ácido cítrico en 100 mL de etanol.
- ◆ Hidróxido de Potasio 5% en etanol
- ◆ Vainillina – ácido sulfúrico: se asperjan los cromatofolios con la solución I luego con la II se calienta a 110°C por 5 -10 minutos.

Solución I. ácido sulfúrico al 5% en etanol

Solución II. Vainillina al 1% en etanol.

- ◆ Reactivo de Baljet: mezclar partes iguales de a y b.

Solución a: disolver 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol.

Solución b: disolver 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.

2.1.2. Equipos

- ◆ Lámpara UV, Spectroline E-Series, proporciona longitud de onda larga y corta (365 y 254 nm).
- ◆ Espectrofotómetro Ultravioleta- visible GENESIS 6.
- ◆ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC), Hewlett Packard 1100 Series que consta de :
 - Desgasificador G1322A
 - Bomba Cuaternaria G1311A
 - Detector UV G1314A
 - Puerto de Inyección G1328-95001
 - Software: Instrument Online
- ◆ Columna Cromatográfica μ -porasil, 3.9 x 300 mm, Grupo funcional: silica, Tamaño de partícula nominal 10 μ m, Diámetro medio de poro 125Å.

- ◆ Columna Cromatográfica Hypersil ODS C₁₈ 4,0 x 250 mm, Tamaño de partícula nominal 5 µm.
- ◆ Secador Manual, Black & Decker, 9756, Type 2, 260°C/550°C.
- ◆ Horno Isotemp Oven, Modelo 737G, Fisher Scientific.
- ◆ Lavorota 4001 Heidolph.
- ◆ Extractor Gases y Humos, Modelo C180X Standard.
- ◆ Liofilizador Labconco.
- ◆ Espectrómetro Broker AMX-400 MHz.

2.2. METODOLOGÍA

Para realizar la elucidación de la estructura química de los metabolitos contenidos en la fracción de cloruro de metileno del alga *Bostrychia calliptera* fue indispensable llevar a cabo una metodología constituida por un proceso de separación, purificación y elucidación estructural de las sustancias puras a través de análisis químico.

Para llevar a cabo cada uno de estos procesos se tenía como material de partida la fracción de cloruro de metileno que fue obtenida en un estudio previo después de realizar los siguientes pasos:

2.2.1. Identificación del Organismo ^[21]

Especie: *Bostrychia calliptera*

Familia: Rhodomelaceae

Color: verde claro.

Aspecto: fibroso.

Olor: hierba seca, poco penetrante.

2.2.2. Proceso de Recolección

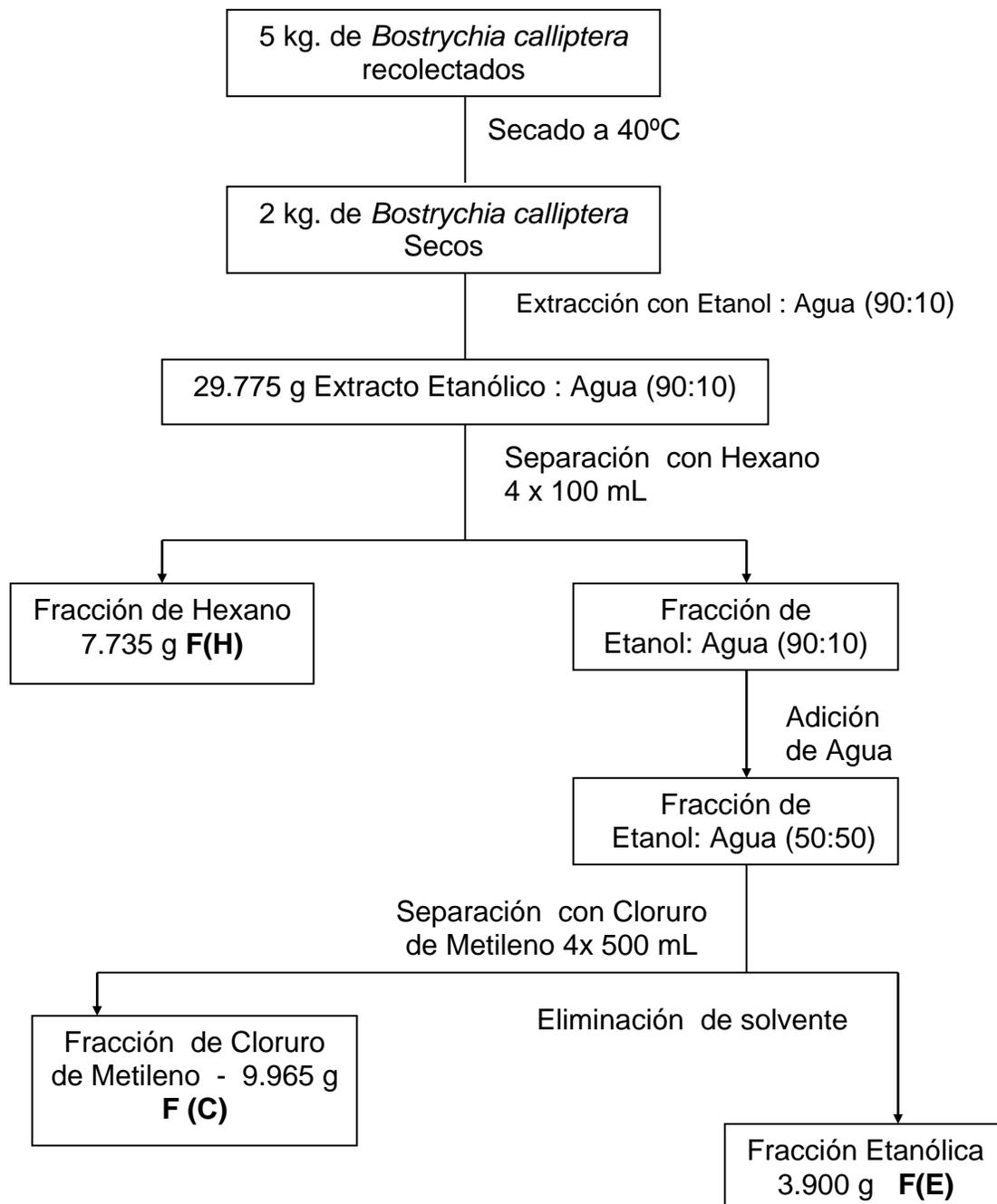
Las muestras de *B. calliptera* (Figura 8) fueron recolectadas en la Bahía de Buenaventura (3° 54' N, y 77° 5' W) durante los meses de Junio del 2003 hasta Agosto de 2003, en marea baja y en forma manual, por el Biólogo *Enrique Peña* de la Universidad del Valle. Las muestras se lavaron con agua desmineralizada y se envolvieron en toallas de papel humedecido con agua desmineralizada, se empacaron en bolsas de polietileno y se transportaron al laboratorio. Después de su identificación y recolección se conservó ésta especie en la sede de biología marina de la Universidad del Valle [21].

Figura 8. *Bostrychia calliptera* en raíces.



2.2.3. Proceso de Extracción

Figura 9. Proceso de extracción del alga BC



Las fracciones obtenidas en éste proceso fueron almacenadas a una temperatura de -6°C.

2.2.4. Proceso de Separación

El proceso de separación se llevó a cabo a través de sucesivos montajes de cromatografía líquida en columna (CC), empleando diferentes fases estacionarias, variando la altura y el diámetro de la columna, por medio de elución a gravedad (para Sephadex G-25) o con presión (para kieselgel G) y modificando la composición de la fase móvil. Las CC realizadas consistieron en hacer pasar la muestra a separar a través de la fase estacionaria elegida empleando una fase móvil, de tal forma que el eluido de la columna se recolectaba cada 5 mL aproximadamente en diferentes tubos, hasta liberar por completo los compuestos retenidos por la fase estacionaria. Este proceso fue seguido a través de CCF sobre silica gel usando como reveladores luz UV (254 y 365 nm) y ácido fosfomolibdico, permitiendo establecer de esta forma la respectiva unión de los volúmenes eluidos y finalmente las fracciones obtenidas tras la separación.

La fracción de cloruro de metileno (9.897g) fue fraccionada por cromatografía líquida en columna empleando como fase estacionaria kieselgel G de 2.9 cm x 25 cm (d x h), y como fase móvil hexano, acetato de etilo y etanol, con elución en gradiente, obteniendo: 1.084g de subfracción de hexano (SFCH), 4.1700g de subfracción de acetato de etilo (SFCAE) y 0.735g de subfracción de etanol (SFCE).

670mg de SFCAE se fraccionaron a través de kieselgel G de 2.5 cm x 20 cm (d x h) con una elución en gradiente desde Hexano: acetona (7:3) hasta Etanol, obteniendo ocho subfracciones: SFCAE₁ – SFCAE₈ con diferentes valores de R_f en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano: Acetona (1:1).

10.8mg de SFCAE₁ se fraccionaron a través de un cartucho de silica gel de 1.6 cm x 3.0 cm (d x h) con una elución en gradiente con hexano y acetato de etilo

obteniendo siete subfracciones SFCAE_{1,1} –SFCAE_{1,7} con diferentes valores de Rf en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano : Acetato de etilo (7:5).

220mg de SFCAE₆ se fraccionaron a través de kieselgel G de 2.5 cm x 23 cm (d x h) con una elución en gradiente desde Hexano hasta Acetato de etilo, obteniendo doce subfracciones: SFCAE_{6,1} – SFCAE_{6,12} con diferentes valores de Rf en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano : Acetato de etilo (7:5).

108mg de SFCAE_{6,9} se fraccionaron a través de kieselgel G de 1.5 cm x 14 cm (d x h) con una elución en gradiente con Hexano, Acetato de etilo y metanol, obteniendo ocho subfracciones: SFCAE_{6,9,1} – SFCAE_{6,9,8} con diferentes valores de Rf en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano : Acetato de etilo (7:5).

907mg de SFCAE se fraccionaron a través de kieselgel G de 2.5 cm x 28.6 cm (d x h) con una elución en gradiente con Hexano, acetato de etilo y etanol, obteniendo ocho subfracciones: SFCAE_{1*} – SFCAE_{8*} con diferentes valores de Rf en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (7:5).

194.7mg de SFCAE_{5*} se fraccionaron a través de sephadex G-25 de 1.9 cm x 28.3 cm (d x h) con una elución en gradiente desde etanol: agua (2:8) hasta etanol, obteniendo cinco subfracciones: SFCAE_{5*-1} – SFCAE_{5*-5} con diferentes valores de Rf en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (4:7).

178mg de SFCAE_{6*} Señores: fraccionaron a través de kieselgel G de 2.5cmx21.5cm (dxh) con una elución en gradiente con Hexano, acetato de etilo y etanol, obteniendo siete subfracciones: SFCAE_{6*-1} – SFCAE_{6*-7} con diferentes valores de Rf en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (7:5).

94.6mg de SFCAE_{6*-5} se fraccionaron a través de kieselgel G de 1.5 cm x 11.8 cm (d x h) con una elución en gradiente con Hexano, acetato de etilo y etanol,

obteniendo cuatro subfracciones: SFCAE_{6*-5,1} – SFCAE_{6*-5,4} con diferentes valores de R_f en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (7:5).

1.1789g de SFCAE se fraccionaron a través de sephadex G-25 de 2.9 cm x 31.5 cm (d x h) con una elución en gradiente desde etanol: agua (2:8) hasta etanol: agua (8:2), obteniendo seis subfracciones: SFCAE_{1**} – SFCAE_{6**} con diferentes valores de R_f en CCF desarrolladas con una mezcla de Hexano: Acetato de etilo (4:7).

270mg de SFCE se fraccionaron a través de sephadex G-25 de 2.9 cm x 31.5 cm (d x h) con una elución isocrática de Etanol: agua (4:7), obteniendo cuatro subfracciones: SFCE₁ – SFCE₄ con diferentes valores de R_f en CCF desarrolladas con una mezcla de Etanol: Agua (4:7).

El fraccionamiento de las subfracciones SFCAE y SFCE descrito anteriormente, se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones empleadas en el fraccionamiento de las subfracciones SFCAE y SFCE

Subfracción	Cantidad (mg)	Dimensiones de columna dxh (cm x cm)	Modo de Elución	Fase Móvil	Fase Estacionaria	Subfracciones obtenidas	Fase Móvil en CCF	Reveladores de CCF
SFCAE	670	2.5 x 20	Gradiente	Hexano: acetona (7:3) hasta etanol	Kieselgel G	SFCAE ₁ – SFCAE ₈	Hexano : acetona (1:1)	Luz UV a 254nm Luz UV a 365nm Ácido Fosfomolíbdico
SFCAE ₁	10.8	1.6 x 3.0		Hexano hasta acetato de etilo	Sílica gel	SFCAE _{1,1} – SFCAE _{1,7}	Hexano: acetato de etilo (7:5)	
SFCAE ₆	220	2.5 x 23			Kieselgel G	SFCAE _{6,1} – SFCAE _{6,12}		
SFCAE _{6,9}	108	1.5 x 14		Hexano, acetato de etilo y metanol		SFCAE _{6,9,1} – SFCAE _{6,9,8}		
SFCAE	907	2.5 x 28.6		Hexano, acetato de etilo y etanol	SFCAE _{1*} – SFCAE _{8*}			
SFCAE _{5*}	194.7	1.8 x 28.3		Etanol:agua(2:8) hasta etanol	Sephadex G-25	SFCAE _{5*-1} – SFCAE _{5*-5}	Hexano: acetato de etilo (4:7)	
SFCAE _{6*}	178	2.5 x 21.5		Hexano, acetato de etilo y etanol	Kieselgel G	SFCAE _{6*-1} – SFCAE _{6*-7}	Hexano: acetato de etilo (7:5)	
SFCAE _{6*-5}	94.6	1.5 x 11.8				SFCAE _{6*-5,1} – SFCAE _{6*-5,4}		
SFCAE	1178.9	2.9 x 31.5	Etanol:agua (2:8) hasta etanol:agua (8:2)	Sephadex G-25	SFCAE _{1**} – SFCAE _{6**}	Hexano: acetato de etilo (4:7)		
SFCE	270	2.9 x 31.5	Isocrática	Etanol:agua (4:7)		SFCE ₁ – SFCE ₄	Etanol:Agua 4:7	

2.2.5. Pruebas Fitoquímicas Preliminares

Se llevó a cabo el desarrollo del reconocimiento de grupos funcionales: alcaloides, cardiotónicos, cumarinas volátiles, flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos y/o esteroides, derivados antracénicos libres, de la subfracción de Acetato de Etilo (SFCAE), a través del análisis por cromatografía en capa fina, empleando como adsorbente sílica gel.^[54]

Para el análisis por CCF de cada uno de los grupos funcionales se empleó las fases móviles y sistemas de detección descritos en la tabla 3. El resultado se clasifica como positivo o negativo al comparar la coloración que presenten las manchas observadas en la placas cromatográficas con la coloración esperada reportada en la literatura.^[54]

Tabla 3. Fases móviles y sistemas de detección para el reconocimiento de grupos funcionales por CCF.

GRUPO FUNCIONAL	FASE MÓVIL	SISTEMA DE DETECCIÓN	COLORACIÓN ESPERADA
Alcaloides	Cloroformo: Acetato de etilo (8:2) Metanol: Acetato de etilo (1:1)	Revelador de Dragendorff	Roja o naranja
Cardiotónicos	Acetato de etilo: metanol: agua (10:13.5:10)	Reactivo de Baljet (solución alcalina de ácido pícrico)	Roja, naranja-rojiza, o violeta
Cumarinas volátiles	Acetato de etilo	Uv-365nm	Intensa fluorescencia azul, marrón o azul verdosa
		Hidróxido de Potasio 5%	Se intensifican las zonas que muestran fluorescencia azul
Flavonoides	Cloroformo: Acetato de etilo (60:40)	UV-254nm	Fluorescencia, se ven zonas azules oscuras sobre fondo amarillo de la placa
		UV-365nm	Puede ser fluorescencia amarilla, azul o verde
		Reactivo citrobórico	Azul o azul violeta
Taninos	Cloroformo: Metanol: Acido acético (90:10:1)	Cloruro Férrico	Púrpura
		Vainillina-ácido sulfúrico	
Saponinas	n-Butanol: ácido acético: agua (50:10:40)	Vainillina-ácido sulfúrico	Azul o azul violeta, algunas pueden dar coloración amarilla
Triterpenos y/o esteroides	Benceno: Acetato de etilo (86:14)	Liebermann-Burchard	Cualquier tonalidad de rojo, azules o verdes
Derivados antracénicos libres	Acetato de etilo: Metanol: agua (100:17:13)	Luz visible	Antraquinonas: rojo, Antronas y antranoles: amarillo.
		UV- 365nm	Fluorescencia amarilla o rojo marrón
		Hidróxido de Potasio 5%	Se intensifican

2.2.6. Proceso de Purificación

Teniendo en cuenta los valores de R_F en CCF, la polaridad y el peso, las subfracciones analizadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) fueron:

Tabla 4. Subfracciones analizadas en HPLC

Subfracción	Disolvente	Modo de HPLC	Columna Cromatográfica
SFCAE ₂	Acetato de Etilo	Fase Normal	μ -porasil
SFCAE ₁	Acetato de Etilo	Fase Normal	μ -porasil
SFCAE _{1,1-21}	Acetato de Etilo	Fase Normal	μ -porasil
SFCAE _{6*,6}	Acetato de Etilo	Fase Normal	μ -porasil
SFCAE _{2**}	Acetato de Etilo	Fase Normal	μ -porasil
SFCAE _{5*-3}	Acetato de Etilo	Fase Normal	μ -porasil
SFCAE _{2**}	Metanol	Fase Reversa	C ₁₈
SFCE ₂	Metanol	Fase Reversa	C ₁₈

Antes de inyectar las subfracciones en el HPLC, se estableció las respectivas longitudes de onda máximas realizando un barrido en el espectrofotómetro de UV-Vis.

Para obtener las fracciones puras a través de HPLC, las subfracciones se disolvieron y se filtraron a través de una membrana de teflón de 0.45 μ m. Posteriormente se inyectó cada una de las muestras y a través de ensayo y error se establecieron las condiciones de trabajo: flujo óptimo, longitud de onda, tiempo de corrida y fase móvil (las fases móviles para las fracciones inyectadas en fase normal fueron determinadas por CCF sobre silica gel y para las fracciones inyectadas en fase reversa por ensayo y error). Después, bajo las condiciones de trabajo se inyectó la cantidad de muestra total recolectando el eluido (fluido proveniente de la columna) manualmente en el intervalo de tiempo en que se registraba el pico respectivo al componente de la muestra separada en el cromatograma. El eluido que contenía la fase móvil y el componente de la muestra se rotaevaporó hasta eliminación total del solvente aplicando una temperatura

máxima de 42 °C y una presión de 500 mmHg, se pesó y finalmente se redisolvió para verificar el grado de purificación, inyectando bajo las mismas condiciones en HPLC el eluido correspondiente y/o por CCF.

2.2.7. Análisis Químico

Las subfracciones purificadas a través de HPLC fueron rotaevaporadas en viales a una temperatura de 40 °C y 500 mmHg de presión por un tiempo de 5 horas, posteriormente se hizo pasar un flujo de nitrógeno o helio gaseoso por un tiempo de 30-45 minutos, se tapó y rotulo el respectivo vial. Finalmente estos fueron enviados a la Universidad Santiago de Compostela (España) para el análisis espectroscópico de RMN mono y bidimensional.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Proceso de Separación y Purificación

Del proceso de extracción del alga *Bostrychia calliptera* se obtuvo tres fracciones de diferente polaridad: apolar (hexano), medianamente polar (cloruro de metileno) y polar (etanol). Sin embargo, éste estudio es preliminar y sólo se considera la fracción de cloruro de metileno para llevar a cabo el proceso de separación y purificación.

La separación de la fracción de cloruro de metileno del alga *BC* a través de kieselgel, empleando hexano, acetato de etilo y etanol como fase móvil permitió inicialmente retener los compuestos de tendencia polar los cuales tienen mayor interacción con los grupos silanoles ($\equiv\text{Si-OH}$) superficiales contenidos en la fase estacionaria y eluir los compuestos de menor polaridad con el hexano; posteriormente se eluyó aquellos compuestos de mediana polaridad con acetato de etilo y finalmente se eluyó con etanol los compuestos polares retenidos. De esta forma se obtuvo tres subfracciones.

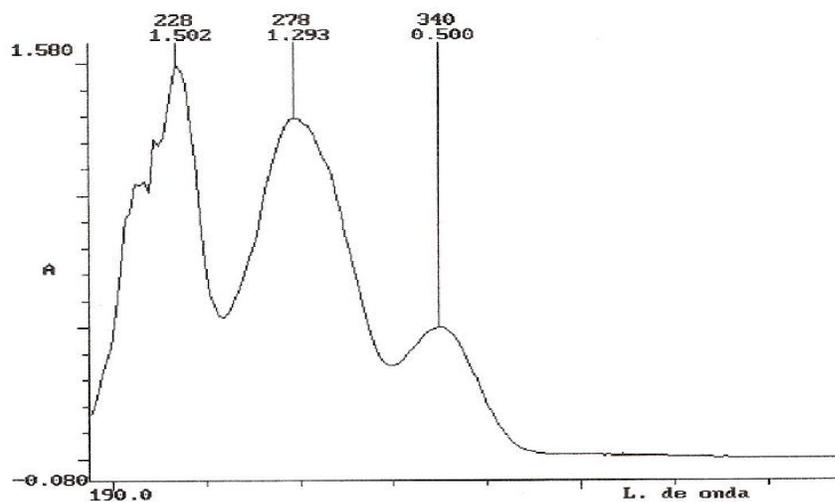
Se continuó el proceso de separación con la subfracción de acetato de etilo (SFCAE) teniendo en cuenta que fue la subfracción de mayor peso y de polaridad intermedia. Al fraccionar 670 mg de ésta sobre kieselgel y una elución en gradiente con hexano: acetona (7:3), acetona y etanol, se recolectaron volúmenes de elución de aproximadamente 6 mL, desarrollando CCF con fase móvil de hexano: acetona (1:1) para establecer las correspondientes uniones de los volúmenes, obteniendo de esta forma ocho subfracciones (Tabla 5). En CCF se empleó como reveladores luz UV de 254 y 365 nm y como sustancias reveladoras se evaluó ácido fosfomolibdico, ninhidrina, Lieberman – Burchard, logrando resultados satisfactorios empleando ácido fosfomolibdico debido a que éste es un revelador general, mientras que ninhidrina y Lieberman-Burchard evidencian la presencia de aminoácidos y esteroides insaturados.^[55]

Tabla 5. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE

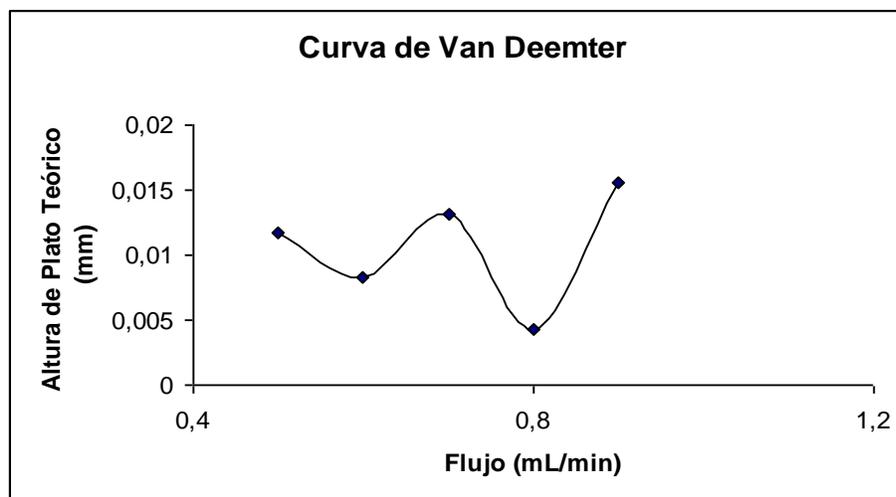
Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Color	Aspecto
100mL Hexano:acetona (7:3)	SFCAE ₁	10.8	Verde oscuro	Aceitoso
100mL Hexano:acetona (6:4)	SFCAE ₂	34.7	Verde oscuro	
80mL Hexano:acetona (5:5)	SFCAE ₃	51.0	Verde oscuro	
80mL Hexano:acetona (4:6)	SFCAE ₄	39.0	Verde oscuro	
80mL Hexano:acetona (3:7)	SFCAE ₅	32.0	Café	
60mL Acetona	SFCAE ₆	220	Café	
200mL etanol	SFCAE ₇	96.0	Café	
	SFCAE ₈	163	Café	

Para el desarrollo de las placas cromatográficas de las siguientes separaciones se modificó la fase móvil empleada de Hexano: acetona (1:1) por la mezcla hexano: acetato de etilo (7:5) debido a que se observó variación en los resultados por cambios en la concentración de la mezcla debidos a la alta presión de vapor de la acetona, observando con la nueva fase móvil un buen grado de separación de SFCAE.

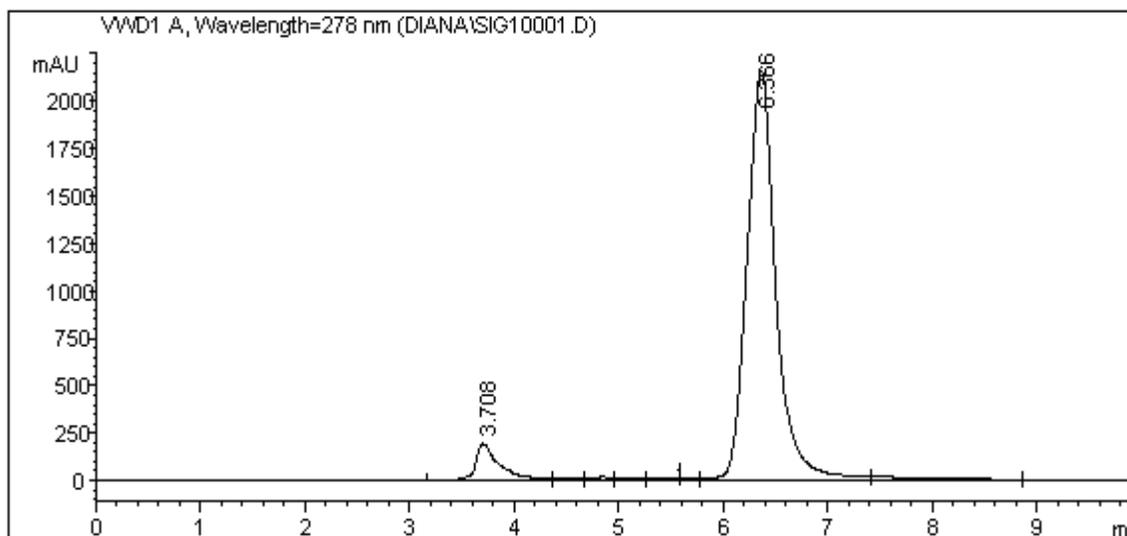
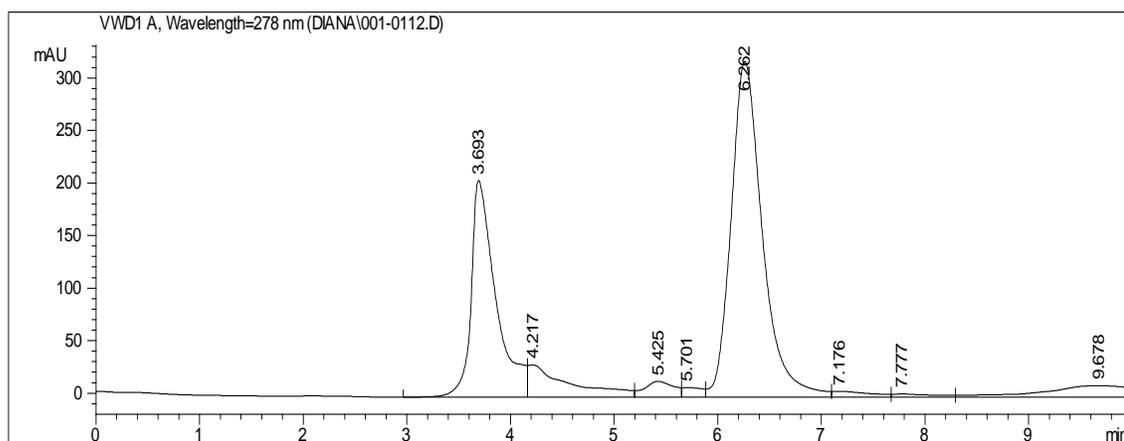
Inicialmente se consideró la subfracción SFCAE₂ para llevar a cabo su purificación por HPLC en fase normal; a través del desarrollo de una placa de CCF sobre silica gel se estableció como fase móvil hexano: acetato de etilo (58:42), el barrido por espectrofotometría en acetato de etilo registró tres longitudes de onda de absorción: 228, 278 y 340 nm (Figura 10). Sin embargo al inyectar la subfracción a una concentración de 5.83 mg/mL a las tres longitudes de onda se estableció como máximo de absorción 278 nm por presentar mayor intensidad los picos y menos ruido, y como tiempo de corrida 10 minutos. Bajo estas condiciones se inyectó la solución a diferentes flujos (Curva de Van Deemter) y se estableció el flujo óptimo como 0.8 mL/min (mínimo en la curva), Tabla 6 y Figura 11.

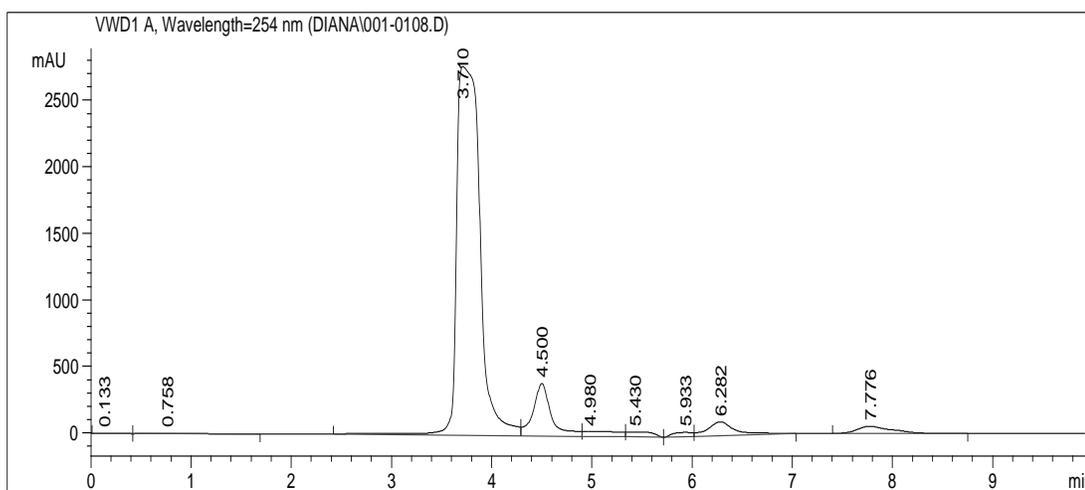
Figura 10. Espectro UV de SFCAE₂**Tabla 6.** Altura de Plato Teórico y flujo para la curva de Van Deemter de SFCAE₂

Flujo (mL/min)	Altura Plato Teórico (mm)
0.5	0.0117
0.6	0.00826
0.7	0.0132
0.8	0.00427
0.9	0.0156

Figura 11. Curva de Van Deemter para SFCAE₂

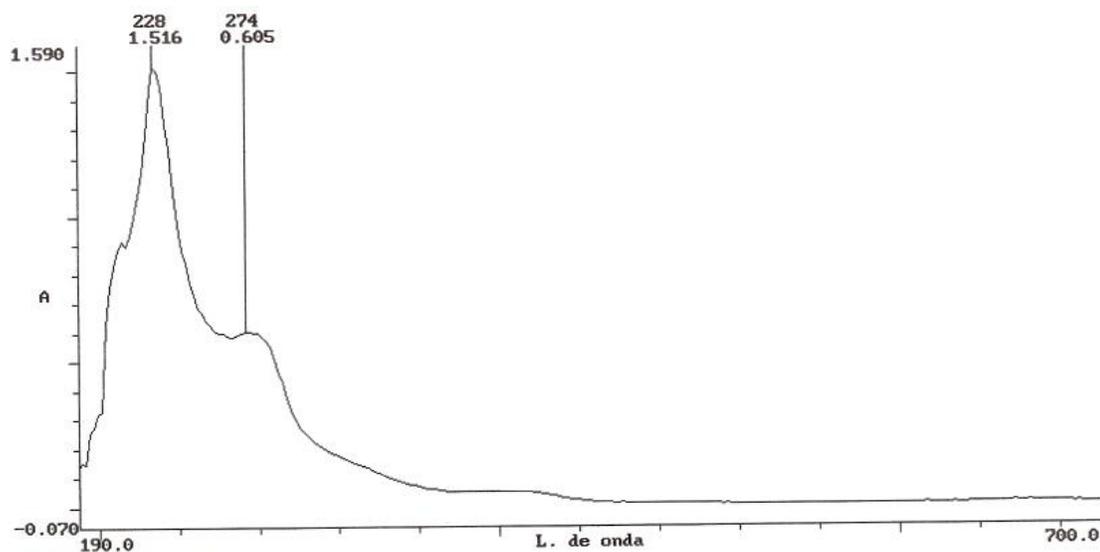
El cromatograma registrado para la subfracción (Figura 12) mostró un pico intenso a un tiempo de retención de alrededor de 6.3 minutos que se recolectó y posteriormente para verificar el grado de purificación se desarrollo CCF en hexano: acetato de etilo (7:5) paralelo a la subfracción SFCAE₂ de partida, observándose una sola mancha cuyo valor de R_F era 0.50, ésta se rotaevaporó y su peso fue de 8.6 mg; seca se almacenó a una temperatura de 11 °C hasta el momento en que se fuera a realizar el análisis espectroscópico. Pese a todas estas precauciones de almacenamiento en el momento de enviar la muestra a análisis de RMN nuevamente se desarrolló CCF empleando la misma fase móvil indicando la presencia de más de un compuesto, lo que permitió concluir que la subfracción sufrió una degradación producida por la luz porque este fue el único parámetro que incidió continuamente, por lo cual fue necesario inyectar nuevamente la subfracción, pero en el cromatograma se observó un pico a 3.7 minutos mas intenso que es característico de polipropileno que es el material del sello del rotor del puerto de inyección. Además debido a que la placa CCF mostró una mancha intensa cuando se reveló con luz UV de 254 nm, se inyectó la subfracción a esta longitud de onda para intentar la purificación bajo este parámetro, y el cromatograma registrado (Figura 13), mostró el pico de 3.7 minutos más intenso y la presencia de más picos, los cuales se recolectaron y al ser concentrados se desarrollo CCF con la fase móvil de trabajo y se inyectó cada uno de los eluidos en HPLC bajo las mismas condiciones, cuyos cromatogramas (Anexo 1) revelaron que no se logró la separación debido a la interferencia constante del desgaste del sello del rotor por el empleo de solventes apolares.

Figura 12. Cromatograma de subfracción SFCAE₂.**Figura 13.** Cromatograma de subfracción SFACE₂ degradada a longitudes de onda de (a).278nm (b). 254nm.**(a)**



(b)

Por consiguiente, el proceso de purificación de la subfracción SFCAE₂ no se continuó debido a su contaminación causada por el desgaste del sello del rotor, esto ocasionó que se considerara la subfracción SFCAE₁ por presentar manchas con R_F similares en CCF a la SFCAE₂. Esta subfracción presentó longitudes de onda de absorción a 228 y 274 nm (Figura 14). Debido a que la cantidad de masa de ésta era baja (10.8 mg) se realizó una separación a través de un cartucho de silica gel con el fin de obtener una subfracción pura con sólo este proceso, como la placa de CCF de la subfracción SFCAE₁ con fase móvil hexano: acetato de etilo (7:5) mostró manchas con valores de R_F de 0.92, 0.82, 0.78, 0.59, 0.31, se evaluó mezclas de hexano: acetato de etilo con mayor proporción de hexano, para establecer la mejor fase móvil a emplear en la separación, de tal forma que inicialmente fueran eluidos los compuestos de mayor tendencia apolar y que al ser inyectados en HPLC para verificar su grado de purificación presentaran menores tiempos de retención. La fase móvil empleada fue hexano: acetato de etilo (8:2) obteniendo siete subfracciones (SFCAE_{1,1} – SFCAE_{1,7}), sin embargo, al inyectar estas y la subfracción inicial en HPLC fase normal a 274 nm que fue su longitud de onda de máxima absorción, a un flujo de 0.8 mL/min, no se observó la presencia de picos significativos (Anexo 2).

Figura 14. Espectro UV de SFCAE₁

Después se consideró la subfracción SFCAE₆ (220 mg), la cual se sometió a separación sobre Kieselgel G por medio de una elución en gradiente con hexano y acetato de etilo obteniendo doce subfracciones SFCAE_{6,1} – SFCAE_{6,12}, (Tabla 7) con diferentes valores de R_F en CCF. Esta subfracción fue analizada por espectroscopia de RMN ¹³C, ¹H, (Figuras 15 y 16) con el fin de predecir el tipo de sustancias que podían estar contenidas en ella; los espectros muestran señales a desplazamientos entre 6.00 y 8.00 ppm en RMN ¹H y entre 126.00 y 136.00 ppm en RMN ¹³C correspondientes a sistemas aromáticos.

Figura 15. Espectro RMN ^1H de subfracción SFCAE₆

Figura 16. Espectro RMN ^{13}C de subfracción SFCAE₆

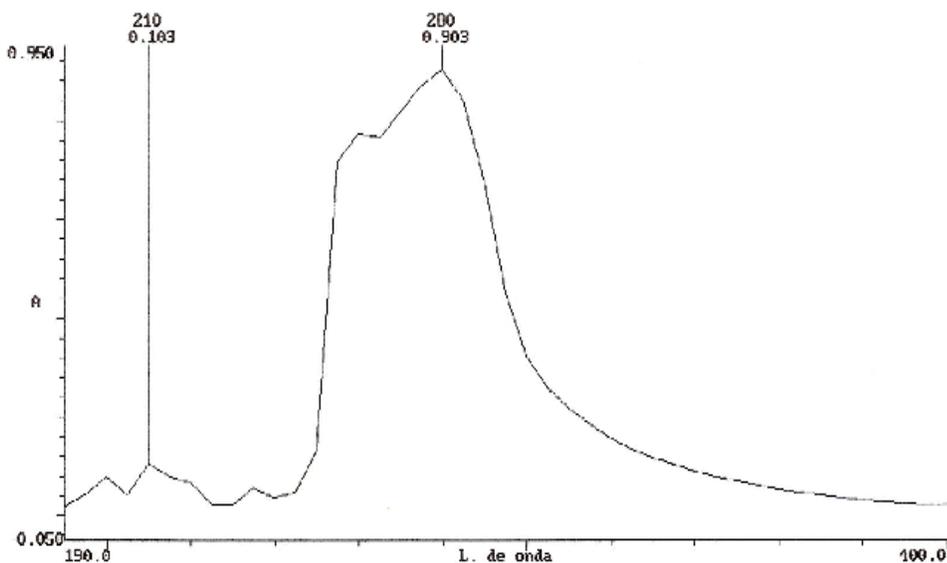
Tabla 7. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE₆

Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Aspecto
40mL Hexano	SFCAE _{6,1}	5.40	Aceitoso
18mL Hexano:acetato de etilo (9:1)	SFCAE _{6,1}	2.90	
15mL Hexano:acetato de etilo (8,5:1,5)	SFCAE _{6,3}	8.40	
15mL Hexano:acetato de etilo (8:2)	SFCAE _{6,4}	3.80	
15mL Hexano:acetato de etilo (7,5:2,5)	SFCAE _{6,5}	5.00	
15mL Hexano:acetato de etilo (7:3)	SFCAE _{6,6}	5.10	
15mL Hexano:acetato de etilo (7:4)	SFCAE _{6,7}	2.10	
5mL Hexano:acetato de etilo (6:5)	SFCAE _{6,8}	20.7	
5mL Hexano:acetato de etilo (5:5)	SFCAE _{6,9}	108	
5mL Hexano:acetato de etilo (4:6)	SFCAE _{6,10}	15.6	
5mL Hexano:acetato de etilo (2:8)	SFCAE _{6,11}	21.4	
10mL Acetato de etilo	SFCAE _{6,12}	19.9	

La subfracción inicial (SFCAE₆) presentó valores de R_F de 0.85, 0.68, 0.51, 0.26 en CCF desarrollada con una fase móvil de hexano: acetato de etilo (7:5) y como longitud de máxima absorción 280 nm (Anexo 3). La subfracción SFCAE_{6,9} (108 mg) obtenida del proceso de separación, se sometió a fraccionamiento bajo las condiciones que se describen en la tabla 8, teniendo en cuenta que el análisis de ésta por CCF mostró compuestos con valores de R_F bajos, lo que indicó que presentaba cierta tendencia polar, debido a la proporción de la fase móvil en que se desarrollo (Hexano: Acetato de etilo, 7:5), de esta forma se generaron ocho subfracciones SFCAE_{6,9,1} – SFCAE_{6,9,8}, de las cuales la subfracción SFCAE_{6,9,6} mostró una sola mancha en CCF con un R_F de 0.26 al ser revelada con luz UV y ácido fosfomolibdico, y un espectro de absorción tomado en acetato de etilo con dos longitudes de onda: 210 nm y 280 nm como máxima de absorción (Figura 17), permitiendo establecer que hubo separación, por lo que ésta subfracción fue almacenada para posteriormente ser analizada por RMN.

Tabla 8. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE_{6,9}

Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Aspecto
8mL Hexano	SFCAE _{6,9,1}	7.90	Aceitoso
10mL Hexano:acetato de etilo (9:1)	SFCAE _{6,9,2}	3.50	
10mL Hexano:acetato de etilo (8,5:1,5)	SFCAE _{6,9,3}	6.00	
10mL Hexano:acetato de etilo (8:2)	SFCAE _{6,9,4}	1.80	
10mL Hexano:acetato de etilo (7,5:2,5)	SFCAE _{6,9,5}	8.80	
10mL Hexano:acetato de etilo (7:3)	SFCAE _{6,9,6}	13.4	
10mL Hexano:acetato de etilo (7:4)	SFCAE _{6,9,7}	21.4	
10mL Hexano:acetato de etilo (6:5)	SFCAE _{6,9,8}	44.1	
10mL Hexano:acetato de etilo (5:5)			
10mL Hexano:acetato de etilo (4:6)			
10mL Hexano:acetato de etilo (2:8)			
18mL Acetato de etilo			
20mL Metanol			

Figura 17. Espectro UV de SFCAE_{6,9,6}

Seguidamente, se abordó nuevamente la subfracción SFCAE (907 mg) que presentó dos longitudes de onda de absorción de luz a 205 nm y 280 nm (Anexo 4), empleando un gradiente de polaridad con hexano, acetato de etilo y etanol sobre kieselgel G, se eluyó ocho subfracciones SFCAE_{1*} - SFCAE_{8*} (Tabla 9), de éstas se

consideró la subfracción SFCAE₆* (178 mg) por observarse más limpia en CCF desarrollada con hexano: acetato de etilo (7:5) y por presentar valores de R_F de: 0.36, 0.24, 0.12, 0.07 indicando la presencia de compuestos de tendencia polar.

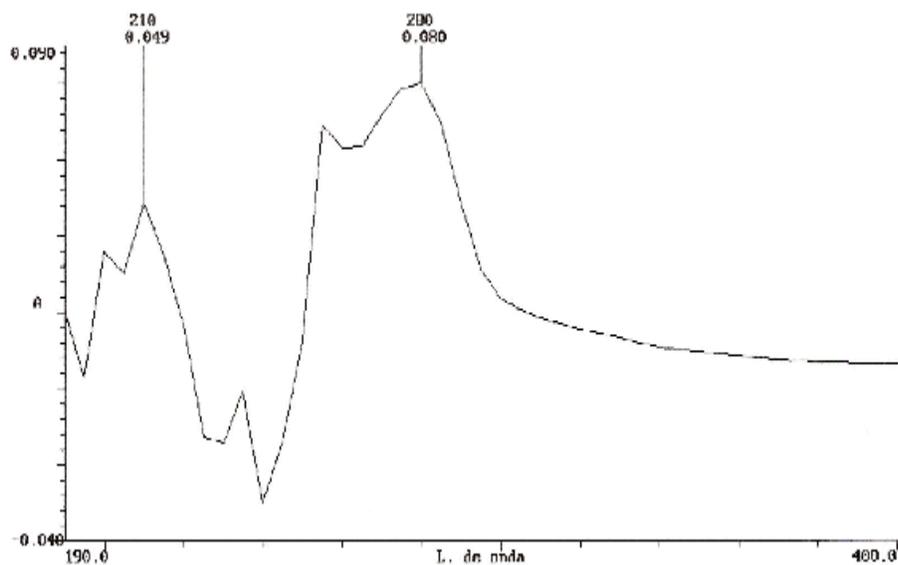
Tabla 9. Subfracciones obtenidas en el segundo proceso separación en CC de SFCAE

Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Aspecto
45mL Hexano 30mL Hexano:acetato de etilo (9:1) 30mL Hexano:acetato de etilo (8,5:1,5) 40mL Hexano:acetato de etilo (8:2) 50mL Hexano:acetato de etilo (7,5:2,5) 50mL Hexano:acetato de etilo (7:3) 50mL Hexano:acetato de etilo (7:4) 50mL Hexano:acetato de etilo (7:5) 50mL Hexano:acetato de etilo (6:5) 50mL Hexano:acetato de etilo (5:5) 50mL Hexano:acetato de etilo (4:6) 50mL Hexano:acetato de etilo (2:8) 50mL Acetato de etilo 20mL Etanol	SFCAE ₁ *	31.5	Aceitoso
	SFCAE ₂ *	30.4	
	SFCAE ₃ *	44.7	
	SFCAE ₄ *	172	
	SFCAE ₅ *	252	
	SFCAE ₆ *	178	
	SFCAE ₇ *	48.2	
	SFCAE ₈ *	141	

La subfracción SFCAE₆* (color café) cuyo espectro UV registró como longitudes de onda de absorción: 200, 225, 255, 280 nm (Anexo 5), se separó por kieselgel G con hexano, acetato de etilo y etanol con elución en gradiente obteniendo siete fracciones SFCAE₆*-1 – SFCAE₆*-7 (Tabla 10). De estas la subfracción SFCAE₆*-4 registro un R_F de 0.36 en CCF desarrollada con hexano: acetato de etilo (7:5), empleando como reveladores luz UV y ácido fosfomolibdico y un espectro UV-Vis tomado en acetato de etilo con longitudes de onda de absorción de 210 y 280 nm (Figura 18), indicando que hubo separación, por lo que se almacenó para posteriormente realizar su análisis de RMN.

Tabla 10. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE₆*

Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Color	Aspecto	
10mL Hexano 10mL Hexano:acetato de etilo (9:1) 10mL Hexano:acetato de etilo (8,5:1,5) 10mL Hexano:acetato de etilo (8:2) 20mL Hexano:acetato de etilo (7,5:2,5) 20mL Hexano:acetato de etilo (7:3) 20mL Hexano:acetato de etilo (7:4) 20mL Hexano:acetato de etilo (7:5) 20mL Hexano:acetato de etilo (6:5) 10mL Hexano:acetato de etilo (5:5) 20mL Hexano:acetato de etilo (4:6) 10mL Hexano:acetato de etilo (2:8) 10mL Acetato de etilo 20mL Etanol	SFCAE ₆ *-1	8.80	Amarilla	Aceitoso	
	SFCAE ₆ *-2	2.60	Amarilla		
	SFCAE ₆ *-3	3.60	Amarilla		
	SFCAE ₆ *-4	6.60	Amarilla		
	SFCAE ₆ *-5	94.6	Amarilla		
	SFCAE ₆ *-6	18.8	Café verdosa		
	SFCAE ₆ *-7	43.2	Amarilla		
					verdosa

Figura 18. Espectro UV de SFCAE₆*-4

La subfracción SFCAE₆*-5 (94.6 mg) se separó sobre kieselgel G con elución en gradiente empleando hexano, acetato de etilo y etanol; se obtuvo 4 subfracciones SFCAE₆*-5,1 – SFCAE₆*-5,4 (Tabla 11).

Tabla 11. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE_{6*5}

Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Aspecto
8mL Hexano	SFCAE _{6*5,1}	11.5	Aceitoso
8mL Hexano:acetato de etilo (9:1)			
8mL Hexano:acetato de etilo (8,5:1,5)	SFCAE _{6*5,5}	8.5	
8mL Hexano:acetato de etilo (8:2)			
10mL Hexano:acetato de etilo (7,5:2,5)	SFCAE _{6*5,3}	9.5	
15mL Hexano:acetato de etilo (7:3)			
15mL Hexano:acetato de etilo (7:4)			
15mL Hexano:acetato de etilo (7:5)	SFCAE _{6*5,4}	64.1	
10mL Hexano:acetato de etilo (6:5)			
8mL Hexano:acetato de etilo (5:5)			
5mL Hexano:acetato de etilo (4:6)			
15mL Acetato de etilo			
8mL Etanol			

Se intentó la purificación de las subfracciones SFCAE_{6*5,3}, SFCAE_{6*6}, SFCAE_{6*7}, empleando como fase móvil hexano: acetato de etilo (58:42) pero nuevamente fue mas intenso el pico registrado en los cromatogramas debido a la solubilización de los compuestos contenidos en el sello del rotor y en las placas de CCF desarrolladas de los eluidos correspondientes a cada pico, las cuales registraron una mancha intensa de igual R_F al ser reveladas con ácido fosfomolibdico. Esto se pudo confirmar al desarrollar una placa CCF de los eluidos de cada pico en paralelo a la fracción eluida de inyecciones de hexano y acetato de etilo con la misma fase móvil, lo que permitió establecer que dicha mancha correspondía a compuestos del sello del rotor del puerto de inyección del equipo de HPLC que eran arrastrados por los solventes al estar en contacto.

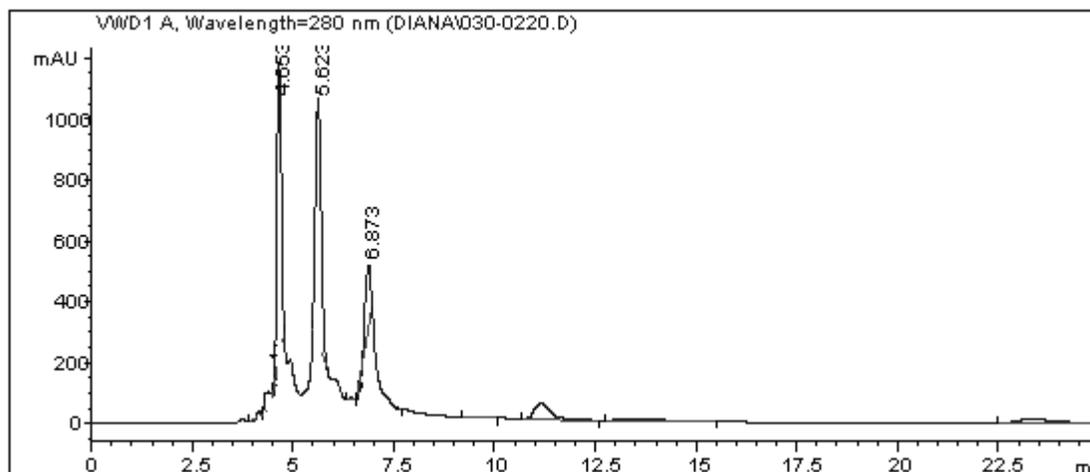
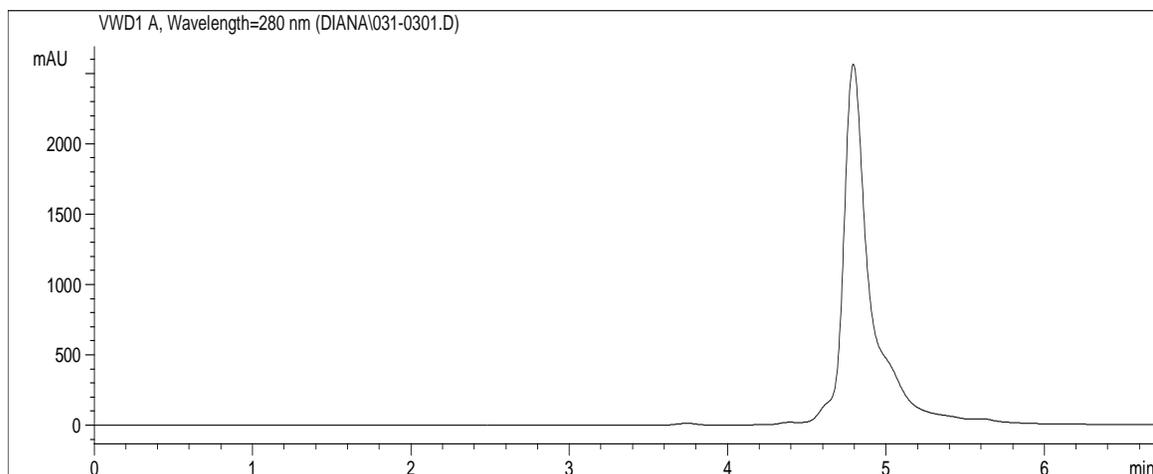
Para evaluar otro tipo de fase estacionaria en cromatografía en columna se fraccionó SFCAE_{5*} (194.7 mg) a través de Sephadex G-25 la cual por medio del empleo de solventes polares permite realizar una separación por peso molecular,

primero eluyen los compuestos que superan el rango de fraccionamiento del relleno (1000-5000 Dalton); la placa de CCF desarrollada con hexano: acetato de etilo (4:7) mostró manchas con valores de R_F 0.75, 0.58, 0.38, 0.27. Este fraccionamiento se llevo a cabo con etanol y agua obteniendo cinco subfracciones SFCAE_{5⁺-1} – SFCAE_{5⁺-5} (Tabla 12).

Tabla 12. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE_{5⁺}

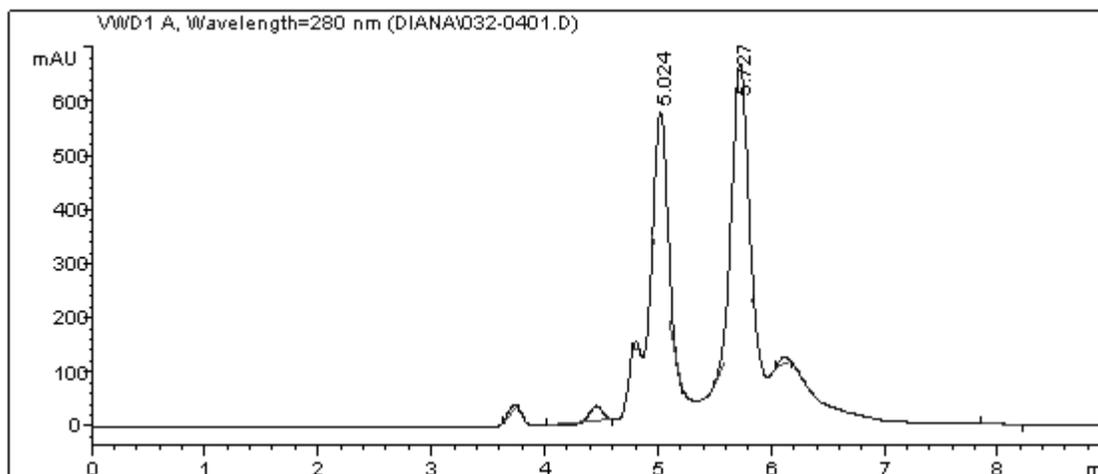
Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Aspecto
Etanol: Agua (2:8) Etanol: Agua (5:5) Etanol: Agua (8:2) Etanol	SFCAE _{5⁺-1}	8.60	Aceitoso
	SFCAE _{5⁺-2}	5.80	
	SFCAE _{5⁺-3}	38.3	
	SFCAE _{5⁺-4}	21.1	
	SFCAE _{5⁺-5}	94.3	

Se inyectó la subfracción SFCAE_{5⁺-3} disuelta en acetato de etilo, de la cual se tenía una cantidad de masa considerable, empleando como fase móvil constante hexano: acetato de etilo (32:68) establecida por ensayos en CCF, a una longitud de onda de 280 nm y con tiempo de corrida de 25 minutos. El cromatograma (Figura 19) registró picos intensos a 4.7, 5.6 y 6.8 minutos los cuales se recolectaron y los eluidos se inyectaron en HPLC bajo las mismas condiciones evidenciando el grado de purificación de los respectivos picos. Al inyectar el eluido del compuesto cuya señal se registró a 4.7 minutos, se observó un único pico definido (Figura 20), cuyo tiempo de retención indica que presenta una tendencia polar debido a que la fase móvil esta constituida en mayor proporción por acetato de etilo cuya fuerza eluotrópica permite que la fase estacionaria no los retenga o interaccione con él con mucha fortaleza. La cantidad de masa purificada fue de 2.6 mg con la cual se realizó el análisis espectroscópico de RMN.

Figura 19. Cromatograma subfracción SFCAE_{5⁺-3}**Figura 20.** Cromatograma pico de 4.7 minutos purificado de subfracción SFCAE_{5⁺-3}

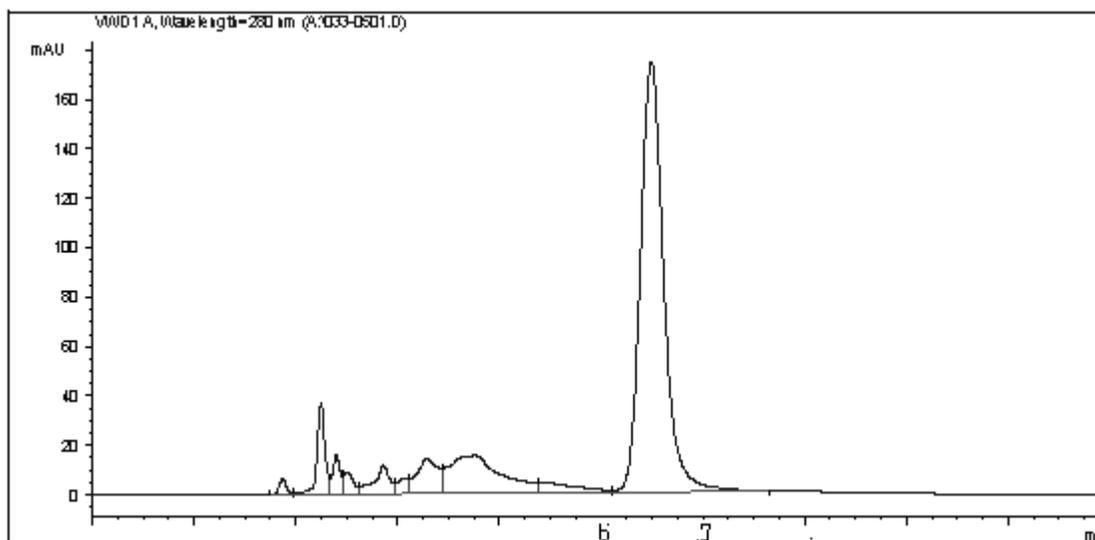
Cuando se inyectó el eluido correspondiente al pico de 5.6 minutos, el cromatograma registrado (Figura 21) permitió determinar que no hubo purificación ya que se observó la presencia de otros compuestos a tiempos de retención menores.

Figura 21. Cromatograma pico de 5.6 minutos recolectado del proceso de purificación de subfracción SFCAE_{5⁺-3}



La inyección del eluido del pico de 6.8 minutos comprobó la purificación de éste, el cromatograma (Figura 22) registró un pico definido e intenso, cuyo peso de 4.6mg permitió realizar posteriormente su análisis espectroscópico. Los picos de menores tiempos de retención no se consideran significativos.

Figura 22. Cromatograma pico de 6.8 minutos purificado de subfracción SFCAE_{5⁺-3}



Con el fin de ensayar el proceso de purificación en HPLC fase reversa, se sometió 1.1789 g de subfracción SFCAE a una separación por Sephadex G-25 con elución en gradiente compuesta por etanol y agua, obteniendo seis subfracciones SFCAE₁** - SFCAE₆**, establecidas por CCF desarrolladas en una mezcla de Hexano: acetato de etilo (4:7). Se inyectó la subfracción SFCAE₂** (1.9 mg/mL) eluyendo con una fase móvil de Agua: Metanol (70:30), a un flujo de 0.8 mL/min, en un tiempo de corrida de 25 minutos, establecidos por ensayo y error, y a una longitud de onda de 280 nm, obteniendo un cromatograma (Figura 23) que registró varios picos, de los cuales se recolectó el eluido correspondiente al pico de 5.1 min, sin embargo al inyectar éste bajo las mismas condiciones se establece que no hubo separación porque se observan varios picos de baja intensidad (Figura 24).

Figura 23. Cromatograma de subfracción SFCAE₂** inyectada en fase Reversa

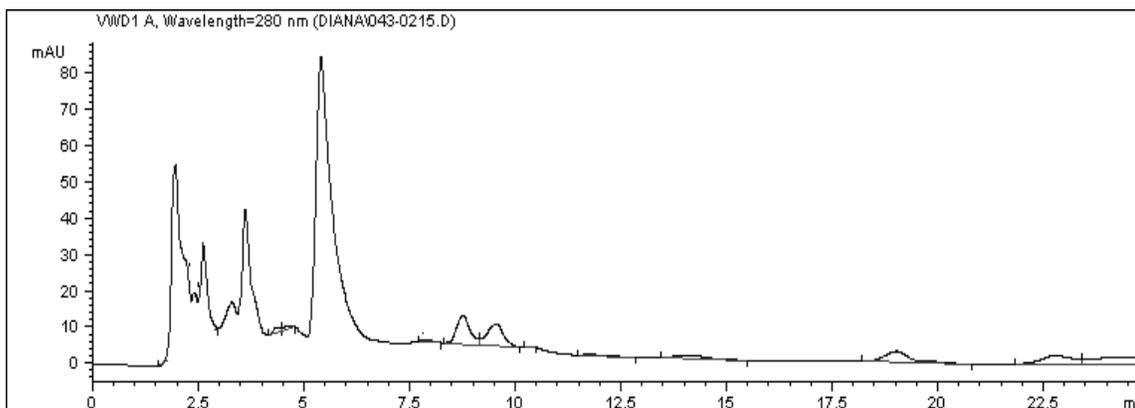
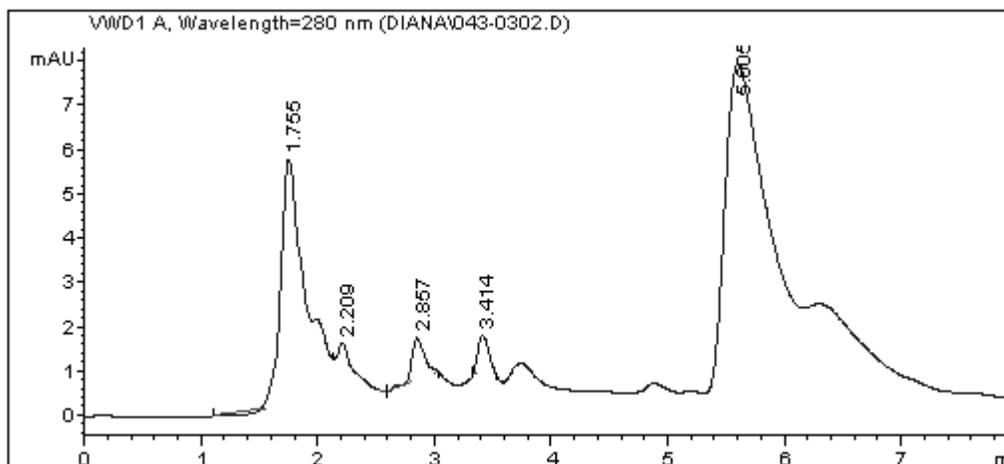


Figura 24. Cromatograma de pico de 5.1 minutos recolectado del proceso de purificación de subfracción SFCAE₂**



De este fraccionamiento también se inyectó en HPLC la subfracción SFCAE₂** (6.34 mg/mL) con una fase móvil de hexano acetato de etilo (32:68), a una longitud de onda de 280 nm y en un tiempo de corrida de 30 minutos. El cromatograma exhibió picos intensos a tiempos de retención de 4.09, 4.4, 4.9, 5.3 y 6.7 minutos (Figura 25); los eluidos de estos picos se recolectaron y se inyectaron bajo las mismas condiciones, generando cromatogramas con picos relativamente definidos y resueltos pero de pequeña cantidad de masa (1.7, 1.7, 1.5, 1.1, 2.0 mg respectivamente) que imposibilitó el análisis por RMN (Figura 26).

Figura 25. Cromatograma subfracción SFCAE₂** inyectada en fase Normal

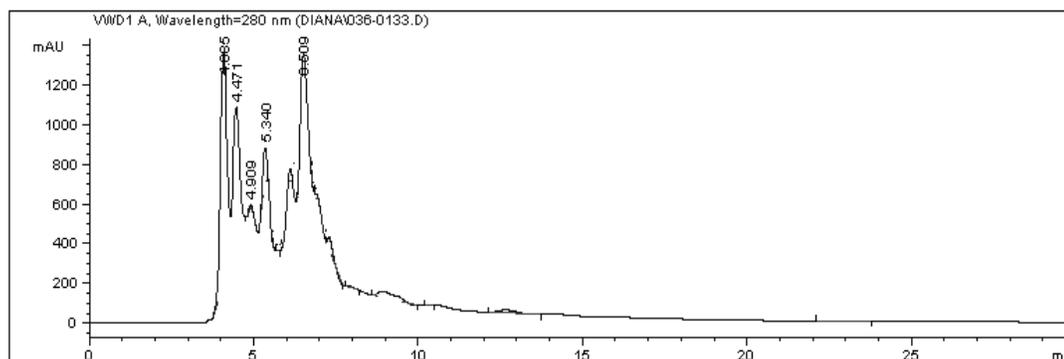
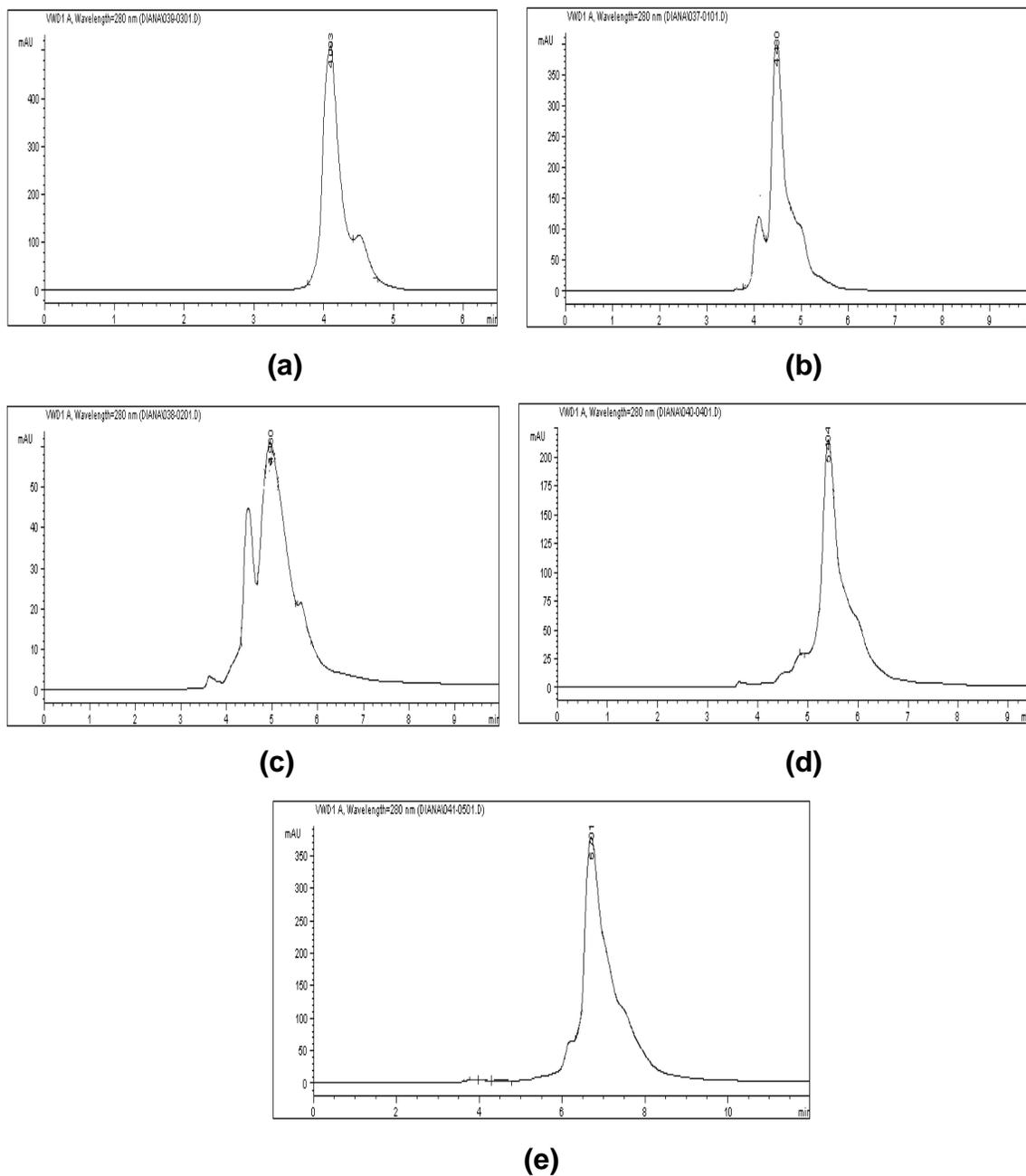


Figura 26. Cromatograma picos recolectados del proceso de purificación de subfracción SFCAE₂** en HPLC fase Normal (a). 4,09 min (b). 4,4 min (c). 4,9 min (d). 5,3 min (e). 6.7 min.



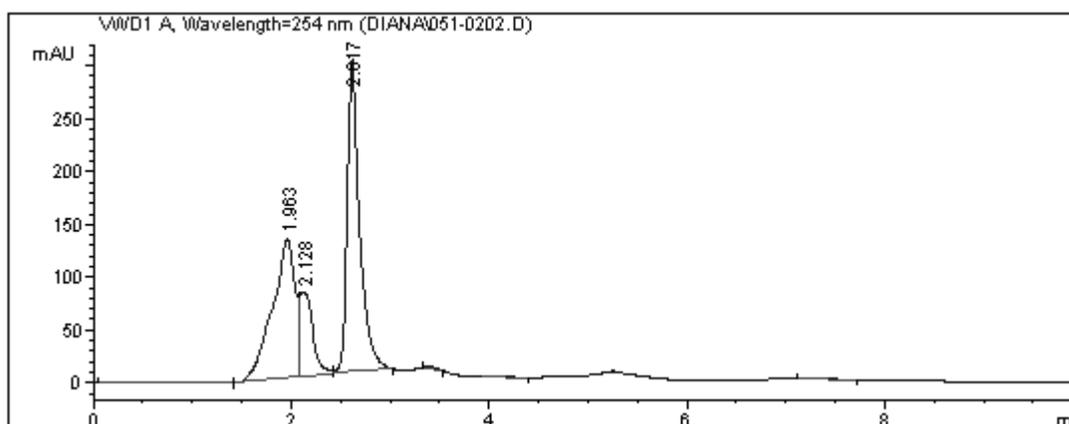
También se consideró la subfracción etanólica SFCE, 270 mg se fraccionaron por una columna de Sephadex G-25 con una elución isocrática de composición etanol: agua (4:7) recogiendo 4 subfracciones SFCE₁-SFCE₄ (Tabla 13).

Tabla 13. Subfracciones obtenidas en la separación en CC de SFCAE

Fase Móvil	Subfracción	Peso (mg)	Aspecto
Etanol: Agua (4:7)	SFCE ₁	13.7	Aceitoso
	SFCE ₂	155	
	SFCE ₃	25.8	
	SFCE ₄	75.0	

La subfracción SFCE₂ se inyectó en HPLC fase reversa a un flujo de 0.8 mL/min, a una longitud de 254 nm y con elución isocrática empleando metanol: agua (36:64); estos parámetros se establecieron a través de ensayo y error. El cromatograma que se registró (Figura 27) muestra un pico intenso a 2.6 minutos y, sin embargo es necesario realizar otro proceso de purificación en HPLC, por lo que esta fracción es almacenada para un estudio posterior.

Figura 27. Cromatograma Subfracción SFCE inyectada en fase reversa



3.2. Pruebas Fitoquímicas Preliminares

En las pruebas fitoquímicas preliminares se analizó la presencia o ausencia de aquellos metabolitos secundarios que están ampliamente distribuidas en los organismos y que están relacionadas con alguna o varias actividades biológicas. Por ello fueron seleccionados los siguientes: alcaloides, cardiotónicos, cumarinas volátiles, flavonoides, saponinas, triterpenos, derivados antracénicos libres y taninos. Sin embargo, estas pruebas también fueron realizadas con el fin de obtener información de forma general acerca de la constitución química del alga.

Teniendo en cuenta que el proceso de purificación se llevó a cabo con subfracciones obtenidas de SFCAE, y que la cantidad de muestra obtenida de aquellas subfracciones purificadas fue muy poca, se consideró la subfracción de partida (SFCAE) y por la misma razón las pruebas realizadas fueron desarrolladas en CCF, donde la cantidad de muestra necesaria es menor que las pruebas realizadas en tubo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14. Para que estos fueran confiables, el desarrollo de las respectivas placas cromatográficas fue realizado en paralelo con sustancias patrón que en ese momento se tenían a disposición, así que, se empleo colchicina y teobromina para la detección de alcaloides, catequina para flavonoides, ácido gálico para taninos, saponina para saponinas, hidroquinona para derivados antracénicos, y colesterol para triterpenos y esteroides. El resultado de estas pruebas depende de la coloración que presente las zonas obtenidas después de la separación - sobre silica gel usando como fase móvil una mezcla de sustancias que ya han sido establecidas- al ser reveladas con luz ultravioleta o con sustancias químicas específicas ^[54]. De acuerdo a las coloraciones observadas se puede establecer que la subfracción SFCAE contiene taninos, saponinas, triterpenos, derivados antracénicos libres y chalconas o flavonoles^[56] que son los tipos de flavonoides que se revelan como fluorescencia al exponerlos a luz UV de

365nm; se puede deducir que estos metabolitos secundarios son sintetizados por el alga como respuesta a la influencia de diferentes factores relacionados con su hábitat, como son la temperatura, el pH, la salinidad, presencia de otros organismos, etc. Sin embargo no es posible afirmar con total certeza como tampoco se puede descartar la presencia de los otros metabolitos como son los alcaloides, cardiotónicos y cumarinas ya que sería necesario realizar las pruebas en tubo donde se emplea mayor cantidad de muestra y por lo tanto se incrementa la sensibilidad; además que se deberían considerar extractos o fracciones de diferente polaridad del alga que puedan ser usados de acuerdo a la solubilidad que presenten los compuestos a identificar y así aumentar la sensibilidad y confiabilidad de los resultados, que de igual forma también permitirían hacer una estimación cuantitativa de cada grupo de metabolitos.

La presencia de estos grupos de metabolitos secundarios permite proponer al alga *Bostrychia calliptera* como un organismo con compuestos activos potenciales, y múltiples propiedades para ofrecer al medio las cuales están por investigar. Esto se afirma considerando aquellas investigaciones que han demostrado la actividad biológica de este tipo de compuestos como son: antibacterianas, antitumorales, antimicrobiana.

Tabla 14. Resultados de las Pruebas Fitoquímicas de SFCAE.

GRUPO FUNCIONAL	SISTEMA DE DETECCIÓN	RESULTADO EXPERIMENTAL
Alcaloides	Revelador de Dragendorff	Negativo
Cardiotónicos	Reactivo de Baljet (solución alcalina de ácido pícrico)	Negativo
Cumarinas volátiles	Uv-365nm	Negativo
	Hidróxido de Potasio 5%	
Flavonoides	UV-254nm	Negativo
	UV-365nm	Positivo
	Reactivo citrobórico	Negativo
Taninos	Cloruro Férrico	Positivo
	Vainillina-ácido sulfúrico	
Saponinas	Vainillina-ácido sulfúrico	Positivo
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	Positivo
Derivados antracénicos libres	Luz visible	Positivo
	UV- 365nm	Positivo
	Hidróxido de Potasio 5%	Positivo

3.3. Análisis Espectroscópico

La subfracción **SFCAE**_{6,9,6} se aisló prácticamente puro por CC como un aceite café.

El espectro RMN ¹H (Figura 28) mostró a campo bajo cinco señales entre 5.40 y 6.52 ppm que son características de protones oleofínicos, una señal a 4.21 ppm de un protón metínico geminal a un grupo hidroxilo, una señal singlete a 3.66 ppm que integra para tres característica de protones del grupo metóxilo, la señal a 7.26 ppm es característica de los protones residuales del grupo metino que se encuentran en el cloroformo deuterado que fue empelado para la toma del espectro. A campo alto se observó señales entre 1.31 y 2.34 ppm características de protones metilénicos y una señal a 0.98ppm que integra para tres correspondiente a protones metílicos.^[53]

Figura 28. Espectro RMN ^1H de subfracción SFCAE_{6,9,6}.

El espectro de RMN ^{13}C de este compuesto (Figura 29) mostró 17 señales de carbono cuyas multiplicidades se dedujeron a través de un experimento DEPT (Figura 30). Las resonancias de carbonos a 35.41, 34.06, 29.46, 29.03, 27.67, 24.88, 20.73 ppm corresponden a grupos metilénicos ($-\text{CH}_2$), a 135.19, 135.04, 132.87, 127.75, 125.82, 123.77, 72.11 ppm resuenan grupos metinos ($-\text{CH}$), a 51.4, 14.18 ppm resuenan grupos metilos ($-\text{CH}_3$) y a 174.30 ppm resuena un carbono cuaternario. El triplete alrededor de 77 es característico de CDCl_3 . Las resonancias a 174.30, 72.11, 51.4 y 14.18 ppm sugieren la presencia de un grupo COO^- , C-OH , CH_3O^- y $\text{CH}_3\text{-R}$ respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de RMN ^{13}C , ^1H , HMQC, HMBC de SFCAE_{6,9,6}.

No.	δ^a_{C}	δ^a_{H} (J en Hz)	Integral	HMQC	COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$	HMBC
1	51.44	3.66, s	3	H-1		
2	174.30					H1, H3, H4
3	35.41	2.34, m	2	H-3	H3 – H4	
4	24.88	1.60, m	2	H-4	H4 – H5	H3
5	29.46	1.32, m	2	H-5		H6
6	27.67	2.18, m	2	H-6	H6 – H5	
7	123.77	5.41, m, 7.28, 11.0	1	H-7	H7 – H6	
8	127.75	5.97, t, 11.0	1	H-8	H8 – H7	
9	125.82	6.52, td, 4.08, 11.0, 15.2	1	H-9	H9- H8	
10	135.04	5.69, dd, 6.37, 15.2		H-10	H10 – H11	
11	72.11	4.21, d, 5.42	1	H-11b	H11b- H12	H12
12	34.08	2.32, dd, 7.2, 7.5	2	H-12		H16
13	132.87	5.40, m, 7.2, 10.7	1	H-13	H13- H12	
14	135.19	5.56, m, 10.7	1	H-14	H14 – H13 H14 – H15	H15, H17
15	20.73	2.06, m	2	H-15	H15 – H16	H17
16	29.03	1.31, m	2	H-16		
17	14.18	0.98, m	3	H-17		H15

^a desplazamientos en ppm.

Figura 29. Espectro RMN ^{13}C de subfracción SFCAE_{6,9,6}.

Figura 30. Espectro DEPT de subfracción SFCAE_{6,9,6}.

Los experimentos bidimensionales HMQC (Figura 31) y COSY ^1H - ^1H (Figura 32) permitieron establecer las correspondientes correlaciones carbono-hidrógeno y protón-protón. De esta forma, se confirmó que la señal a un δ 51.44 ppm estaba directamente unido a los protones de δ 3.66 y por lo tanto constituyen un grupo metilo unido a un átomo de oxígeno. Así mismo, se pudo determinar que los protones a desplazamientos de 5.41, 5.97, 6.52, 5.69, 5.40, 5.56 ppm estaban directamente unidos a los carbonos oleofínicos que se registran a desplazamientos de 123.77, 127.75, 125.82, 135.04, 132.87, 135.19 ppm respectivamente.

El experimento COSY ^1H - ^1H permitió establecer las uniones adecuadas de los sistemas carbono-protón formados con HMQC, a través de las correlaciones protón-protón, para de esta forma proponer el fragmento de la Figura 33. Así, los protones a desplazamiento de 2.34 ppm se correlacionan con los de δ 1.60 ppm, estos a su vez se correlacionan con los de δ 1.32 ppm y así sucesivamente. El valor de las constantes de acoplamiento para los protones metínicos a desplazamientos de 5.41 y 5.97 ppm de 11.0 Hz y para los de desplazamiento a 5.40 y 5.56 ppm de 10.7 Hz (Tabla 15), demuestran la presencia de sistemas oleofínicos alifáticos con isomería geométrica *Z* ya que están alrededor de 11.00 Hz que es el valor teórico. Mientras que los protones a δ 6.52 y 5.69 ppm registran una constante de acoplamiento de 15.2 Hz, que indica una isomería *E* para este sistema oleofínico.

El fragmento ya constituido se unió al grupo metoxilo ya propuesto, a través del carbono cuaternario (δ 174.30 ppm) cuyo desplazamiento corrobora la existencia de un grupo éster, para finalmente proponer la estructura de la Figura 34.

Figura 31. Espectro HMQC de subfracción SFCAE_{6,9,6}.

Figura 32. Espectro COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de subfracción SFCAE_{6,9,6}.

Figura 33. Fragmento de la subfracción SFCAE_{6,9,6} formado empleando los experimentos HMQC y COSY.

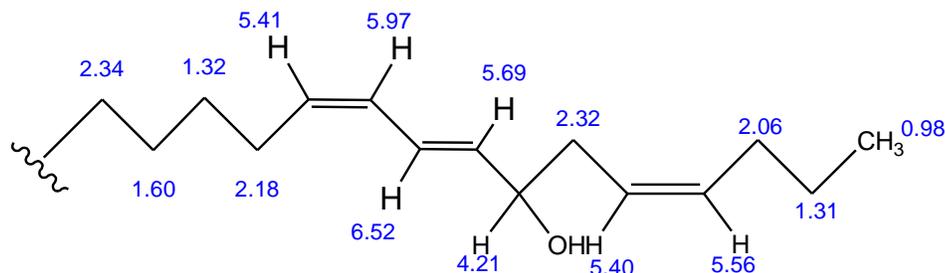
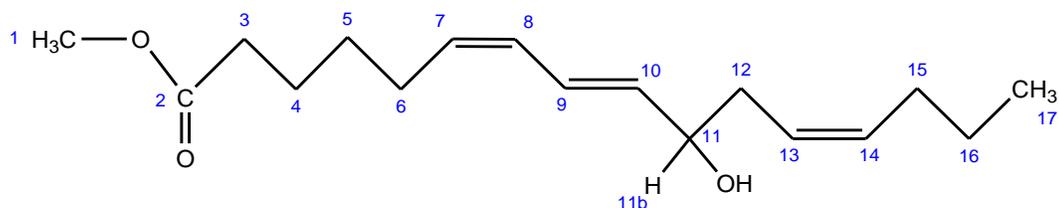


Figura 34. Estructura sugerida para la subfracción SFCAE_{6,9,6}



Esta estructura verifica la multiplicidad y las correlaciones a larga distancia carbono – protón (Figura 35) registrado por el espectro RMN ¹H y HMBC (Tabla 15 y Figura 36). El espectro de HMBC muestra claramente las correlaciones del carbono a 174.30 ppm con los protones metílicos y los que se encuentran en posición α y β .

Figura 35. Correlaciones HMBC de la estructura sugerida para la subfracción SFCAE_{6,9,6}

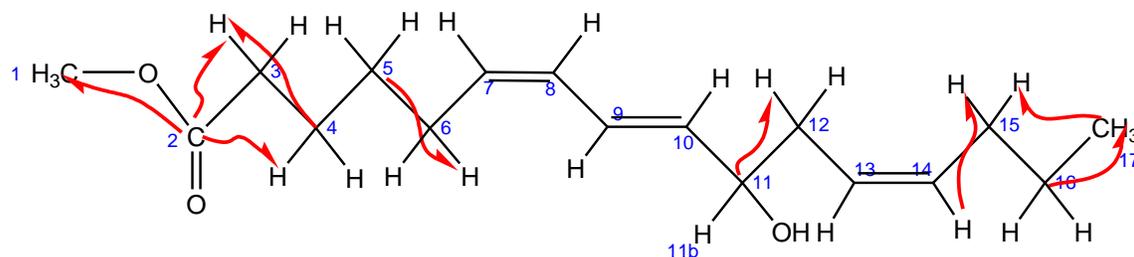


Figura 36. Espectro HMBC de subfracción SFCAE_{6,9,6}.

La estructura sugerida se denomina 10-hidroxi-(7Z,9E,13Z)-trienoato de metilo, la existencia de los grupos COO-, HO- y los dobles enlaces confirman la polaridad intermedia que presentó la subfracción cuando se obtuvo a través de cromatografía en columna, ya que fue eluida con una mezcla de fase móvil de hexano: acetato de etilo (7:4). De igual forma, al único sistema de doble enlace conjugado que presenta la molécula se le atribuye la capacidad de absorber luz UV, que fue la característica observada en el revelado de la placa en CCF desarrollada para esta subfracción en el momento de la separación.

El fragmento **1** de la estructura sugerida (Figura 37) permite presumir que el compuesto identificado es un monoterpene irregular derivado de la vía biosintética del ácido mevalónico con la intervención de dos unidades de isopreno (C_5), isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Este tipo de compuestos se encuentran en la naturaleza y son excepciones a la regla del isopreno en la cual se condensan sucesivas unidades de isopreno (Figura 38) a través de una unión cabeza cola 1-4 produciendo compuestos de fórmula $(C_5)_n$. Las estructuras que no siguen este patrón se consideran con frecuencia curiosidades químicas y biológicas.^[57]

Figura 37. Fragmento 1 de la estructura sugerida para la subfracción

SFCAE_{6,9,6}

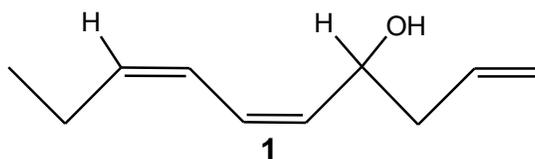
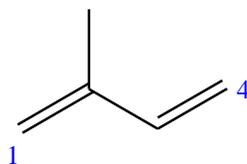
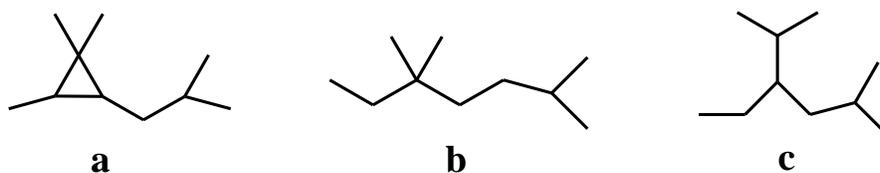


Figura 38. Unidad de Isopreno

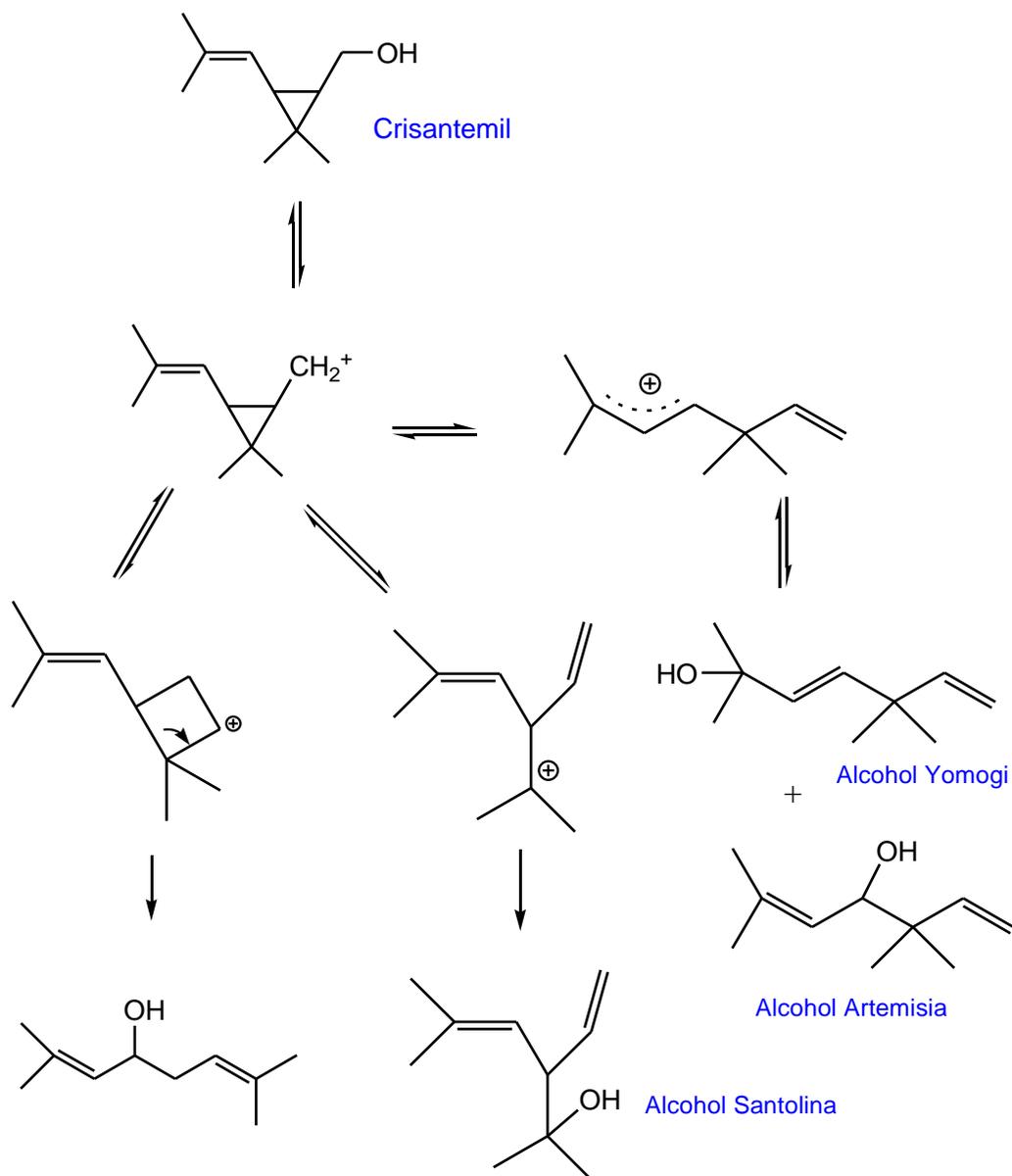
Los tres tipos de esqueletos más comunes de monoterpenos irregulares son crisantemil, artemisia y santolinil (Figura 39).

Figura 39. Esqueletos de Monoterpenos irregulares más comunes:

a. crisantemil, **b.** artemisia, **c.** santolinil.



En algunos estudios ^[57] *in vitro* en plantas se ha demostrado que este tipo de esqueletos se pueden interconvertir y pueden alcanzar una especie catiónica común, como se muestra en la Figura 40. Rearreglos posteriores permiten generar estructuras como la sugerida que no presentan carácter totalmente de un isoprenide.

Figura 40. Especies catiónicas del crisantemil

La ruta biosintética de este tipo de compuestos esta todavía en duda. Sin embargo se ha reportado que este tipo de compuestos presentan marcada

actividad insecticida y pueden conferir algunas ventajas ecológicas sobre los organismos que los producen, resultan ser muy tóxicos para peces y esto permite deducir que el compuesto aislado es un metabolito generado por el alga como mecanismo de defensa. Los compuestos naturales son de este tipo, mientras que los análogos sintéticos más potentes incorporan anillos furánicos o 3-fenoxibencil con el fin de producir compuestos más solubles en grasas.

Con respecto a la subfracción **SFCAE_{6*,4}**, ésta se aisló pura por CC como un aceite café.

El espectro de RMN ¹H (CDCl₃) de esta subfracción reveló la presencia de seis tipos de protones (Tabla 16), a campo bajo se observan los protones de grupos metinos a: δ 6.30 ppm (*J*= 15.95Hz), δ 6.85 ppm (*J*= 8.49Hz), δ 7.42 ppm (*J*= 8.51Hz), δ 7.64 ppm (*J*= 15.95Hz), a campo alto el protón de un grupo hidroxilo a δ 5.84 ppm y el protón de un grupo CH₃-O a δ 3.80 ppm (Figura 41). Estas señales mostraron correlaciones HMQC (Figura 42) a señales de carbonos a δ 115.10, 115.89, 129.98, 144.76 ppm respectivamente.

Tabla 16. Resultados de RMN ¹³C, ¹H, HMQC, HMBC de SFCAE_{6*,4}.

No.	δ ^a _C	δ ^a _H (<i>J</i> en Hz)	Integral	HMQC	HMBC
1	51.7, s	3.80, s	3	H-1	
2	168.09, s				H-4, H-3, H-1
3	115.10, s	6.30, d, 15.95	1	H-3	H-4
4	144.76, s	7.64, d, 15.95	1	H-4	H-6
5	127.08, s				H-3, H-7
6	129.98, s	7.42, d, 8.51	2	H-6	H-4
7	115.89, s	6.85, d, 8.49	2	H-7	
8	157.90, s				H-6, H-7
8b		5.84, s	1		
9	115.89, s				
10	129.98, s				

^a desplazamientos en ppm.

Figura 41. Espectro de RMN ^1H de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$

Figura 42. Espectro HMQC de subfracción SFCAE_{6*,4}

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 43) indican la presencia de ocho tipo de carbonos cuyas multiplicidades se dedujeron por medio del experimento de DEPT (Figura 44). Las resonancias a δ : 144.76, 129.98, 115.89, 115.10 ppm corresponden a grupos metinos de ($-\text{CH}=\text{}$), la señal a δ : 51.7ppm se atribuye a un carbono de un grupo metoxilo ($\text{CH}_3\text{-O}$) y las señales a δ : 168.09, 157.90, 127.08 ppm indican la presencia de tres carbonos cuaternarios de señales $\text{CH}_3\text{-CO-X}$, X: O ; $=\text{C-X}$, X: O ; $-\text{C}=\text{}$ respectivamente. En el espectro COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ (Figura 45), la señal a δ 7.64 mostró correlación con la señal a δ 6.30ppm y el valor de la constante de acoplamiento de $J = 15.95\text{Hz}$ permite establecer una isomería geométrica *E*. La señal a δ 7.42ppm mostró correlación con la señal a δ 6.85 y el valor de la constante de acoplamiento de $J \approx 8.49\text{Hz}$ permite establecer una isomería geométrica *Z*. La integración para las señales de RMN ^1H a 7.42 y 6.85ppm indican la presencia de dos protones y según HMQC están enlazados a los carbonos de desplazamiento de 129.98 y 115.89ppm respectivamente, sin embargo el DEPT demuestra que estos dos carbonos corresponden a grupos metinos (CH), por lo que se deduce que debe haber presencia de dos carbonos simétricos, de esta forma se construye el fragmento **a**.

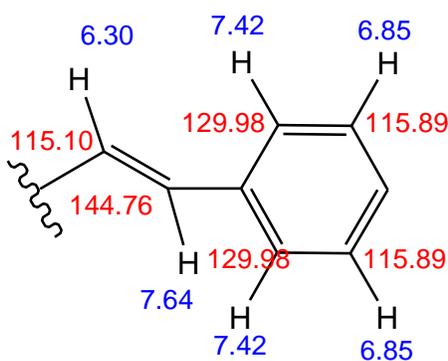
**a**

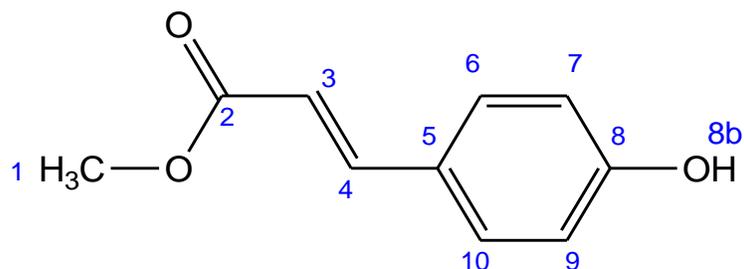
Figura 43. Espectro RMN ^{13}C de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$

Figura 44. Espectro DEPT de subfracción SFCAE_{6*,4}

Figura 45. Espectro COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ de subfracción SFCAE $_{6^*,4}$

A partir de la información espectroscópica de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, COSY ^1H - ^1H y la multiplicidad el fragmento **a** se une al carbono cuaternario que resuena a 168.09 ppm, que como ya se menciona anteriormente corresponde a un grupo $-\text{COOCH}_3$ y de esta forma se sugiere la estructura de la Figura 46 para la subfracción SFCAE $_{6^*,4}$.

Figura 46. Estructura sugerida para la subfracción SFCAE $_{6^*,4}$



Esta estructura muestra correlaciones a larga distancia (HMBC) (Figura 47), que corresponden a las obtenidas en el análisis espectroscópico de la subfracción SFCAE $_{6^*,4}$ (Tabla 16 Y Figura 48). El espectro muestra las correlaciones del carbono a 168.09 ppm con los protones que resuenan a desplazamientos de 3.80, 6.30 y 7.64 ppm, como también las correlaciones del carbono olefínico alifático con los protones del sistema aromático.

Figura 47. Correlaciones HMBC de la estructura sugerida para la subfracción SFCAE $_{6^*,4}$

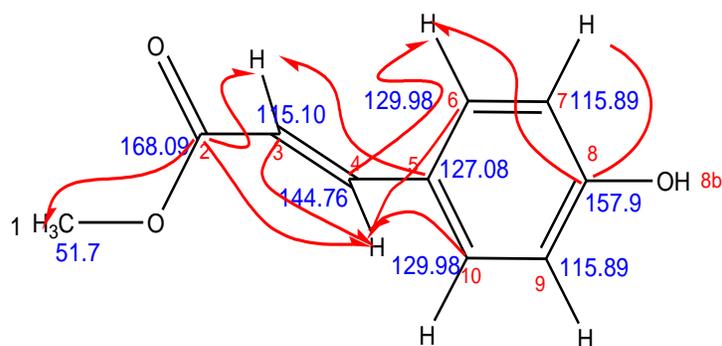


Figura 48. Espectro HMBC de subfracción SFCAE_{6*,4}

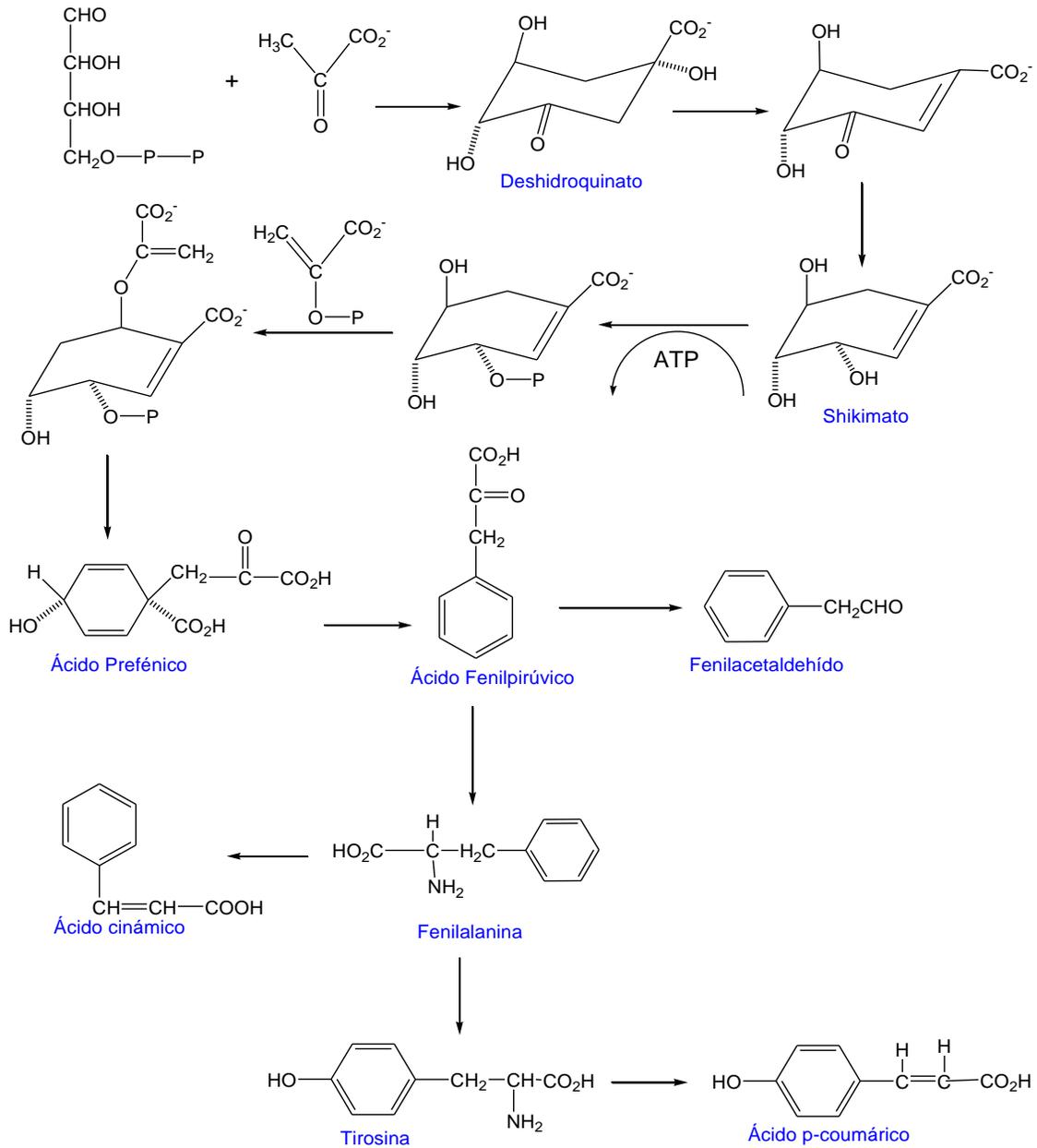
La estructura sugerida se denomina (*E*)- metil-3-(4-hidroxifenil) acrilato o 3-(4-hidroxifenil)-(2*E*)-propenoato de metilo. La presencia de los grupos OH⁻ y COO⁻, le confieren carácter polar a la molécula, mientras que el sistema aromático y la cadena alifática oleofínica le confieren carácter apolar; de esta forma se justifica su solubilidad y su fuerte interacción con la mezcla de hexano: acetato de etilo (7:4) que corresponde a la proporción de fase móvil de elución. Así mismo, el sistema conjugado de dobles enlaces es el responsable de la capacidad de absorción de luz UV, que fue el revelador que permitió evidenciar su separación a través de cromatografía en capa fina.

El compuesto identificado se considera un derivado del ácido cinámico formado a partir de la vía del metabolismo del shikimato que proporciona un gran número de de compuestos aromáticos relacionados con aminoácidos, fenilalanina y tirosina. Muchos de estos compuestos son polifenoles y usualmente poseen una sustitución característica: *p*-hidroxi, *o*-hidroxi o 1,2,3- trihidroxi. Esta vía metabólica es muy importante en algas ya que los compuestos de partida son el 4-fosfato de eritrosa y el piruvato, los cuales están involucrados en el metabolismo primario de azúcares y participan en la asimilación de carbono en el ciclo de la fotosíntesis.^[56, 57]

En el metabolismo de los carbohidratos se produce el 4-fosfato de eritrosa y el piruvato. Estos compuestos reaccionan y dan el deshidroquinato; éste se deshidrata y produce un intermediario, que por reducción se convierte en el ácido shikímico; intermediario fundamental de numerosos compuestos aromáticos. Cuando el ácido shikímico o su anión reaccionan con el ácido fosfoenol pirúvico dan un intermediario que se convierte en el ácido prefénico. La descarboxilación de éste forma el ácido fenil pirúvico, que por aminación se convierte en fenilalanina, y ésta por descarboxilación origina β-feniletilamina o por desaminación el ácido cinámico. Los compuestos anteriores por oxidación, metilación, reducción, descarboxilación y condensaciones aldólicas y de

Mannich, originan numerosas familias de metabolitos secundarios, como los que se observan en la Figura 49.^[56, 57]

Figura 49. Biogénesis del ácido shikímico y sus derivados



Las sustancias derivables del ácido cinámico (C₆-C₃) constituyen varios grupos de sustancias interesantes, algunos son fenoles, como el eugenol, éteres como la miristicina, dímeros como los lignanos sesamina y el NDGA, y en el caso del compuesto identificado en éste estudio un éster derivado del ácido *p*-coumárico.

Con respecto al análisis espectroscópico de los eluidos correspondientes a los picos registrados a tiempos de retención de 4.7 y 6.8 minutos en el cromatograma obtenido al inyectar en el HPLC la subfracción SFCAE_{5*3} no se registraron señales significativas que permitieran realizar una elucidación estructural, debido posiblemente a que la cantidad de muestra no fue suficiente para realizar el análisis.

4. CONCLUSIONES

- ❑ Este estudio constituye un aporte significativo a la composición del alga marina *Bostrychia calliptera*, especie de la cual no hay reporte en la literatura y es un organismo que se proyecta como un indicador biológico y como fuente importante de carragenanos, que son compuestos empleados ampliamente en la industria.

- ❑ La presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, saponinas, triterpenos y derivados antracénicos establecida a través de las pruebas preliminares realizadas en cromatografía de capa fina a la subfracción de acetato de etilo de la fracción de cloruro de metileno del alga marina *Bostrychia calliptera* proyectan éste organismo como una fuente excepcional de compuestos con actividad biológica.

- ❑ La técnica de cromatografía líquida en columna resultó ser una herramienta útil, sencilla, y rápida que permitió separar una mezcla compleja como la fracción de cloruro de metileno del alga *BC* hasta llegar a un compuesto puro con el fin de realizar su elucidación estructural.

- ❑ El análisis espectroscópico de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY ^1H - ^1H HMQC y HMBC permitió sugerir como estructuras químicas para las subfracciones SFCAE_{6,9,6} y SFCAE_{6*,4} obtenidas de los procesos de separación y purificación en cromatografía líquida en columna sobre silica gel las correspondientes a los compuestos 10-hidroxi-(7Z,9E,13Z)-trienoato de metilo y (*E*)- metil-3-(4-hidroxifenil) acrilato, respectivamente.

- ❑ Para realizar un proceso de separación y purificación óptimo y eficiente del extracto de un organismo vegetal, es necesario extremar las condiciones de trabajo, es decir, mantener temperaturas bajas, evitar la exposición a la luz, conservar las muestras lo más secas posible y almacenadas en viales limpios previniendo riesgo de contaminación, para evitar procesos de degradación en el transcurso del procedimiento.

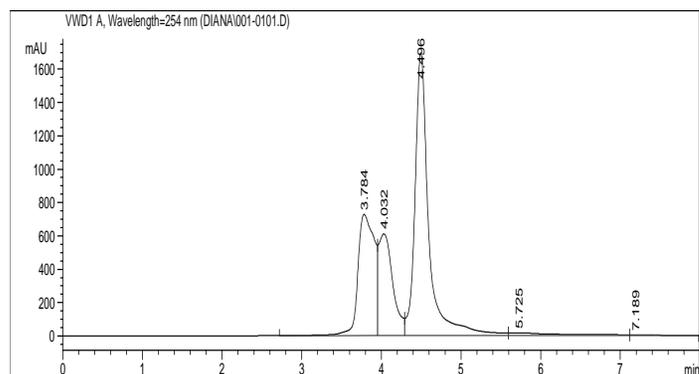
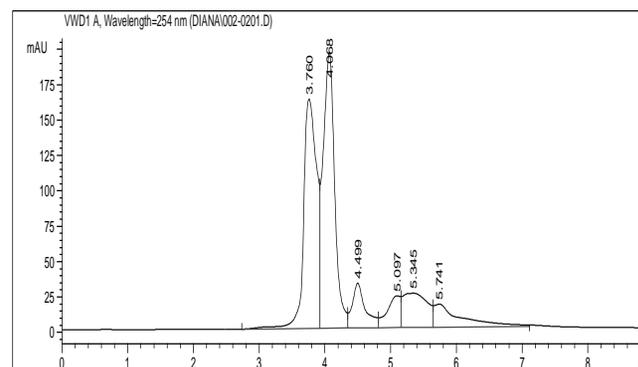
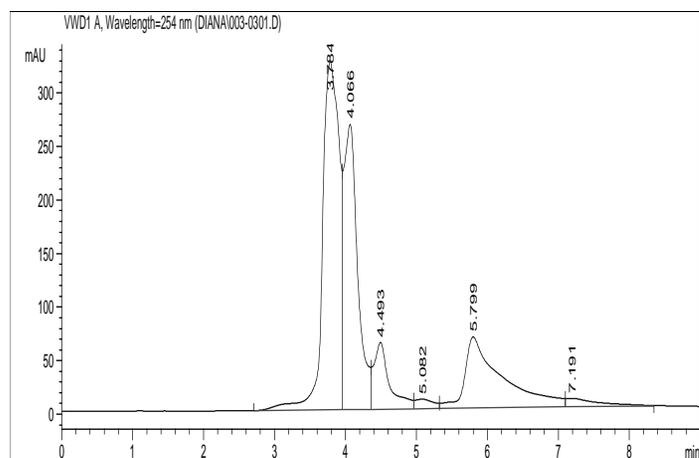
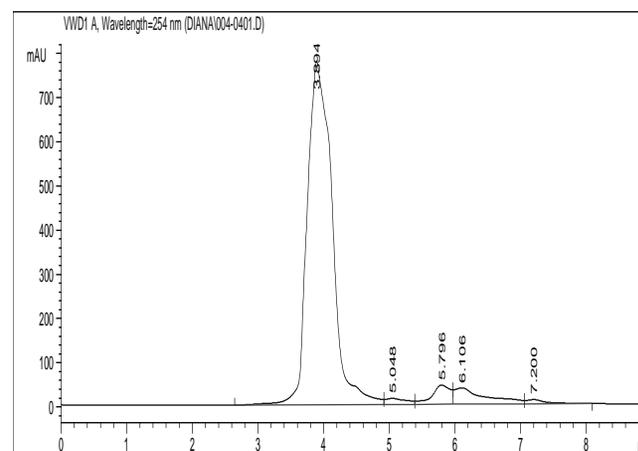
- ❑ La elucidación estructural de los compuestos separados a través de cromatografía líquida en columna y purificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase normal, eluidos a tiempos de retención de 4.7 y 6.8 minutos no fue posible, debido a que los espectros de RMN obtenidos no registraron señales significativas porque la cantidad analizada fue muy poca. Sin embargo, es importante resaltar que la técnica de HPLC es de gran utilidad y sensibilidad que permite establecer condiciones experimentales para lograr una óptima purificación.

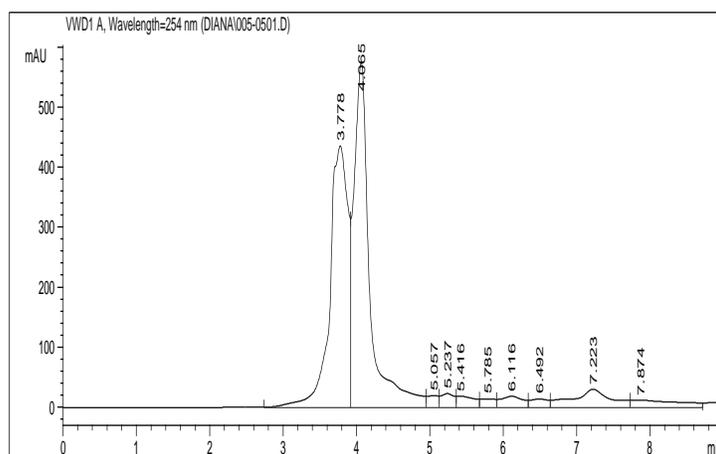
- ❑ La elucidación estructural de las subfracciones SFCAE_{6*,4} y SFCAE_{6,9,6} permitió establecer como constituyentes del alga *Bostrychia calliptera* un derivado del ácido p-coumárico y un monoterpeneo irregular. De igual forma reconocer como vías biosintéticas de metabolitos secundarios: la biogénesis del ácido shikímico y del ácido mevalónico. Así mismo, esto permite suponer la existencia de otros metabolitos como los alcaloides considerando la interrelación que existe entre los productos metabólicos, promoviéndose así, el interés investigativo por esta especie o especies del mismo género con el fin de encontrar compuestos similares o iguales como consecuencia de la extensa coincidencia de sus patrones genéricos.

- ❑ Sería importante continuar con el estudio de la fracción de cloruro de metileno del alga *Bostrychia calliptera* debido a que se obtuvo resultados satisfactorios en cuanto a que se logró elucidar estructuras químicas que

representan relevancia metabólica, como también contemplar los extractos etanólico y de hexano y evaluar la actividad biológica de los compuestos aislados para establecer sus posibles utilidades o determinar las posibles vías para sintetizar un compuesto natural.

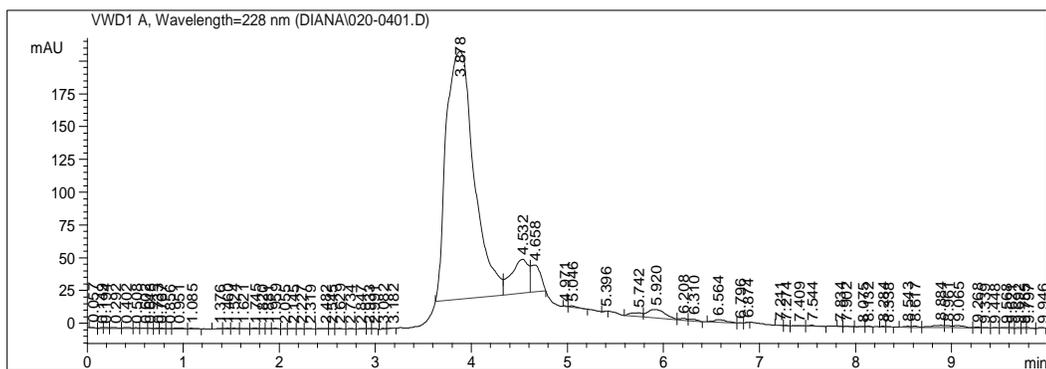
5. ANEXOS

Anexo 1. Cromatogramas de picos de: (a) 4.5, (b) 5.4, (c) 5.9, (d) 6.2, (e) 7.7 minutos de la subfracción SFCAE₂.**(a)****(b)****(c)****(d)**

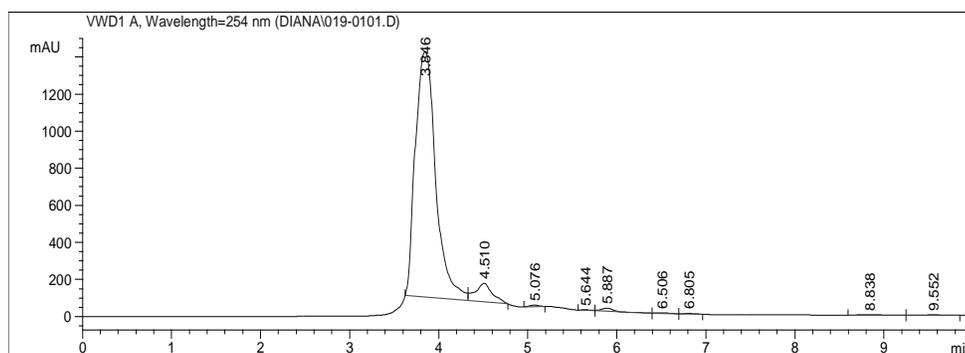


(e)

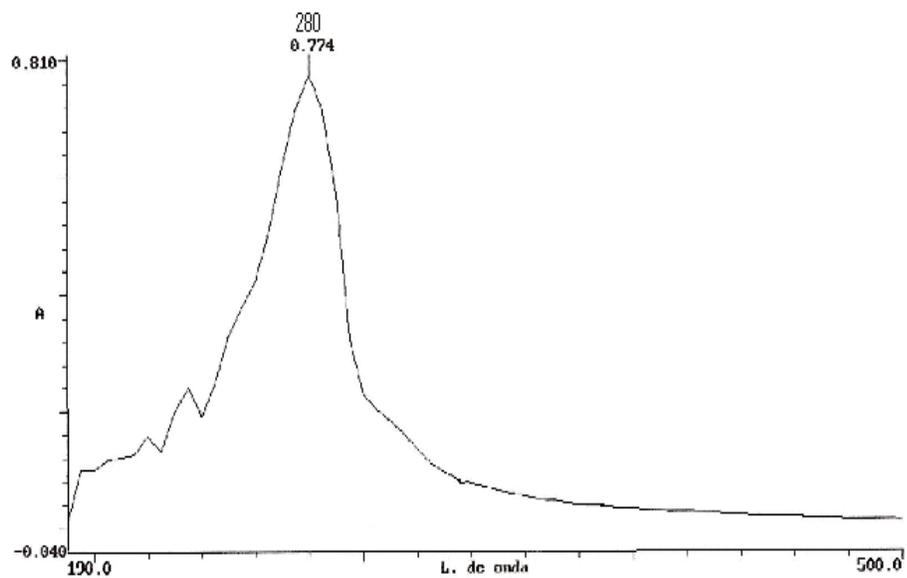
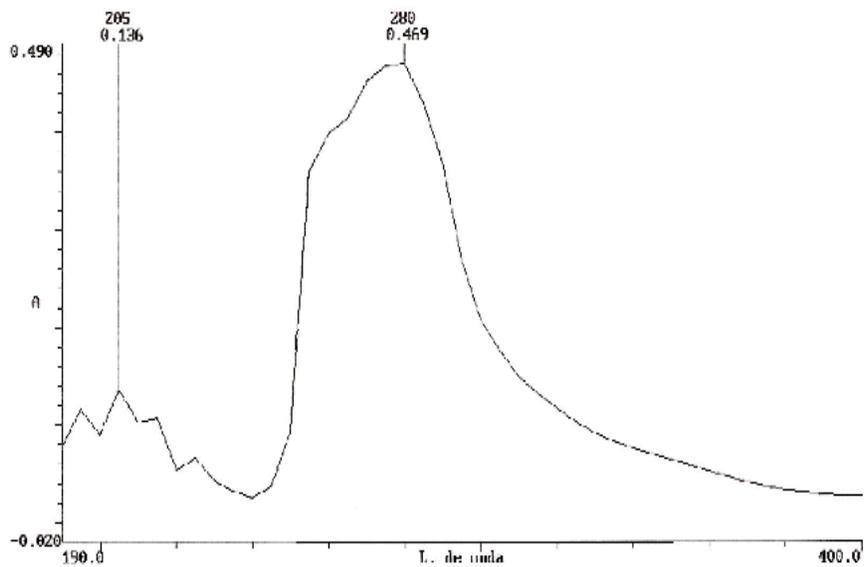
Anexo 2. Cromatogramas de subfracción SFCAE₁ a longitudes de onda de: (a). 228nm (presenta mucho ruido de fondo) (b). 274nm.

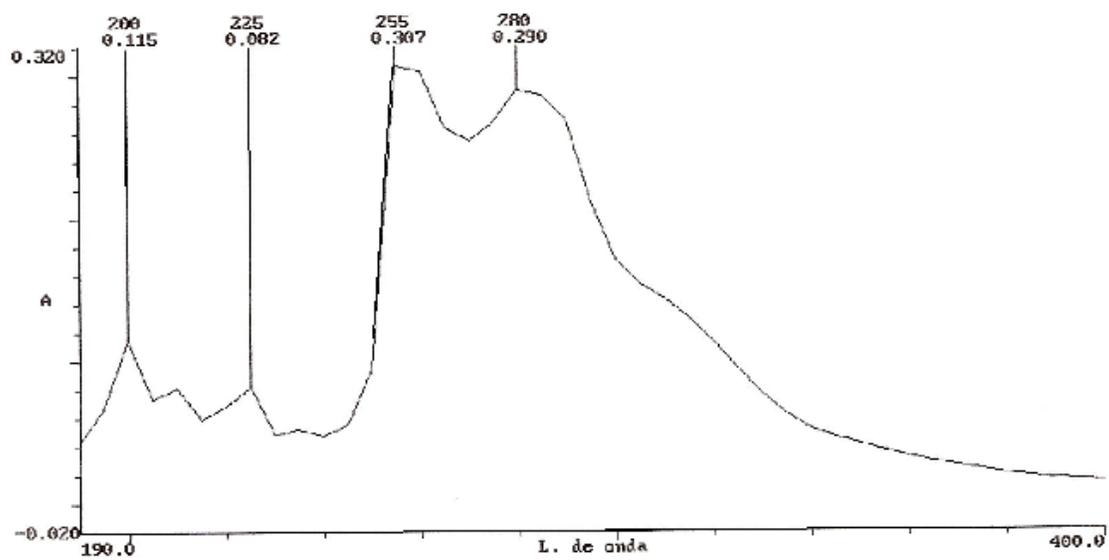


(a)



(b)

Anexo 3. Espectro UV de SFCAE₆.**Anexo 4. Espectro UV de SFCAE.**

Anexo 5. Espectro UV de SFCAE₆*.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1]. OSPINA A., Actividad antimicótica de dos especies de algas del pacífico colombiano. 1997. p. 5-12, 18-22, 27, 28, 39, 40.
- [2]. BEJARANO A. Aporte de biomasa de las microalgas bentónicas al ecosistema manglar estuarino. Santiago de Cali. Marzo. 1997. p. 13-15.
- [3]. ARANGO G. VELASCO E. Observaciones fenológicas preliminares de las algas rojas *Catenella impudica* y *Bostrychia calliptera* en punta soldado (Bahía de Buenaventura). Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Área Biología Marina. P. 1-13.
- [4]. DUARTE, MARIA E. R.; NOSEDA, MIGUEL D.; CARDOSO, MARCO A.; TULIO, SIUMARA; CEREZO, ALBERTO S. The Structure Of A Galactan Sulfate From The Red Seaweed *Bostrychia Montagnei*. Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Parana, Curitiba-Parana, Brazil. *Carbohydrate Research* (2002), 337(12), 1137-1144. CODEN: CRBRAT ISSN: 0008-6215.
- [5]. ZUCCARELLO, GIUSEPPE C.; WEST, JOHN A.; KARSTEN, ULF; KING, ROBERT J. Molecular Relationships Within *Bostrychia Tenuissima* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). School of Biological Science, University of New South Wales, Sydney, Australia. *Phycological Research* (1999), 47(2), 81-85.
- [6]. BRINK, D. J.; VAN DER BERG, N. G. Structural Colours From The Feathers Of The Bird *Bostrychia Hagedash*. Department of Physics, University of Pretoria, Pretoria, S. Afr. *Journal of Physics D: Applied Physics* (2004), 37(5), 813-818. CODEN: JPAPBE ISSN: 0022-3727.

[7]. ZUCCARELLO, G. C.; WEST, J. A.; KAMIYA, M.; KING, R. J. A Rapid Method To Score Plastid Haplotypes In Red Seaweeds And Its Use In Determining Parental Inheritance Of Plastids In The Red Alga *Bostrychia* (Ceramiales). School of Biological Science, University of New South Wales, Sydney, Australia. *Hydrobiologia* (1999), 401 207-214. CODEN: HYDRB8 ISSN: 0018-8158.

[8]. NOSEDA, MIGUEL D.; TULIO, SIUMARA; DUARTE, MARIA E. R. Polysaccharides From The Red Seaweed *Bostrychia Montagnei*: Chemical Characterization. Departamento de Bioquímica-UFPR, Centro Politecnico, Parana, Brazil. *Journal of Applied Phycology* (1999), 11(1), 35-40. CODEN: JAPPEL ISSN: 0921-8971.

[9]. KARSTEN, ULF; BOCK, CHRISTIAN; WEST, JOHN A. ¹³C-NMR Spectroscopy As A Tool To Study Organic Osmolytes In The Mangrove Red Algal Genera *Bostrychia* And *Stictosiphonia* (Ceramiales). Max Planck Inst. Marine Microbiol., Bremen, Germany. *Phycological Research* (1995), 43(4), 241-7. CODEN: PHREFC ISSN: 1322-0829.

[10]. KARSTEN, U.; BOCK, CHR.; WEST, J. A. Low Molecular Weight Carbohydrate Patterns In Geographically Different Isolates Of The Eulittoral Red Alga *Bostrychia Tenuissima* From Australia. Max Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany. *Botanica Acta* (1995), 108(4), 321-6. CODEN: BOACEJ ISSN: 0932-8629.

[11]. KARSTEN, ULF; THOMAS, DAVID N.; WEYKAM, GABRIELE; DANIEL, CLAUDIA; KIRST, GUNTER O. DEP. MAR. BOT., UNIV. BREMEN, BREMEN, GERMANY. A Simple And Rapid Method For Extraction And Separation Of Low Molecular Weight Carbohydrates From Macroalgae Using High-Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology and Biochemistry* (Paris, France)

(1991), 29(4), 373-8. CODEN: PPBIEX ISSN: 0981-9428.

[12]. KREMER, BRUNO P. Biosynthesis And Metabolism Of Polyhydroxy Alcohols In Marine Benthic Algae. Bot. Inst., Univ. Koeln, Cologne, Fed. Rep. Ger. Proceedings - International Seaweed Symposium (1979), Volume Date 1977, 9 421-8. CODEN: ISSYA4 ISSN: 0074-7874.

[13]. KREMER, BRUNO P. Distribution Of Alditols In The Genus Bostrychia. Bot. Inst., Univ. Koeln, Cologne, Fed. Rep. Ger. Biochemical Systematics and Ecology (1976), 4(3), 139-41. CODEN: BSECBU ISSN: 0305-1978.

[14]. QUILLET, MARCEL. Sucrose Produced By Rhodophyceae. Inst. Catholique, Paris, Compt. Rend. (1965), 260 (23(Groupe 11)), 6192-4.

[15]. AUGIER, JEAN; DU MERAC, MARIE LOUISE. The Soluble Sugars Of The Rhodophyceae. Compt. rend.1954), 238 387-9.

[16]. HAAS, PAUL; HILL, THOMAS G. Occurrence Of Sugar Alcohols In Marine Algae. ii. Sorbitol. *Biochemical Journal* (1932), 26 987-90. CODEN: BIJOAK ISSN: 0264-6021.

[17]. HAAS, P.; HILL, T. O. Occurrence Of Dulcitol In A Red Seaweed. *Nature* (London, United Kingdom) (1931), 128 378. CODEN: NATUAS ISSN: 0028-0836.

[18]. NOWAK J; SONAIKE B; LAWSON G W. Auxin Induced Stress Tolerance In Algae. Department of Biological Sciences, University of Lagos, Lagos, Nigeria Environmental pollution (Barking, Essex : 1987) (1988), 51(3), 213-8. Journal code: 8804476. ISSN:0269-7491.

[19]. DUARTE MARIA E R; NOSEDA MIGUEL D; CARDOSO MARCO A; TULIO SIUMARA; CEREZO ALBERTO S. The Structure Of A Galactan Sulfate From The Red Seaweed *Bostrychia Montagnei*. Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Parana, PO Box 19046, CEP: 81531-990, Curitiba-Parana, Brazil *Carbohydrate research* (2002 Jun 12), 337(12), 1137-44. Journal code: 0043535. ISSN:0008-6215.

[20]. STEVAN F R; OLIVEIRA M B; BUCCHI D F; NOSEDA; IACOMINI M; DUARTE M. E. Cytotoxic Effects Against Hela Cells Of Polysaccharides From Seaweeds. Department of Biochemistry, Federal University of Parana, Curitiba, PR, Brazil *Journal of submicroscopic cytology and pathology* (2001 Oct), 33(4), 477-84. Journal code: 8804312. ISSN:1122-9497.

[21]. PEÑA SALAMANCA ENRIQUE J¹., LOZANO DUQUE YESID¹, BENITEZ RICARDO². Dinámica de la Bioacumulación de Metales Pesados en dos Especies de Algas en la Bahía de Buenaventura, Pacifico Colombiano. ¹Universidad del Valle, Departamento de Biología, ²Universidad del Cauca, Departamento de Química, 2003.

[22]. ROMANOVSKY V., and Col., *El Mar*, Tercera Edición, Editorial Labor S.A., Barcelona, 1967, p. 572-577, 603.

[23]. DALLA M. Monografías. Alginatos. [Visitado el 18 de mayo de 2005]. Disponible en Internet en:
<http://www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginato.shtml>.

[24]. AISLAMIENTO DE ALANTOINA Y ADENOSINA A PARTIR DE LA ESPONJA MARINA *Tethya Aurantia*. Faulkner J. Roger P. Scripps Institution of Oceanography. California. September 22. 1980.

[25]. UNCOMMON TETRAHYDROFURAN MONOTERPENES FROM ANTARCTIC *Pantoneura plocamioides*. Cueto M.; Darias J.; Instituto de Productos Naturales Agrobiología del CSIC. *Elsevier Science*. Spain. 1996.

[26]. PEÑA SALAMANCA ENRIQUE J., Dinámica de bioacumulación de metales pesados en algas, Universidad del Valle, Departamento de Biología, 2002.

[27]. PEÑA SALAMANCA ENRIQUE J., Bioindicadores. Algas como Organismos Indicadores de Contaminación por Metales, Grupo de Biología Vegetal Aplicada, Universidad del Valle, 2004, p. 1-20.

[28]. SANCHEZ-RODRIGUEZ, M. and Col., Elemental concentrations in different of seaweeds from Loreto Bay, Baja California Sur, Mexico: implications for the geochemical control of metals in algal tissue. *Environmental Pollution*. 2001. p.114: 145-160.

[29]. CORTES, L. Estudio y evaluación de metales traza (Cd, Cu, Cr, Hg y Pb) en aguas y sedimentos marinos superficiales de la costa pacifica colombiana. Tesis de Magíster en Química. Santiago de Cali, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 1996. p. 43.

[30]. REICHHOLF J., STEINBACH G., Evolución y Ecología, Volumen 1, Plaza & Janes, 1995.

[31]. SHAW J., Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990.

[32]. ANICOLSA PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES. Caracterización Bioquímica del Alga *Gigastina chamissoi*. Extracción de Carbohidratos (ácido algínico) de la especie *Grateolupia doryphora* (Algas pardas-Perú). Perú 2000-

2004. [Visitado el 18 de mayo de 2005]. Disponible en Internet en: <http://taninos.tripod.com/algas.htm>.

[33]. ZAMBRANA G., Estado de los Estuarios Y Lagunas Costeras en Colombia, Instituto de Investigaciones Marinas Y Costeras (Invemar) *Programa Calidad Ambiental Marina (Cam)*, 2000.

[34]. PEÑA SALAMANCA ENRIQUE J., Estudio Preliminar sobre el crecimiento y repoblamiento de dos especies de macroalgas rojas *Catenella impudica* y *Bostrychia calliptera* en condiciones naturales en punta soldado (Bahía de Buenaventura) costa pacífica colombiana. 1992. p. 24-26.

[35]. OVIEDO A. Acumulación de Mercurio, cobre y plomo por el alga roja *Bostrychia calliptera* (Rhodomelaceae Ceramiales) y su efecto sobre la eficiencia fotosintética de la especie. 2003. p. 16, 17.

[36]. KNOTT MICHAEL y Col., Plocoralides A-C, polyhaogenates monoterpenes from the marine alga *Plocanium corallorhiza*, Elsevier, *Phytochemistry* 66(2005) 1108-1112.

[37]. VAIRAPPAN C. y Col., Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species, *Phytochemistry* 58 (2001) 517-523.

[38]. BRITO I., y Col., Bromocyclococanol, a halogenates sequiterpene with a novel carbon skeleton from the red alga *Laurencia obtuse*, *Tetrahedron Letters* 43 (2002) 2551-2553.

[39]. SHINGO HIROISHI, Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga, Japan, *Elsevier*, 13 February 2001.

[40]. ROSARIO DURAN, New Diterpenoids from the Alga *Dictyota dichotoma*, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias del Mar, Puerto Real, Cádiz, SPAIN. *Elsevier Science Tetrahedron*, Vol. 53, No. 25, pp. 8675-8688.

[41]. DUARTE M. E. R., y Col. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in Vitro, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, Brasil, *Phytomedicine*, Vol. 8(1), pp. 53–58.

[42]. KARSTEN U. y Col. Polyol content of *Bostrychia* and *schlosiphania* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field and culture, *Chemical Abstracts*, 116:251801v.

[43]. KARSTEN U. y Col., A simple and Rapad method for extraction and separation of low molecular wight carbohidratos from macroalgae using high-performance liquid chromatography. *Chemical Abstracts*, 116: 10197m.

[44]. KREMER and Col., Bisynthesis and metabolism of polyhydroxyalcohols in marine benthic algae, *Chemical Abstracts*, 90: 200395c.

[45]. KREMER and Col. Distribution of alditols in the genus *Bostrychia*, *Chemical Abstracts*, 85: 174302v.

[46]. AUGIER J., Distribution of sodium mannoglycerato on Florideae, *Chemical Abstracts*, 43: 8014v.

[47]. AUGIER J., The soluble sugars of the Rhodophyceae, *Chemical Abstracts*, 48: 8338f.

- [48]. HAAS P., y Col., Ocurrente of sugar alcohols in marine algae. II Sorbitol. Chemical Abstracts, 27: 119,8.
- [49]. VALCARCEL c., Técnicas Analíticas de Separación, Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1994, p. 333-336, 437-442.
- [50]. DOMÍNGUEZ S., Cromatografía en papel y en capa delgada, Washington: Organización de Estados Americanos, 1982, p. 4-7, 35-49, 58-64.
- [51]. SKOOG D., HOLLER F., NIEMAN T. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Mc Graw Hill. Quinta Edición. España. 2001. p. 731-754,
- [52]. WADE L., Química Orgánica, Segunda edición, Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., México, 1993, p. 527, 509,510.
- [53]. SILVERSTEIN, BASSLER AND MORRIL. Spectrometric Identification of organic compounds, Fourth edition, John wiley & Sons, 1981, p.237, 289.
- [54]. SANABRIA G., Análisis Fitoquímico Preliminar, Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*, Bogotá, 1983, p. 6, 24-54.
- [55]. Thin Layer Chromatography, Techniques of Chemistry, Detection of Colorless Compounds, 2nd. Edition, V. XIV, 1978, p. 227, 230, 234.
- [56]. DOMINGUEZ X., Métodos de Investigación, Fitoquímica, Limusa, México, 1985, p. 57-60.
- [57]. MANN J., Secondary Metabolism, Second Edition, Clarendon Press, Oxford, 1987, p. 111-114, 172-177.