

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA



**Estudio químico y evaluación biológica de los componentes principales del
alga venezolana *Ulva lactuca***

Trabajo Especial de Grado,
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Daniel José Arismendi
Peña, para optar por el título de
Licenciado en Química, opción
Básica

Caracas, Octubre 2009

ACTA

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: “**Estudio químico y evaluación biológica de los componentes principales del alga venezolana *Ulva lactuca***”, presentado por el Bachiller: Daniel José Arismendi Peña, certificamos que éste trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra magna casa de estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dra. Ivette Piña Gómez
(Tutor)

Dra. Beatriz Vera
(Jurado)

Dr. Gustavo Cabrera
(Jurado)

Yo, Profesora Ivette Piña Gómez, investigadora del Centro de Química Orgánica, de la Escuela de Química, de la Universidad Central de Venezuela. Certifico que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

Estudio químico y evaluación biológica de los componentes principales del alga venezolana *Ulva lactuca*

Que presenta el Br. Daniel José Arismendi Peña, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Química del Mar, bajo mi dirección, durante los años 2008 y 2009, con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, 26 de Octubre de 2009

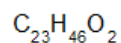
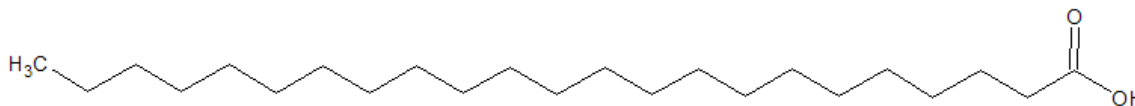
Dra. Ivette Piña Gómez
(Tutor)

RESUMEN

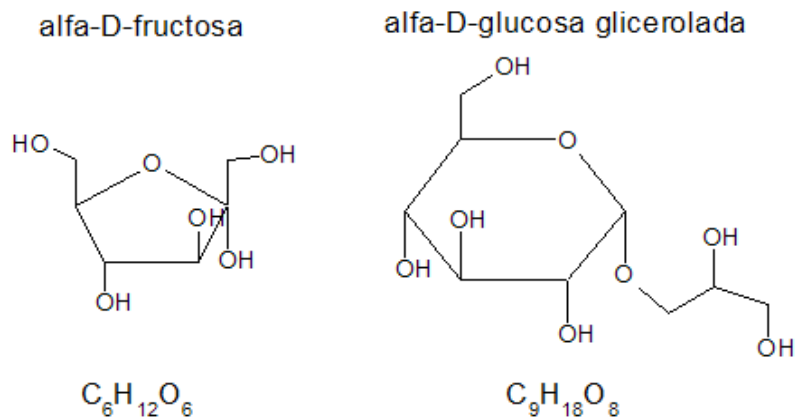
Este Trabajo Especial de Grado representa un aporte en el área de Productos Naturales Marinos, a través del estudio de los componentes principales del alga venezolana *Ulva lactuca*.

Al alga *Ulva lactuca* colectada en las costas de la isla de Margarita, se le realizó un estudio químico y una evaluación biológica. Se prepararon cuatro extractos principales a partir del material seco, mediante la partición del crudo metanólico (CM) inicial: EH, ED, EM y EA. Del EM, mediante técnicas cromatográficas de columna y capa fina, se aislaron tres fracciones principales: EM1, EM3 y EM4. De EM1 se logró caracterizar un ácido graso como constituyente principal. En EM3 se presume la presencia de dos monosacáridos, uno en forma libre y otro unido a un glicerol. Finalmente, usando los datos espectroscópicos de EM4 y realizando ensayos químicos se pudo inferir la presencia de un monosacárido como constituyente de esta fracción (EM4). Todos estos posibles compuestos fueron caracterizados mediante técnicas de espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones y de carbonos (RMN ^1H - ^{13}C).

Para EM1:

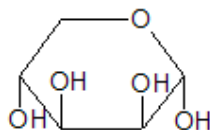


Para EM3:



Para EM4:

alfa-D-lixofuranosa



Se evaluó el nivel de toxicidad del material, mediante el ensayo en *Artemia Salina*. Se aplicó tanto al CM, como a cada uno de los extracto EH, ED, EA y EM. Los resultados indican un índice de toxicidad moderado para el crudo metanólico, el cual fue disminuyendo a medida que se realizó la separación de los extractos. El extracto metanol-agua, resultó ser el menos tóxico de todos con 6,7% de mortalidad.

Se les midió la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa al CM, EH, ED, EA y EM. Para el CM la inhibición fue de 77% sin histonas y 64% con histonas. En EH se encontró la mejor inhibición con histonas (60%) en comparación a los demás extractos. Para ED y EM la inhibición fue intermedia (cerca de 50%). Y con EA se obtuvo la mejor inhibición sin histonas (66%), pero con muy baja inhibición con histonas (17%).

ABREVIACIONES

Ara:	Arabinosa
ATP:	Adenosina trifosfato
CAM:	Ensayo sobre membrana corioalantoide (chorioallantoic membrane)
CCF:	Cromatografía de capa fina
CC:	Cromatografía de columna
CD ₃ OD:	Metanol deuterado
CDCl ₃ :	Cloroformo deuterado
CEF:	Ensayo sobre monocapas de fibroplastos embrionarios de pollo
CM:	Crudo metanólico
d:	doblete
DEPT:	Distortionless enhancement by polarization transference
EA:	Extracto de acetato de etilo
ED:	Extracto de diclorometano
EH:	Extracto de hexane
EM:	Extracto metanol-agua
Fruc:	Fructosa
g:	Gramos
GC/MS:	Cromatografía de gases/espectrometría de masas
Glu:	Glucosa
Glc:	Galactosa
G-6-P:	Glucosa-6-fosfato

G-6-Pasa:	Glucosa-6-fosfatasa
IR:	Infrarrojo
LC ₅₀ :	Concentración letal media
Lix:	Lixosa
m:	Multiplete
Man:	Mannosa
MDCK:	Ensayo sobre células de riñón de perro (Madin-Darby canine kidney)
mg:	Miligramos
MIC:	Concentración mínima inhibitoria
mult:	Multiplicidad
m/z:	Relación masa/carga
Pi:	Fósforo inorgánico
ppm:	Partes por millón
%:	Porcentaje
OD ₄₅₀ :	Densidad óptica a 450 nm.
RMN- ¹ H:	Resonancia magnética nuclear de protones
RMN- ¹³ C:	Resonancia magnética nuclear de carbono
SDS:	Duodecil sulfato de sodio
s:	Singlete
t:	Triplete
TCL:	Cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography)
uma:	Unidades de masa atómica
Xil:	Xilosa

2-BF:	2-bromofenol
4-BF:	4-bromofenol
2,4-DF:	2,4-dibromofenol
2,6-DF:	2,6-dibromofenol
4-HPAA:	4-hidroxifenilacético
4-HBA:	Ácido 4-hidroxibenzoico
4-HPAc:	4-hidroxifeniláctico
2,4,6-TBF:	2,4,6-tribromofenol

ÍNDICE DE CONTENIDO

	CAPÍTULO I.	2
I.1.	INTRODUCCIÓN	2
I.2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
I.2.1.	Las algas	5
I.2.1.1.	Definición	5
I.2.1.2.	Estructura	6
I.2.1.3.	Reproducción	8
I.2.1.4.	Organización	9
I.2.1.5.	Ecología	9
I.2.1.6.	Clasificación	10
I.2.2.	Descripción general del alga <i>Ulva lactuca</i>	16
I.2.2.1.	Clasificación taxonómica	16
I.2.2.2.	Descripción morfoanatómica	17
I.2.2.3.	Composición química de la macroalga <i>Ulva lactuca</i>	18
I.2.3.	Diabetes y mecanismo de la glucosa	20
I.2.3.1.	Definición	20
I.2.3.2.	Tipos	20
I.2.3.3.	Datos sobre la diabetes	21
I.2.3.4.	Consecuencias frecuentes de la diabetes	21
I.2.3.5.	Metabolismo de la glucosa	22

I.2.3.6.	Sistema de la Glucosa-6-fosfatasa	25
I.3.	ANTECEDENTES	27
I.4.	JUSTIFICACIÓN	42
	CAPITULO II	43
II.1.	OBJETIVOS	43
II.1.1.	Objetivo General	43
II.1.2.	Objetivos Específicos	43
II.2.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	44
II.2.1.	Solventes	44
II.2.2.	Agentes reveladores	44
II.2.3.	Materiales y Equipos	44
II.2.4.	Colección del alga verde	46
II.2.5.	Extracción y separación	46
II.2.6.	Metodología empleada para los ensayos biológicos	49
II.2.6.1.	Metodología empleada para el ensayo de mortalidad de Artemia Salina	49
II.2.6.2.	Metodología empleada para el ensayo de inhibición de la glucosa -6-fosfatasa	51
II.2.6.2.1.	Preparación de microsomas	52
II.2.6.2.2.	Ensayo general de la enzima G-6-Pasa	53

II.2.6.2.3. Determinación de proteínas	55
CAPITULO III.	56
III.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES	56
III.1.1. Resultados obtenidos en los ensayos biológicos	56
III.1.1.1. Resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de Artemia Salina	56
III.1.1.2. Resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa	57
III.1.2. Selección del extracto a separar y purificar	58
III.1.3. Separación y purificación de algunos de los componentes presentes en el extracto metanol-agua (EM) del alga Ulva lactuca.	60
III.1.3.1. Estudio de la fracción F5 (F191-334)	62
III.1.3.2. Estudio de la fracción F6 (F335-370)	64
III.1.3.3. Estudio de la fracción F7 (F400-447)	65
III.1.3.4. Porcentaje de las fracciones aisladas con respecto al EM.	67
III. 1.4. Resultados de las fracciones aisladas hacia distintos ensayos químicos	67
CAPITULO IV.	68
IV.1. DISCUSION DE RESULTADOS.	68
IV.1.1. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos para EM1	68
IV. 1.2. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos para	

EM3	77
IV.1.3. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos para EM4	91
IV.1.4. Discusión de resultados para el ensayo de mortalidad (Artemia Salina)	104
IV.1.5. Discusión de resultados para el ensayo de inhibición de la glucosa -6-fosfatasa.	105
IV.1.6. Discusión de resultados para los ensayos químicos realizados	107
CAPITULO V	112
V.1. CONCLUSIONES	112
V.2. RECOMENDACIONES	114
V.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
V.4. AGRADECIMIENTOS	120
V.5. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El alga verde <i>Ulva lactuca</i> (lechuga de mar)	16
Figura 2. Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo	25
Figura 3. Sistema de la glucosa-6-fosfatasa	26
Figura 4. Esteroles encontrados en algas verdes (I) y algas pardas (II)	27
Figura 5. Mecanismo hipotético para la formación biosintética del fucosterol y 28-isofucosterol	28
Figura 6. Esquema de separación de componentes de <i>Ulva lactuca</i> .	30
Figura 7. Bromofenoles encontrados en <i>U. lactuca</i>	32
Figura 8. Compuestos reportados en el EA para la <i>U. lactuca</i>	34
Figura 9. Compuestos reportados después de la hidrólisis ácida	34
Figura 10. Ruta biosintética propuesta para la formación de 2,4,6-TBF	35
Figura 11. Estructura química de los biopolímeros I y II en el ulvan	36
Figura 12. Estructura química de esteroles encontrados en <i>U. lactuca</i>	40
Figura 13. Esquema de separación propuesto para la separación de los compuestos en la <i>Ulva lactuca</i> .	48
Figura 14. Procedimiento para la obtención de Microsomas	52
Figura 15. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa	53
Figura 16. Procedimiento para la determinación de proteínas	55
Figura 17. Gráfico de porcentaje de mortalidad en función del extracto	57
Figura 18. Gráfico de porcentaje de inhibición de la enzima G-6-pasa para los extractos	58

Figura 19. Partición del extracto de hexano (EH)	59
Figura 20. Separación a través de columna cromatográfica de EM	61
Figura 21. Procedimiento para la purificación de la fracción F5	63
Figura 22. Procedimiento para la purificación de la fracción F6	65
Figura 23. Procedimiento para la purificación de la fracción F7	66
Figura 24. Estructura general de un ácido graso	69
Figura 25. Posible compuesto que forma parte de la fracción EM1	76
Figura 26. Estructura de la D-glucosa y D-fructosa	80
Figura 27. Estructura química de pentosas importantes	86
Figura 28. Estructuras químicas de las hexosas más importantes	88
Figura 29. Posibles compuestos que forman parte de la fracción EM3	91
Figura 30. Estructura de la D-mannosa y la D-lixosa	95
Figura 31. Posible compuesto que forman parte de la fracción EM4	103
Figura 32. Diagrama esquemático del mecanismo de la glucosa hepática	106
Figura 33. Mecanismo de acción para la reacción con ninhidrina	107
Figura 34. Reacción de pentosas y hexosas en ácido fuerte	108
Figura 35. Mecanismo para la formación de complejos coloreados para la reacción con α -nafol y orcinol	109
Figura 36. Reacción química de los carbohidratos con complejos de cobre	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de características y usos de principales de las algas	15
Tabla 2. Resumen de características morfoanatómicas del alga <i>U. lactuca</i>	18
Tabla 3. Composición química de la especie <i>Ulva lactuca</i>	19
Tabla 4. Composición de los distintos extractos de la <i>U. lactuca</i>	29
Tabla 5. Actividad antiinfluenza del polisacárido aislado de <i>U. lactuca</i> para distintos linajes de virus.	31
Tabla 6. Distribución de bromofenoles en la <i>U. lactuca</i> medido en ng/g	32
Tabla 7. Resultado de ensayo de toxicidad (A. salina) para la <i>U. lactuca</i>	37
Tabla 8. Composición de estoreles (%) para <i>U. lactuca</i>	39
Tabla 9. Actividad antiprozoaria in vitro del extracto etanólico de <i>U. lactuca</i>	40
Tabla 10. Masa del material de alga seca y del crudo metanólico	46
Tabla 11. Masa de los extractos después de realizar la separación	47
Tabla 12. Preparación de los sustratos.	53
Tabla 13. Resultados del ensayo de mortalidad de <i>Artemia Salina</i> aplicado al CM como a cada uno de los extractos EH, ED, EA, y EM.	56
Tabla 14. Resultados de ensayo de inhibición de la enzima G-6-pasa, aplicado al CM y a los extractos EH, ED, EA y EM	57
Tabla 15. Masa de los extractos provenientes de la partición del extracto de hexano (EH)	60
Tabla 16. Masa de las fracciones de la separación por cromatografía de columna de EM	62

Tabla 17. Masa de las subfracciones para la purificación de la fracción F5 por cromatografía de columna	63
Tabla 18. Masa de las subfracciones para la purificación de la fracción F6 por cromatografía de columna	64
Tabla 19. Masa de las subfracciones para la purificación de la fracción F7 por cromatografía de columna	66
Tabla 20. Porcentaje de las fracciones aisladas con respecto al EM.	67
Tabla 21. Resultados de las fracciones aisladas frente a diferentes ensayos químicos	67
Tabla 22. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) en CDCl_3 para EM1	69
Tabla 23. Tabla de asignaciones para un ácido graso en general en base a los datos de RMN obtenidos para la fracción EM1	69
Tabla 24. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) en CD_3OD para EM3	78
Tabla 25. Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN-DEPT (400 MHz) para EM3 en CD_3OD	79
Tabla 26. Asignaciones de desplazamientos químicos en la D.glucosa usando la data experimental para la fracción EM3.	80
Tabla 27. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H para las α -pentosas más importantes en D_2O .	87
Tabla 28. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H para las β -pentosas más importantes en D_2O .	87

Tabla 29. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C y RMN- ¹ H para las α-hexosas más importantes en D ₂ O	88
Tabla 30. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C y RMN- ¹ H para las β-hexosas más importantes en D ₂ O	89
Tabla 31. Cuadro comparativo entre la α-D-fructosa y la fracción EM3	89
Tabla 32. Cuadro comparativo entre la α-D-glucosa y la fracción EM3	90
Tabla 33. Cuadro comparativo entre el glicerol y la fracción EM3	90
Tabla 34. Datos espectroscópicos de ¹ H-RMN (270 MHz) y ¹³ C-RMN (67,5 MHz) en CD ₃ OD para EM4	93
Tabla 35. Datos espectroscópicos de ¹³ C-RMN-DEPT (400 MHz) para EM4 en CD ₃ OD	94
Tabla 36. Asignaciones de desplazamientos químicos para la D-Mannosa y la D-Lixosa usando la data experimental de la fracción EM4.	95
Tabla 37. Cuadro comparativo entre las fracciones EM3 y EM4	99
Tabla 38. Cuadro comparativo entre la α-D-mannosa y la fracción EM4	102
Tabla 39. Cuadro comparativo entre la α-D-lixosa y la fracción EM4	102

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN- ¹ H de la fracción EM1	70
Espectro 2. RMN- ¹³ C de la fracción EM1	71
Espectro 3. Cromatograma para la fracción EM1 de 0 a 40 min	73
Espectro 4. Espectro de masa de la fracción EM1 a los 29.834 min	74
Espectro 5. Espectro de masa de la fracción EM1 a los 37,317 min	75
Espectro 6. Espectro IR para la fracción EM1	76
Espectro 7. RMN- ¹ H de la fracción EM3	81
Espectro 8. RMN- ¹³ C de la fracción EM3	82
Espectro 9. RMN- ¹³ C y DEPT de la fracción EM3	83
Espectro 10. Espectros de masa para la fracción EM3	85
Espectro 11. RMN- ¹ H de la fracción EM4	96
Espectro 12. RMN- ¹³ C de la fracción EM4	97
Espectro 13. RMN- ¹³ C y DEPT de la fracción EM4	98
Espectro 14. Comparación de RMN- ¹³ C de la fracción EM3 y EM4	100
Espectro 15. RMN- ¹³ C de la fracción EM3 y EM4 (acercamiento)	101
Espectro 16. RMN- ¹³ C de la fracción EM3 (acercamiento)	123
Espectro 17. RMN- ¹³ C y DEPT de la fracción EM3 (acercamiento)	124
Espectro 18. RMN- ¹ H de la fracción EM3 (acercamiento)	125
Espectro 19. RMN- ¹³ C y DEPT de la fracción EM4 (acercamiento)	126
Espectro 20. RMN- ¹³ C y DEPT de la fracción EM4 (acercamiento)	127
Espectro 21. RMN- ¹ H de la fracción EM4 (acercamiento)	128

CAPITULO I.

I.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los grandes avances en medicina, todavía existen enfermedades que son causa de una gran mortalidad a nivel mundial. Entre estas enfermedades se encuentran el VIH (AIDS siglas en ingles), diferentes tipos severos de cáncer, la artritis y muchas enfermedades virales. Por otro lado, existen enfermedades para las cuales se han encontrado curas (por ejemplo tuberculosis) y sin embargo, en algunos casos, los microorganismos involucrados en dichas enfermedades se han vuelto resistentes a las terapias establecidas. Por lo antes expuesto, se entiende el interés y la vigencia en la búsqueda de nuevos fármacos, con el fin de tratar enfermedades que permitan mejorar la calidad de vida humana ^[1]. En estos momentos, alrededor de la mitad de todas las medicinas prescritas son extraídas, derivan o de alguna manera mimetizan compuestos presentes en plantas, animales y microorganismos, es decir, son de origen natural ^[2]. Tradicionalmente, las plantas terrestres han sido la principal fuente de metabolitos secundarios con uso medicinal, sin embargo, el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido acceder a los fondos de los océanos, lo cual se ha traducido en un mejor acceso a los organismos marinos allí presentes. Como consecuencia se ha incrementado la cantidad de compuestos registrados en el área de productos naturales marinos, muchos de ellos han mostrado ser biológicamente activos, lo cual los hace potenciales candidatos para el tratamiento de enfermedades humanas ^[3].

En lo que respecta al área de Productos Naturales Marinos, las investigaciones realizadas en los últimos 40 años están empezando a dar sus resultados. Así se tiene por ejemplo el Prialt un potente analgésico derivado de las conotoxinas (péptidos cíclicos de 20 a 30 residuos de aminoácidos) presentes en el veneno de los cónidos marinos ^[4]; actualmente éste fármaco es empleado en el tratamiento de dolores crónicos asociado a enfermedades terminales.

Algunos investigadores sugieren, que estos compuestos presentan actividad biológica debido a que han sido desarrollados por los organismos marinos sésiles cuya única defensa frente a depredadores y otros organismos que compiten por un mismo hábitat es una defensa química ^[5].

De todos los organismos marinos con gran auge e incidencia actual como lo son las esponjas, octocorales, algas, entre otros, en éste trabajo se ha prestado atención al estudio de las algas, en particular en el alga verde *Ulva lactuca*.

Las algas tienen un alto contenido de carbohidratos, proteínas, vitaminas y especialmente minerales (hasta 30% por volumen). En las civilizaciones orientales tradicionalmente se ha reconocido la importancia de las algas como fuente alimenticia para fortalecer la sangre, el corazón y el sistema circulatorio. Estudios científicos recientes han descubierto que las algas tienen efectos antimicrobianos, antivirales y anti cancerígenos. Se encontró también que el kombu, wakame, nori, hiziki y otras algas comunes reducen los niveles de colesterol en la sangre, previenen el desarrollo de la hipertensión, arteriosclerosis y mejoran el metabolismo de grasas. Además se ha descubierto que diversas variedades de algas contienen anticoagulantes sanguíneos similares a la heparina, el anticoagulante natural de la sangre que a menudo se suministra en forma intravenosa a los pacientes cardíacos para prevenir coágulos. En el Japón se ha demostrado que en las regiones donde los habitantes consumen mayor cantidad de algas la incidencia de longevidad es más elevada. También se pueden utilizar algas en baños de asiento para ayudar a aflojar las acumulaciones de grasa y mucosidad en las regiones del bajo abdomen y las áreas reproductoras ^[6].

A continuación se realizará una breve revisión bibliográfica sobre las algas, su clasificación e importancia, dando especial énfasis en las generalidades asociadas al alga *Ulva lactuca*, así como los trabajos químicos realizados hasta el presente para dicha especie.

El alga *Ulva lactuca* no ha sido estudiada anteriormente a nivel latinoamericano, es por ello que se plantea realizar un trabajo innovador en cuanto al estudio de la misma, de manera de poder extraer de ella algunos metabolitos secundarios importantes. En este caso específico y debido a que no hay antecedentes reportados para el género *Ulva* en contra de la diabetes, se evaluará la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa de los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol así como de los principales metabolitos aislados.

I.2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

I.2.1. LAS ALGAS

I.2.1.1. Definición ^[7]

El mundo de las algas se divide en distintos grupos filogenéticos, lo cual da lugar a varias divisiones taxonómicas. En general, las algas se definen de manera similar a las plantas, organismos fotosintéticos y acuáticos, pero a diferencia de las plantas no tienen una verdadera raíz, tallo, hojas o tejido vascular y poseen una forma de reproducción simple. Se distribuyen generalmente en el mar, en aguas superficiales y minoritariamente en la tierra. La mayoría son microscópicas, pero algunas son de gran tamaño.

Las algas tienen clorofila y pueden producir su propio alimento mediante la fotosíntesis. Recientemente las algas se reubicaron en el reino protista, que incluye una variedad de organismos unicelulares, organismos multicelulares simples y organismos multicelulares eucariota (con núcleos celulares separados con membranas).

La mayoría de las algas son eucariotas y llevan a cabo la fotosíntesis dentro de estructuras con membranas denominadas cloroplastos. La naturaleza exacta de estos cloroplastos es diferente según sea el tipo de alga. Sin embargo, estas divisiones tienen algunas características en común que las distinguen de otras divisiones de plantas. Típicamente, las algas poseen clorofila y son fotosintéticas, mientras que los hongos y organismos similares (mayoría de bacterias) son saprofitos o parásitos. Existen algas que pueden ser autotróficas o heterotróficas, según sean las condiciones a las cuales están expuestas. También algunas bacterias son fotosintetizadoras; sin embargo, normalmente producen azufre o algún compuesto de azufre como subproducto de su actividad metabólica, mientras que en las algas se produce oxígeno. Es más difícil distinguir ciertas algas de los protozoos

flagelados. Algunos organismos desnudos e incoloros, así como algunos otros portadores de clorofila, pueden ser considerados como algas o como protozoos. Típicamente, la presencia de una pared celulósica rígida en organismos unicelulares y flagelados es suficiente para clasificarlos entre las algas; pero esto es estrictamente arbitrario, puesto que muchos flagelados fotosintetizadores no poseen pared celulósica. Si se dispone de material en fase de reproducción, la distinción entre los grupos de algas y los demás grupos vegetales se hace mucho menos difícil. Las estructuras reproductoras de las algas son unicelulares, sin capas de células estériles.

Se distinguen ocho divisiones de algas: Cyanophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Charophyta, Phaeophyta, Ochrophyta y Rhodophyta, según Lindorf (1985).

I.2.1.2. Estructura ^[8]

La organización morfológica de las algas es muy variada: las más simples son células solitarias o agregados de células formando colonias y las más complejas son pluricelulares. La organización unicelular y la colonial se encuentra solamente en algas de las siguientes divisiones: Cyanophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Rhodophyta.

En las algas de las divisiones Charophyta y Ochrophyta están ausentes las formas unicelulares y las colonias. En las primeras cinco divisiones son muy frecuentes los unicelulares; en las Rhodophyta son más bien escasos. La organización pluricelular está presente en todas las divisiones, excepto en las Euglenophyta. Las formas pluricelulares aparecen como filamentos, pseudotejidos o tejidos verdaderos. Cuando la organización es tisular o pseudotisular el talo puede ser muy simple o muy complejo, independientemente de su constitución. Algunas algas son cenocíticas y están formadas por talos simples o complejos.

Las algas carecen generalmente de diferenciación en estructuras vegetativas, pero existen algunas especies con estructuras vegetativas definidas que se denominan rizoide, cauloide y filoide, por la analogía con los órganos típicos de las plantas vasculares: raíz, tallo y hoja. Los rizoides, cauloides y filoides se han observado en algas con organización tisular, pseudotisular y cenocítica.

Las algas no son plantas de grandes dimensiones, aunque algunas pardas (Phaeophyta) tienen cuerpos muy grandes. Debido a su hábitat y a sus dimensiones, por lo general pequeñas, la conducción de sales y minerales, así como el transporte de productos elaborados no constituyen problema en este grupo, por la cual no desarrollan tejidos vasculares. Sin embargo, en algunas algas pardas muy grandes se ha señalado un tejido conductor de productos elaborados, como el floema.

Los tipos unicelulares de algas frecuentemente poseen la capacidad de locomoción con la ayuda de uno a o varios flagelos. En relación al tamaño los flagelos pueden ser de igual longitud y se llaman isocontos, o de largo desigual llamándose anisocontos o heterocontos. Algunos flagelos están cubiertos por apéndices diminutos llamados mastigonemas o bárbulas; este tipo de flagelo se llama barbulado, en cepillo o plumoso. Los flagelos desprovistos de mastigonemas se llaman flagelos lisos o en forma de látigo. Las células reproductoras sexuales y asexuales de las algas pueden ser flageladas, en cuyo caso se denominan zooides, al igual que los organismos flagelados unicelulares. Los zooides están presentes en todas las divisiones, excepto en Cyanophyta y Rhodophyta. En algunas de las divisiones existen representaciones unicelulares ameboides.

Las algas filamentosas se fijan, por lo general, mediante una célula de fijación; las laminares o de otros tipos, sean tisulares o pseudotisulares, se fijan mediante un sistema de rizoide. Algunas algas macroscópicas viven a la deriva del mar, como los grandes sargazos, los cuales se mantienen a flote mediante vesículas especiales llamadas aerocistes.

I.2.1.3. Reproducción ^[8]

Las algas se pueden reproducir sexual y asexualmente. La reproducción sexual se lleva a cabo normalmente mediante la producción de gametos, pudiendo ser isógama, anisógama y oógama. En los representantes unicelulares los organismos mismos pueden funcionar como gameto (hologamia). En pocos casos, como en las algas conjugadas la reproducción sexual es por somatogamia.

Los gametangios y los esporangios de las algas son típicamente unicelulares y, muchas veces, indiferenciados del resto de las células del talo. En algunas especies los gametos o las esporas se producen en estructuras pluricelulares, pero en estos casos cada célula se considera un gametangio o un esporangio, según sea el caso, y al conjunto se le denomina gametangio o esporangio plurilocular. A excepción de los charófitos, los gametangios de las algas no están cubiertos por células estériles. Tampoco los esporangios de las algas tienen cubiertas estériles protectoras.

En las algas se encuentran los tres ciclos de la vida descritos por las plantas. El ciclo más simple que se representa es el haplontico. Se observa en las algas más sencillas y es típico de varias formas filamentosas. El ciclo diplontico es menos frecuente presentándose en las diatomeas, en algunas algas pardas y en algunos otros casos, y el caso haplodiplontico el cual es característico de las algas rojas más avanzadas y también es típico de algunas algas verdes y pardas.

En la mayoría de las algas el cigoto es una estructura de vida libre, pero en algunas algas pardas como laminaria y géneros afines, el cigoto es retenido sobre el gametofito femenino y así mismo el esporofito en sus primeras etapas de desarrollo.

La reproducción asexual de las algas muestra gran variedad, pudiendo desarrollarse mediante zoosporas o aplanosporas, por bipartición, fragmentación o propágulos, así como por fragmentos vegetativos.

I.2.1.4. Organización

Además de formas estrictamente unicelulares, se presentan entre las algas formas coloniales o pluricelulares con estructuras y anatomías a veces convergentes que se suelen clasificar en los siguientes biotipos:

- Colonial: Pequeños grupos de unicelulares móviles laxamente agregadas y más o menos regularmente dispuestas.
- Capsoide: Células poco numerosas encerradas en una cápsula mucilaginosa común.
- Coccoide: Unicelulares envueltas en una pared celular.
- Palmeloide: Células inmóviles y numerosas encerradas en una cubierta de mucílago.
- Filamentoso: Células formando un encadenamiento, a veces ramificado.
- Pseudoparenquimatoso: muy común en algas rojas (Rhodophyta)
- Parenquimatoso: Células formando un talo, un agregado denso, pluriestratificado con algún grado de diferenciación celular.

I.2.1.5. Ecología

La función ecológica más conocida de las algas es la producción primaria, son los principales productores de materia orgánica a partir de la inorgánica en el mar, de esta manera la materia orgánica ingresa a las cadenas tróficas. Este paso puede producirse por el consumo de algas, la absorción de nutrientes disueltos de origen vegetal por otros organismos, o por la descomposición de éstas.

Hay algas en todos los ambientes acuáticos donde existe luz, unas veces en el plancton otras en los bentos, pero algunas se encuentran en ambientes terrestres húmedos, como es el caso de algunas algas como el verdín que crece en muros y cortezas.

Son notables las algas que forman asociaciones simbióticas con organismos heterótrofos. Éste es el caso de las que forman líquenes en asociación con hongos. También de los simbiontes unicelulares que se encuentran en muchos animales marinos.

Existen formas unicelulares hipertermófilas (crecen en fuentes termales), entre las que se encuentran las algas rojas. Son de gran interés biológico, porque esta condición es única entre los organismos eucariontes. Algunas algas eucariontes unicelulares protagonizan a veces mareas tóxicas.

I.2.1.6. Clasificación ^[8]

Los taxónomos suelen usar un sistema de clasificación que las distribuye en reinos diferentes. Las investigaciones actuales sugieren que existen, al menos 16 líneas filogenéticas, grupos de organismos con un antepasado común, o divisiones.

Las divisiones de las algas se definen según determinadas características:

- La composición de la pared celular.
- Los pigmentos fotosintéticos.
- Los productos de reserva.
- Los flagelos de las células móviles.
- La estructura del núcleo, el cloroplasto, el pirenoide, zona del cloroplasto que participa en la formación de almidón; y la mancha ocular, orgánulo constituido por una gran concentración de lípidos.

Las algas constituyen un conjunto polifilético, es decir, que sus miembros están dispersos entre distintos grupos de parentesco.

PROCARIOTAS: Sólo un grupo de procariotas ha sido tratado habitualmente bajo el concepto de algas:

➤ **DIVISIÓN CYANOPHYTA o CIANOBACTERIA:** Las Cyanophyta, cianófitos o algas verdeazules, difieren del resto de las algas y demás plantas verdes, por ser organismos procarióticos y, por lo tanto, el material nuclear y el material fotosintético no están delimitados del citoplasma por membranas, también carecen de organelos, tales como mitocondrias, dictiosomas y retículo endoplasmático.

Son algas cosmopolitas, encontrándose en hábitat aéreo, terrestre y acuático; muchas son constituyentes del plancton, otros son componentes de los líquenes y algunas conviven con animales inferiores. Un cierto número de cianobacterias puede asimilar nitrógeno atmosférico y son conocidas sus asociaciones con hepáticas y musgos, donde ocupan cavidades especiales.

EUCARIOTAS: Muchos grupos de eucariotas, todos clasificados habitualmente en el reino Protista, son considerados bajo el concepto de algas. En la mayoría de los casos coinciden en el mismo clado (rama evolutiva) con formas heterótrofas que tradicionalmente se han descrito como “protozoos” o como “hongos” (falsos hongos).

➤ **DIVISION CHLOROPHYTA:** Esta es la división más numerosa de las algas y se les conoce como algas verdes o clorófitas.

Las algas verdes son adaptables, presentándose tanto en el aire como en el suelo y en las aguas dulces o marinos como constituyentes importantes del plancton; algunas son epífitas sobre otras algas o sobre plantas superiores; unas cuantas son componente de los líquenes y otras viven en el interior de protozoarios, celenterados y esponjas.

Algunas algas verdes tienen el talo impregnado con carbonato de calcio. La impregnación puede ser total o pueden formarse placas quedando porciones del talo sin recubrir. Las algas calcificadas son importantes en la formación de arrecifes, entre otras.

➤ **DIVISION EUGLENOPHYTA:** Las plantas de esta división han sido asignadas, muchas veces, tanto al Reino Vegetal como al Animal, debido a que existen representantes verdes autótrofos, así como también, representantes incoloros heterótrofos. Los euglenófitos se encuentran en ambientes de agua dulce rica en materia orgánica o en aguas salobres o salinas.

En muchos aspectos son similares a los representantes flagelados de las Chlorophyta, pero se distinguen principalmente por carecer de pared celular, es decir, que son desnudas; además se diferencian por sus flagelos y por el tipo de carbohidrato de reserva.

➤ **DIVISION CHAROPHYTA:** Comprende algas haplontes, abundantes en lagos y estanques; a diferencia de muchas otras algas que ocupan estos ambientes y son pocos conspicuas, las Charofitas, en cambio, muestran una complejidad morfológica notable. Poseen el cuerpo organizado en sistema de nudos y entrenudos, fijado al sustrato por medio de rizoides. El cuerpo original, derivado de la germinación del cigoto, es un filamento con una célula apical que por sucesivas divisiones produce células nodales e internodales. De las células nodales se producen apéndices de apariencia similar a hojas pero que, sin embargo, corresponden a ramificaciones conformadas igualmente por células nodales e internodales. En algunas especies, células procedentes de los nudos crecen en dirección ascendente o descendente a lo largo de la célula internodal adosándose fuertemente a ella, originándose así una corticación. Muchos representantes de esta clase están fuertemente calcificados.

➤ **DIVISION OCHROPHYTA:** Esta división comprende dos clases: Phaeophyceae y Chrysophyceae. En la clase Phaeophyceae existen sólo cinco géneros de agua dulce, los restantes son algas marinas. Generalmente se trata de algas macroscópicas y no existen representantes de organización unicelular y colonial. Algunas han llegado a formar tejidos verdaderos. Son conocidos también como algas pardas. Los representantes marinos pueden crecer fijados a rocas o moluscos en la zona intermareal o vivir flotando en medio del océano, como los

grandes sargazos que llegan a medir hasta 50 metros; en general, son más abundantes en las aguas frías o templadas. Existen también representantes epífitos de tamaño microscópico. En la clase Chrysophyceae predominan los carotenos y xantofilas sobre las clorofilas. En este aspecto y otros, tales como la organización de sus tilacoides y el tipo de sustancia de reserva, estas plantas se asemejan a la clase ya tratada.

➤ **DIVISION PYRROPHYTA:** La mayoría de los miembros de esta división son unicelulares pero existen algunos filamentosos o coloniales. Los representantes unicelulares suelen ser flagelados, aunque también existen formas aflageladas, hasta ameboides.

La división Pyrrophyta comprende dos clases: Desmophyceae y Dinophyceae, que se relacionan por los pigmentos y el tipo de sustancia de reserva. Los representantes flagelados de las dos clases se distinguen por la posición de los flagelos y por la constitución de la pared, en la forma que no es desnuda. En las Desmophyceae los flagelos son apicales y la pared esta dividida verticalmente en dos valvas continuas. En los Dinophyceae los flagelos están inmersos en un surco que atraviesa transversalmente la célula. La pared no esta dividida en valvas verticales y es homogénea o consiste de varias placas articuladas.

Las Pyrrofitas son constituyentes importantes del plancton, tanto marino como de agua dulce; mucho de ellos son tóxicos para la fauna acuática y otros emiten luz, es decir, presentan el fenómeno de bioluminiscencia. Existen también representantes simbióticos y parásitos.

➤ **DIVISION RHODOPHYTA:** Las Rodofitas se reconocen usualmente por su coloración rojiza causada por las bilioproteínas (ficobilinas): ficoeritrina y ficocianina, por lo que se conocen como algas rojas. Algunas especies marinas habitan las zonas rocosas de marea, pero la mayoría viven en aguas más profundas; las especies de agua dulce crecen en agua más fría, bien aireada. Dependiendo de la

proporción entre las ficobilinas: ficoeritrina y ficocianina, las algas rojas serán de color rojo sanguíneo, verde azulado o hasta negro. Algunas rodofitas cuando están expuestas a mucha luz son de color verde parduzco, mientras que en lugares más sombríos muestran su color rojo característico; esto ocurre porque la mayor cantidad de luz destruye la ficoeritrina, mientras que cuando no hay tanta luz la ficoeritrina se mantiene, enmascarando a la clorofila, este fenómeno es conocido como adaptación cromática.

Tabla 3. Resumen de características y usos de principales de las algas

Alga	Características	Usos
Algas rojas	<p>Deben su color a un pigmento rojo llamado ficoeritrina, que oculta la clorofila.</p> <p>Son casi exclusivamente marinas, de aguas templadas y calientes.</p> <p>Se crían sobre las rocas a poca profundidad. La mayoría son muy ramificadas pero no sobrepasan la longitud de un metro.</p>	<p>De ellas se extrae el agar-agar, que se usa en los cultivos de hongos y bacterias, en la medicina y en la cosmetología debido a su valor proteico. También se utiliza en confituras, en jaleas y en fotografía.</p>
Algas verdes	<p>Deben su color a la clorofila, a la que muchas veces se agregan otros pigmentos como el caroteno o la xantófila, de color anaranjado y amarillo respectivamente.</p> <p>Muchas algas verdes viven en los mares ya sea fijas en las rocas o flotando libremente. Ej.: lechuga de mar y pasto de mar.</p>	<p>En algunas regiones del mundo la ulva y la laminaria son productos alimenticios, especialmente en oriente. Es allí donde son utilizadas para producir gelatinas y sushi.</p>
Algas pardas	<p>Se distinguen por su color verde oliva o también pardo debido a la ficoxantina, que enmascara a la clorofila.</p> <p>Viven sobre las rocas a profundidades cercanas a los 20 metros.</p> <p>Ciertas algas pardas pueden alcanzar los 30 metros de longitud.</p>	<p>Se extrae yodo de una variedad de algas pardas llamada kelp.</p> <p>Este tipo de algas también sirve para la obtención de algina. Esta es una sustancia proteica compuesta por ácidos alginicos, los cuales tienen gran importancia en la industria de los colorantes, plásticos, aislantes, explosivos y de telas impermeables.</p>

I.2.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ALGA VERDE *ULVA LACTUCA*

El alga marina a estudiar en el presente Trabajo Especial de Grado es: *Ulva lactuca*. A continuación se muestra su clasificación taxonómica así como una breve descripción morfoanatómica de la misma.

I.2.2.1. Clasificación taxonómica



Figura 1. El alga verde *Ulva lactuca* (lechuga de mar)

Reino: Protista

Phylum: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Familia: Ulvaceae

Orden: Ulvales

Género: *Ulva*

Especie: *lactuca*

Clasificación según: Linneo 1753

Nombre común: Lechuga de mar

I.2.2.2. Descripción morfoanatómica ^[9]

Esta alga verde, marina, presenta un talo laminar, suborbicular, más o menos lobulado y ondulado, de color verde brillante o ligeramente amarillo-verdoso, fijado al sustrato por un pequeño disco basal pluricelular con apéndices rizoidales. En corte transversal se puede observar que toda la lámina está formada por dos capas de células semejantes y en las que se encuentra un cloroplasto parietal, provisto de uno o dos pirenoides. *Ulva lactuca* se encuentra en todos los mares del mundo.

Aspectos reproductivos: Especie dioica cuyos talos productores de gametos masculinos (gametófitos masculinos) se distinguen de los productores de gametos femeninos (gametófitos femeninos) por la tonalidad de los márgenes de la lámina: verde amarillento en los primeros y verde oscuro en los segundos. Ambos talos son haploides y es precisamente en sus márgenes donde se localizan los correspondientes gametangios. Cada gametangio masculino origina 16-32 gametos flagelados y cada uno de los femeninos 8-16 gametos también flagelados. Los dos tipos de zoogametos son muy parecidos: piriformes, con un cloroplasto posterior y dos flagelos iguales en posición apical (acrocontos); sin embargo, los masculinos son ligeramente más pequeños que los femeninos. La reproducción sexual es una típica anisogamia.

El cigoto formado (ya diploide) presenta durante un cierto tiempo cuatro flagelos, es decir, cuadriflagelado; posteriormente adquiere una forma esférica, pierde los flagelos y se fija al sustrato; después de sucesivas divisiones origina un nuevo talo, morfológicamente idéntico a los anteriores, pero cuyas células son diploides. Este nuevo talo (esporófito) es el que produce las esporas de paso (meiósporas) en los correspondientes esporangios, que se localizan en sus márgenes. En los esporangios, por meiosis, se originan 4 u 8 meiósporas, que, una vez en el exterior, se proveen de cuatro flagelos en la parte apical y son piriformes (similares a los gametos pero de mayor tamaño), con un plasto posterior provisto de un pirenoide. Estas zoósporas dan lugar, una vez fijadas al sustrato, bien a los

gametófitos masculinos o a los femeninos, ya que la determinación del sexo ha tenido lugar en la meiosis y las meiósporas están definidas sexualmente. Bajo determinadas circunstancias los zoogametos, por partenogénesis (sin fecundación), pueden originar gametófitos o esporófitos (en este caso haploides).

En síntesis, *Ulva lactuca* es un diplobionte, que presenta un ciclo donde alternan dos generaciones morfológicamente iguales (digenético isomórfico) y dos fases nucleares, una haploide y otra diploide (diplohaplofásico).

Tabla 4. Resumen de características morfológicas y microscópicas del alga *Ulva lactuca*

CARACTERES MORFOLÓGICOS	CARACTERES ANATÓMICAS
Talo laminar	Células poliédricas
Color verde brillante	Cloroplasto en forma de copa (semilunar)
Margen ondulado y finamente dentado	Un solo pirenoide
Fijación por disco	Células orgnizadas en parénquima
Zona basal muy firme	La sustancia de reserva es el almidón
Pequeños discos pardos de epífito	

I.2.2.3. Composición química de la macroalga *Ulva lactuca*

Tabla 3. Composición química de la especie *Ulva lactuca*^[31]

Constituyente	Porcentaje (%)
Proteínas	4,62
Carbohidratos	33,12
Grasas	5,84
Cenizas	31,05
Nitrógeno	0,74
Fósforo	0,089
N/P	8,31
Humedad	88,70

I.2.3. DIABETES Y MECANISMO DE LA GLUCOSA

I.2.3.1. Definición ^[10]

La diabetes es una enfermedad crónica debida a la deficiencia del páncreas de producir insulina suficiente para regular el azúcar. También se origina cuando el organismo no es capaz de asimilar la insulina producida. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre (glicemia). La hiperglicemia (aumento de la glicemia) es un efecto frecuente de la diabetes no controlada, y con el tiempo produce importantes lesiones en muchos sistemas del organismo, y en particular en los nervios y los vasos sanguíneos.

I.2.3.2. Tipos

La diabetes de tipo 1 (antes conocida como diabetes insulino dependiente o de inicio en la infancia) se caracteriza por una ausencia de la producción de insulina. Sin la administración diaria de insulina exógena, este tipo de diabetes lleva rápidamente a la muerte. Sus síntomas, que pueden aparecer bruscamente, consisten en una producción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante, pérdida de peso, alteraciones visuales y fatiga.

La diabetes de tipo 2 (antes conocida como diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) se debe a que el organismo no utiliza eficazmente la insulina. El 90% de los diabéticos del mundo padecen diabetes de tipo 2, que se debe en gran parte a la inactividad física y al peso corporal excesivo. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero menos acentuados. En consecuencia, es posible que la enfermedad sólo se diagnostique varios años después de su inicio, una vez que ya han aparecido sus complicaciones.

Hasta hace poco, este tipo de diabetes sólo se observaba en los adultos, pero ahora también empieza a verse en niños obesos.

La diabetes gestacional es la hiperglucemia que se identifica por vez primera durante el embarazo. Sus síntomas son similares a los de la diabetes de tipo 2, pero suele diagnosticarse por las pruebas realizadas durante los exámenes prenatales, más que por la manifestación de síntomas.

Las alteraciones de la tolerancia a la glucosa y de la glucemia en ayunas son trastornos de transición entre la normalidad y la diabetes. Los pacientes con estos trastornos tienen mayor riesgo de progresar hacia la diabetes de tipo 2, aunque esto no es inevitable.

I.2.3.3. Datos sobre la diabetes ^[10]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay más de 180 millones de personas con diabetes, y es probable que esta cifra aumente a más del doble para el año 2030.

Se calcula que en 2005 hubo 1,1 millones de muertes debidas a la diabetes.

Aproximadamente un 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos o medios.

Casi la mitad de las muertes por diabetes ocurren en pacientes de menos de 70 años, y el 55% en mujeres.

La OMS calcula que las muertes por diabetes aumentarán en más de un 50% en los próximos 10 años si no se toman medidas urgentes. Es más, se prevé que entre 2006 y 2015 las muertes por diabetes aumenten en más de un 80% en los países de ingresos medios altos.

I.2.3.4. Consecuencias frecuentes de la diabetes

La diabetes puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, ojos y nervios.

La retinopatía diabética debida al daño de los pequeños vasos de la retina acumulada a lo largo del tiempo, es una importante causa de ceguera. Al cabo de 15 años con diabetes, aproximadamente un 2% de los pacientes están ciegos, y cerca del 10% sufren un grave deterioro de la visión.

La neuropatía diabética se debe al daño de los nervios a consecuencia de la diabetes, y puede llegar a afectar a un 50% de los diabéticos. La neuropatía diabética puede causar muchos problemas diferentes, pero los síntomas más frecuentes son hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y manos.

Combinada con la disminución del flujo sanguíneo, la neuropatía incrementa el riesgo de úlceras en los pies y, finalmente de amputación del miembro inferior.

La diabetes se encuentra entre las principales causas de insuficiencia renal. Un 10% a 20% de los pacientes con diabetes fallecen de insuficiencia renal.

La diabetes aumenta el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral. El 50% de los pacientes con diabetes fallecen de enfermedades cardiovasculares (principalmente cardiopatías y accidentes vasculares cerebrales).

En general, el riesgo de muerte de los diabéticos es al menos el doble que el de los no diabéticos.

1.2.3.5. Metabolismo de la glucosa ^[11]

La suma de todas las reacciones químicas necesarias para mantener la vida se denomina metabolismo, estas reacciones se llevan a cabo en el interior de la célula.

Las células producen energía aprovechable descomponiendo la glucosa en compuestos de menor energía y capturando parte de su energía liberada en forma de ATP.

La primera fase de la degradación de glucosa es la glucólisis, en la que la molécula de glucosa con seis átomos de carbono por la acción de diferentes enzimas se convierte en dos moléculas de ácido pirúvico en presencia de oxígeno, y en dos de ácido láctico en ausencia de éste. La segunda parte corresponde a la respiración, la cual necesita de la presencia de oxígeno, y se realiza en las mitocondrias, consta de dos partes el ciclo de Krebs y el transporte terminal de electrones.

Durante la oxidación de la molécula de glucosa, se pueden formar un máximo de 38 moléculas de ATP mayormente producidas dentro de la mitocondria. Las células pueden obtener energía también de otras moléculas distintas de la glucosa. Otros monosacáridos, grasas y proteínas se descomponen en moléculas que se introducen en alguna etapa de la oxidación de la glucosa.

El proceso de captación de glucosa por las células es regulado hormonalmente por las secreciones de una glándula anexa del sistema digestivo denominado páncreas. El páncreas posee tanto una función endocrina como exocrina. En su función exocrina libera enzimas al tracto digestivo, mientras que en su función endocrina se secretan diferentes hormonas al torrente sanguíneo para coordinar y regular el uso de la glucosa.

El páncreas exocrino es una glándula acinar lobulada y ramificada en la que las células secretoras están agrupadas dentro de acinos. En la unión de los acinos y los ductos están las células centroacinares que secretan componentes no enzimáticos del jugo pancreático, incluyendo bicarbonato. La secreción del jugo pancreático es regulada por estimulación hormonal, principalmente por secretina, colecistocinina y gastrina, también por estimulación neural. Las células endocrinas

están agrupadas dentro de los islotes de Langerhans, los que son pequeños grupos celulares esferoidales compactos embebidos en el tejido exocrino. Existen cuatro tipos principales de células endócrinas. Las α (o A o A2) que secretan glucagón, las β (o B) que secretan insulina y también un antagonista de la insulina denominado amilina, y constituyen la mayoría de células en el islote, las δ (o D o A1) que secretan somatostatina y las PP (o F) que secretan el polipéptido pancreático.

La insulina y el glucagón son los responsables de los niveles de glucosa en sangre, juntas ayudan a mantener casi constante este nivel. Cuando el nivel de glucosa en sangre se eleva, (debido por ejemplo a la ingesta de alimento), se libera la insulina, que es la responsable de que las células del cuerpo absorban la glucosa y la metabolicen para obtener energía, o bien la almacenen para formar glucógeno. Si los niveles de glucosa en la sangre son bajos se libera el glucagón que activa a enzimas hepáticas que desdoblan el glucógeno almacenado por lo general en el hígado, liberando la glucosa hacia el torrente sanguíneo.

La insulina es una proteína dimérica sintetizada como un precursor de cadena simple que primero pierde el péptido señal, posteriormente pierde un segmento conocido como péptido C, antes de llegar a ser la molécula hormonal madura. La insulina madura es almacenada en gránulos secretores cuya liberación es controlada por el nivel de glucosa en sangre. Los efectos de la insulina sobre sus tejidos blanco, son metabólicos, promueven la captación de glucosa e inducen la mitosis.

En el ser humano los defectos en la producción, liberación o recepción de la insulina son responsables de la producción de la enfermedad (Diabetes).

En términos más concretos la diabetes mellitus es una enfermedad que produce alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; cuando la enfermedad alcanza pleno desarrollo, se caracteriza por hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con larga evolución de la enfermedad, se

presentan complicaciones renales y oculares, así como afección de arterias coronarias, enfermedad vascular periférica y neuropatía.

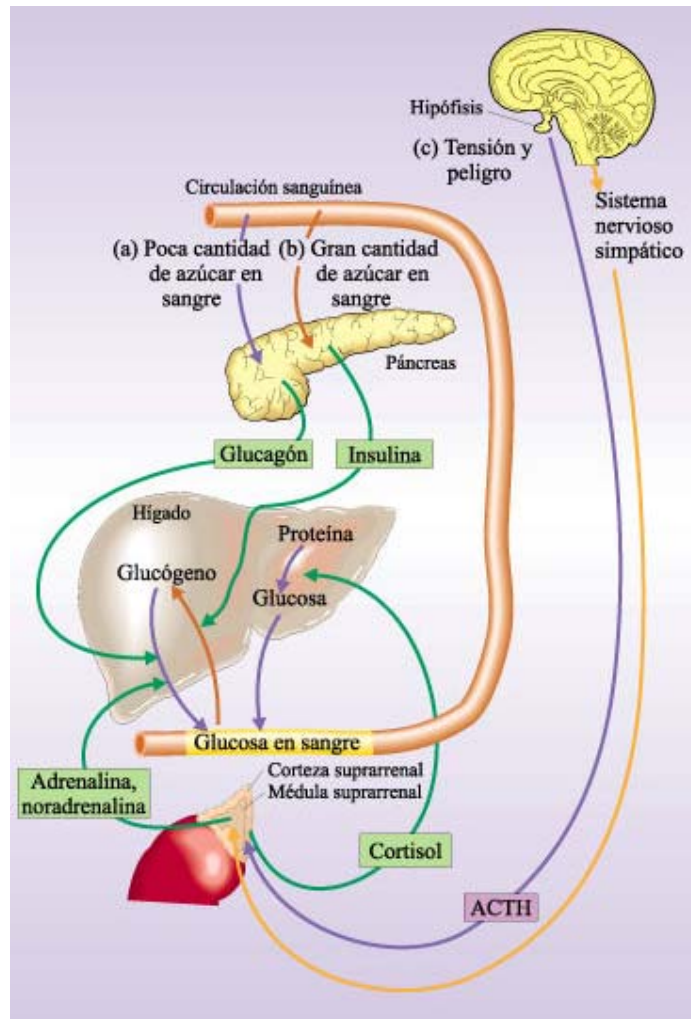


Figura 2. Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo

I.2.3.6. Sistema de la Glucosa-6-fosfatasa

Durante el periodo de ayunas en el organismo existen dos mecanismos principales de producción de glucosa con la finalidad de mantener los niveles de azúcar constantes en la sangre, estos son: La gluconeogénesis (a partir de moléculas simples tales como piruvato, lactato, aminoácidos gluconeogénicos y

glicerol) y la glucogenólisis (degradación del glucógeno hepático). El paso final de ambas rutas metabólicas involucra la formación de la glucosa-6-fosfato, la cual es degradada por la enzima glucosa-6-fosfatasa. La glucosa-6-fosfatasa es una enzima gluconeogénica presente en el retículo endoplasmático, en la envoltura nuclear del hígado, riñón y enterocito.

En 1991 se describió la glucosa-6-fosfatasa como un sistema multicomponente, formado por 5 polipéptidos: la subunidad catalítica glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), una proteína estabilizadora (PE) ^[12]. El sitio activo de la G-6-Pasa está orientado hacia adentro del lumen del retículo endoplasmático (RE), esto hace necesario transportadores de sustratos a través de la membrana del retículo endoplasmático, por lo que existen tres proteínas transportadoras: T1, T2 y T3; las cuales transportan glucosa-6-fosfato, fosfato y glucosa a través de la membrana del retículo endoplasmático respectivamente. Este sistema puede apreciarse claramente en la siguiente figura:

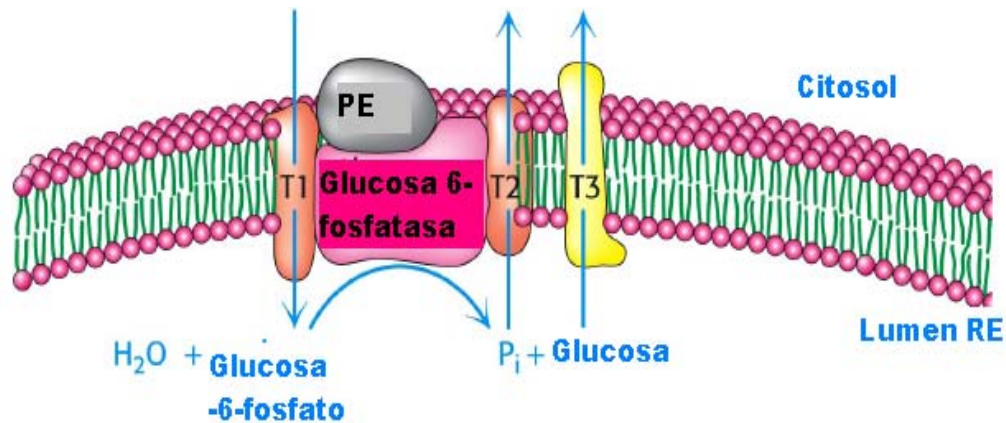


Figura 3. Sistema de la glucosa-6-fosfatasa

Este modelo sencillo sugiere que la deficiencia de cualquiera de las proteínas involucradas en el sistema de la G-6-Pasa disminuiría la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato y por ende la producción de glucosa hepática. Existen inhibidores reportados tanto para la enzima G-6-Pasa, como para el transportador T1 de manera de impedir la hidrólisis del sustrato o simplemente su entrada al lumen.

I.3. ANTECEDENTES

La revisión de los trabajos de la especie *Ulva lactuca* fue realizada de manera de considerar sólo aquellas investigaciones para las cuales se haya aislado compuestos químicos, considerando también aquellos trabajos en los cuales se haya medido alguna actividad biológica importante en contra de enfermedades.

En uno de los primeros estudios encontrados (1968), se investigaron los esteroides mayoritarios presentes en algunas algas verdes, de la clase Chlorophyceae, debido a su importancia tanto a nivel biogénico como taxonómico [13]. Se aislaron el 28-isofucoesterol (I) de las algas *Enteromorpha intestinalis* (actualmente conocida como *Ulva intestinalis*), *Enteromorpha linza* (*Ulva linza*) y *Ulva lactuca*, lo que les permitió proponerlo como un metabolito característico de las Ulvaceae. Este compuesto aislado es el isómero del fucoesterol (II), el cual es típicamente encontrado en las algas pardas (Phaeophyceae). Otros investigadores propusieron un mecanismo para la introducción del grupo etileno en C-24 y la isomerización de los etilidenos en las cadenas laterales de los fitoesteroides [14] (figura 5). El aislamiento de fucoesterol y 28-isofucoesterol de fuentes naturales, demostró que el mecanismo de transmetilación que aplica en un organismo particular, debe involucrar un control estereoespecífico enzimático en la eliminación del hidrógeno para producir uno u otro isómero.

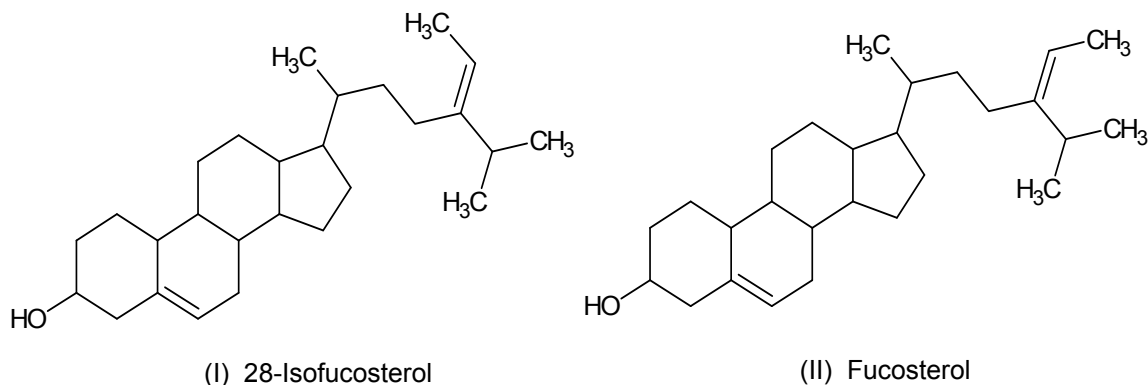


Figura 4. Esteroides encontrados en algas verdes (I) y algas pardas (II)

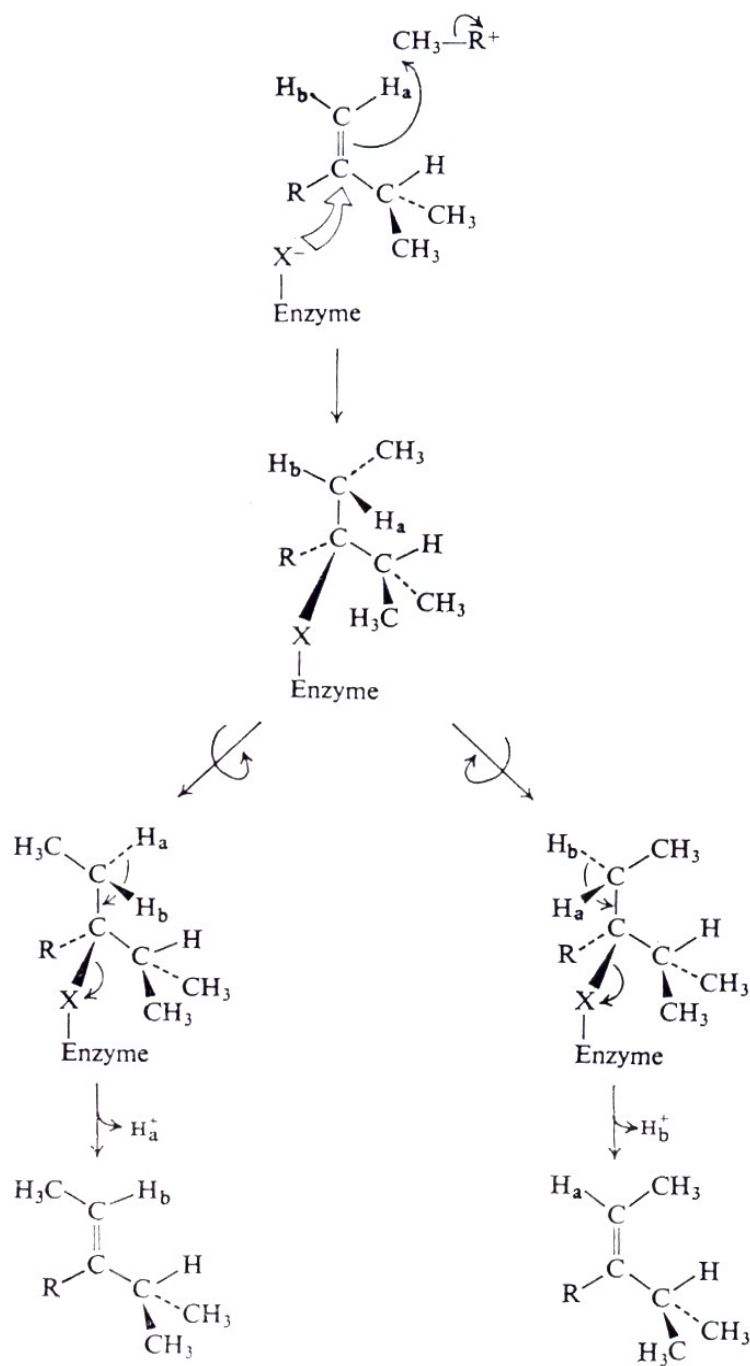


Figura 5. Mecanismo hipotético para la formación biosintética del fucosterol y 28-isofucosterol

En 1987, se registró material glicoproteínico presente en el alga verde *Ulva lactuca*, el cual difería significativamente en sus unidades de carbohidratos y proteínas ^[15]. Los patrones observados en la electroforesis del material aislado mostraron la presencia, en cada uno de los componentes, de glicoproteínas y polisacáridos. Este grupo de trabajo reportó en la *U. lactuca* un contenido de proteínas (12,5%), residuos de ácido glucurónico (12,5%), xilosa (15%), ramnosa (3,8%) y glucosa (1,4%). El análisis cualitativo de la composición aminoácida del alga indicó la presencia de: alanina, arginina, ácido aspártico, ácido cisteico, glicina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina.

Una muestra del material del alga fue extraído en sucesión con agua (A), 0,9% NaCl (B), 1% oxalato de amonio (C), 0,2M buffer acetato (pH 5) (D), buffer fosfato (pH 6) (E), buffer de citrato-fosfato (pH8) (F), y 1M NaOH (G). Cada uno de los extractos mostró por electroforesis un contenido de mezclas de polisacáridos y glicoproteínas junto con una proteína en B (oxalato de amonio 1%) y G (NaOH 1M), pero en proporciones distintas en cada extracto. En la tabla 4 se da la composición de cada extracto. Y debido a que G presentó la mayor cantidad de carbohidratos y proteínas se pasó por una columna cromatográfica DEAE-celulosa.

Tabla 4. Composición de los distintos extractos de la *U. lactuca*

General		Composición monosacáridos (% total)						
Extracto	Alga (%)	Carbohi- drato (%)	Proteína (%)	Ác. (%)	Glut.	Glucosa	Xilosa	Ramnos a
A	10,9	31	14	56	5	12,5	26,5	
B	5,2	7	14	63	12	5	20	
C	5,2	30	12	84	--	10	6	
D	4,2	30	15	86	4	2	8	
E	5,8	17	10	93	--	5	2	
F	6,3	28	14	61	6	8	30	
G	12,3	42	29	69	9	5	17	

Varios años después, un grupo de investigación aisló un polisacárido, el ulvan, del alga marina *Ulva lactuca*. La muestra fue estudiada después de realizarse una hidrólisis ácida y el material resultante fue analizado por cromatografía de gases [16]. El esquema de separación de las fracciones es mostrado en la figura 6.

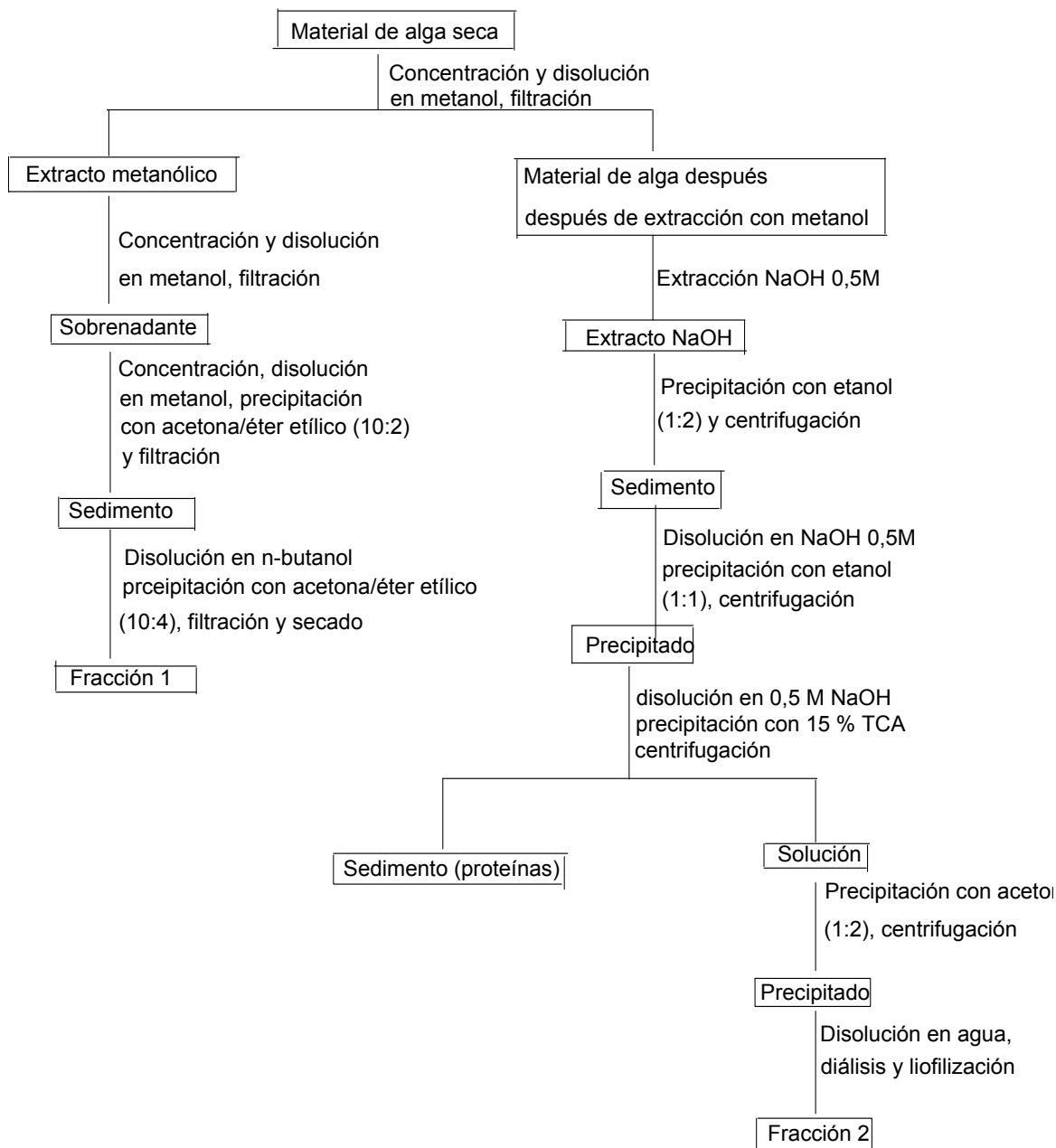


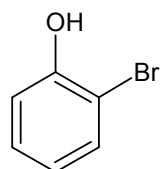
Figura 6. Esquema de separación de componentes de *Ulva lactuca*.

Tabla 5. Actividad antiinfluenza del polisacárido aislado de *U. lactuca* para distintos linajes de virus.

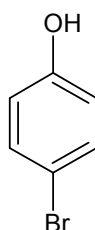
Sistema de ensayo	Linaje de virus	de MIC (mg/mL)	Máx. inhibición	MTC/MIC	OD ₄₅₀ (% de control)
CAM	A/PR/8	0,25	3,6	8	----
	A/Hong Kong	0,12	2,5	16	----
	A/Victoria	0,50	----	1	15,4
MDCK	A/Singapore	0,12	----	5	72,7
	A/Beijing	0,12	----	5	71,6
CEF	A/Germany	0,50	----	3	50,4

El ulvan fue estudiado en cuanto a su actividad antiviral in vitro. En la tabla 5 se resumen los resultados obtenidos para distintas líneas de virus de las influencias. Se consideró una buena actividad antiinfluenza cuando la relación MTC/MIC fue mayor a 8, considerando esto, el polisacárido ulvan sólo inhibió eficientemente el linaje de virus de Hong Kong. Los carbohidratos del polisacárido aislado, fueron analizados por TLC y comparados con estándares de Rf. Los carbohidratos hallados fueron: arabinosa, xilosa, ramnosa, galactosa, mannososa y glucosa.

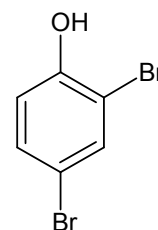
En 1999, se estudiaron 49 especies de algas del este de Australia por CG/MS y se determinó la distribución de bromofenoles presentes en dichas algas^[17]. Estos investigadores encontraron las sustancias claves responsables del sabor a mar presente en estas algas: el 2- y 4-bromofenol, 2,4- y 2,6-dibromofenoles así como al 2,4,6-tribromofenol, los cuales se muestran a continuación:



2-bromofenol (2-BF)



4-bromofenol (4-BF)



2,4-dibromofenol (2,4-DBF)

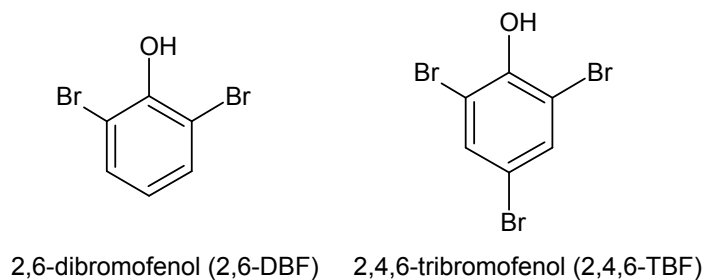


Figura 7. Bromofenoles encontrados en *U. lactuca*

El muestreo se realizó con réplicas y en algunos casos variando la época del año y la fuente de recolección a fin de garantizar los resultados. Los bromofenoles fueron encontrados con un límite de detección alrededor de 0,01 ng/g en las 87 muestras analizadas. Los 5 bromofenoles en estudio fueron encontrados en 54 de las 87 muestras estudiadas, 4 bromofenoles en 30 de ellas y 3 bromofenoles en las otras 3 muestras restantes. El TBF fue encontrado, en su mayoría, en muy altas concentraciones. El contenido en peso total de bromofenoles varió de un alga a otra, obteniéndose desde 0,9 ng/g hasta 2590 ng/g.

Tabla 6. Distribución de bromofenoles en la *U. lactuca* medido en ng/g

Fuente (año)		Contenido de bromofenol en ng/g					Total
		2-BF	4-BF	2,4-DBF	2,6-DBF	2,4,6-TBF	
Bateau	Bay (1991)	1,5	6,6	130	1,1	400	539
Bateau	Bay (1993)	0,1	2,2	25	1,2	1200	1229
Botany	Bay (1993)	0,1	ND	6,2	1,2	400	428
Turimetta	Head (1994)	0,2	0,4	47	1,3	390	441

El contenido total de bromofenoles en la *U. lactuca* osciló entre 441 ng/g y 1229 ng/g de acuerdo a la muestra y al sitio de recolección. Los resultados detallados de cada bromofenol presente en la *U. lactuca* se resumen en la tabla 6. Unos autores sugieren que la supervivencia de las algas está relacionada a la presencia de halometabolitos, los cuales son utilizados por ellas como defensa en contra de bacterias e infecciones por hongos ^[18].

En ese mismo año, se realizó un estudio donde identificaron precursores potenciales de compuestos fenólicos, especialmente del 2,4,6-tribromofenol presentes en el alga marina *Ulva lactuca* ^[19]. Hasta ese momento su precursor biogénico no era conocido. Los compuestos bromados son formados por la acción de bromoperoxidasas presentes en el alga. Las enzimas son capaces de bromar sustancias orgánicas en presencia de bromuro y peróxido de hidrógeno ^[20]. El objetivo de este estudio fue investigar los compuestos que podrían ser los precursores de bromofenoles, y la posible ruta biosintética de los componentes en la *U. lactuca*. El compuesto precursor se presumía que podía ser un compuesto fenólico y posiblemente un ácido fenólico.

La identificación de fenoles libres en *U. lactuca* fue lograda con la extracción homogénea del alga con acetato de etilo. Los compuestos fenólicos encontrados en mayor cantidad fueron: 4-HPAA y fenol. Además se encontraron la L-tirosina y la L-fenilalanina en forma libre.

Después de la hidrólisis ácida del alga los compuestos encontrados en mayor proporción fueron: 4-HPAA, 4-HBA y 4-HPAc.

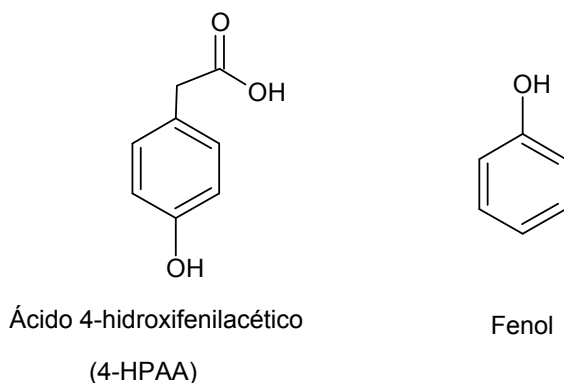


Figura 8. Compuestos reportados en el extracto de acetato de etilo para la *U. lactuca*

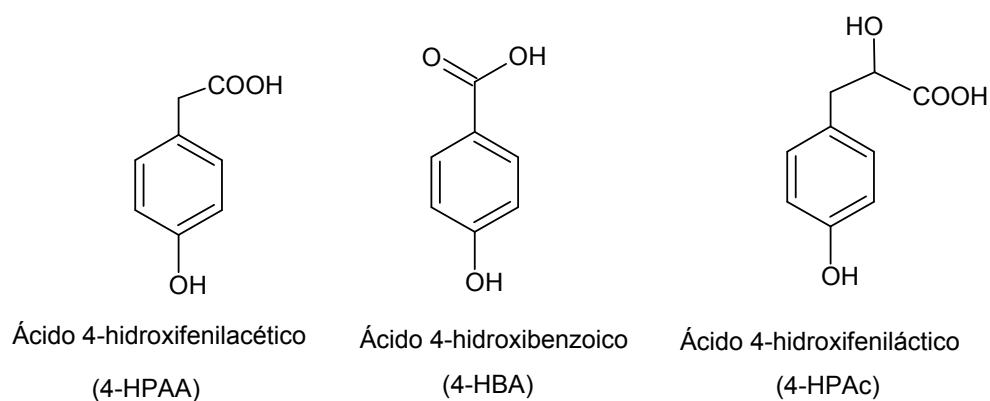


Figura 9. Compuestos reportados después de la hidrólisis ácida

Un extracto crudo enzimático de *U. lactuca*, que contenía bromoperoxidasa (BPO), fue usado para bromar un rango de fenoles, la producción de bromofenoles fue monitoreada. Cada ensayo contenía un sustrato, extracto de enzima crudo, bromuro y peróxido de hidrógeno en una solución buffer. Los resultados mostraron que la enzima juega un rol importante en la formación de los bromofenoles y revelaron que los compuestos capaces de producir 2,4,6-TBF eran: 4-HBA, 4-HBAIc, fenol, 2-HBAIc y 4-HPAA. Sin embargo, de estos sustratos, el más predecible precursor fue el 4-HBA.

Una posible ruta biosintética para la formación de 4-HBA en fitoplancton marino fue propuesta en 1978 ^[21]. Esta involucra el metabolismo de la L-tirosina, vía ácido 4-hidroxifenilpirúvico, ácido 4-hidroxifenilacético y el 4-hidroxibenzaldehído. Los resultados de esos estudios evidencian que ésta también es la ruta que toma lugar en la *U. lactuca*. Figura 10.

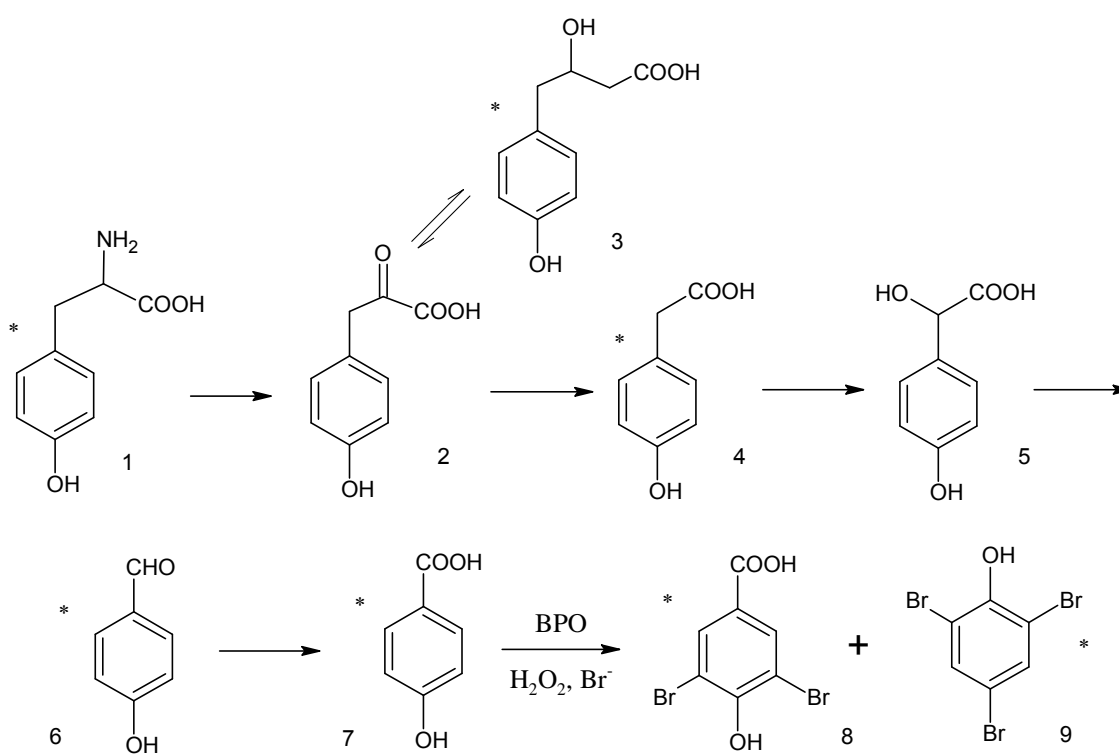


Figura 10. Ruta biosintética propuesta para la formación de 2,4,6-TBF en la *U. lactuca*. El paso de la tirosina al ácido-4-hidroxibenzoico fue basada en el estudio por Landymore (1978). Los compuestos marcados con (*) fueron detectados en la *U. lactuca*. Compuestos: (1) L-tirosina, (2) ácido-4-hidroxipirúvico, (3) ácido-4-hidroxifenilacético, (4) ácido-4-hidroxifenilacético, (5) ácido-4-hidroximandélico, (6) 4-hidroxibenzaldehído, (7) ácido-4-hidroxibenzoico, (8) ácido-3,5-dibromo-4-hidroxibenzoico, (9) 2,4,6-TBF.

En estudios posteriores y después de haber sido descubierto el polisacárido ulvan, se prestó atención en el comportamiento conformacional del alga en solución acuosa [22]. El ulvan representa el mejor polisacárido encontrado en las paredes de las algas del género ulva. Éste biopolímero contiene regiones regulares de secuencias aldobiurónicas hechas a partir de β -D-glcpA-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhap 3 sulfato y de α -L-idopA(1 \rightarrow 4)- α -L-rhap 3 sulfato (figura 11), los cuales pueden ser considerados como una fuente a muy bajo costo de azúcares con un impacto potencial en aplicaciones tanto en la industria de la farmacéutica como la de los alimentos. Su uso depende de las propiedades conformacionales que adopte el polímero en solución, por lo que este parámetro fue objeto de estudio en este trabajo.

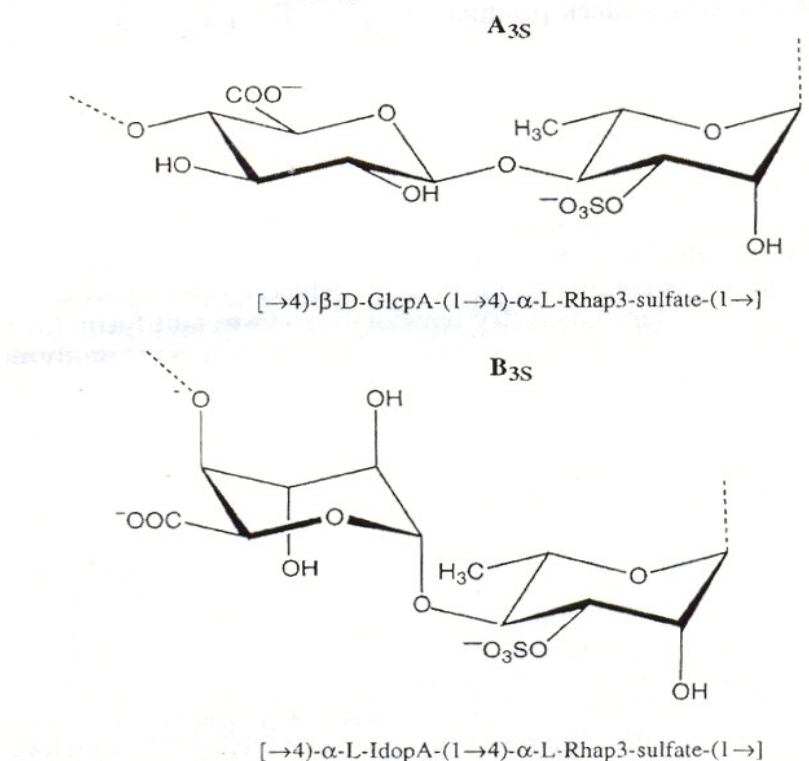


Figura 11. Estructura química de los biopolímeros I y II en el ulvan (conformaciones)

La relación conformacional de los dos anillos principales de estructura en el ulvan depende de la composición química de los residuos del sacárido en el biopolímero. Este estudio mostró que la secuencia polimérica del ulvan puede ir de una transición conformacional ordenada a una desorganizada. Los investigadores señalaron que este entorchamiento es una consecuencia del equilibrio en la conformación del anillo, del ácido L-idurónico involucrado en los arreglos 2S_0 y 1C_4 y por el establecimiento de puentes de hidrógeno intramolecular en la unidad de aldobiurónica. También fue evidente la tendencia a agregarse en soluciones acuosas diluidas en presencia de 0.1 M NaCl.

Este estudio demostró que el dicroísmo circular no es capaz de detectar cambios de estructuras promovidas por enlaces de ligandos y que involucren pequeñas porciones de la cadena total. Por otro lado, determinaron que la microcalorimetría isotérmica puede ser usada adecuadamente como una metodología par el estudio de las energías tanto en los enlazamientos como en los procesos de orden y desorden.

En el año 2005, fueron analizados los extractos etanólicos de 17 especies de algas colectadas en las costas de Egipto ^[23]. Una observación que rápidamente saltó a la vista fue la variación de los resultados dependiendo de la fecha de colección (estación del año) de las algas, es decir, una misma especie mostró resultados diferentes dependiendo si la colección fue realizada en verano, invierno, otoño o primavera.

Tabla 7. Resultado de ensayo de toxicidad (*artemia salina*) para la *U. lactuca* (porcentaje de mortalidad después de 24 horas)

Estación	400 µg/mL	800 µg/mL	1000 µg/mL	LC ₅₀ µg/mL
Invierno	14	37	61	820
Primavera	24	57	77	620
Verano	27	37	57	820

El objetivo principal fue evaluar biológicamente los compuestos presentes en los extractos de las algas estudiadas, en particular este grupo evaluó el poder de inhibición en la iniciación tumoral de los extractos, empleando para ellos los ensayos de *Artemia salina* y la formación de callos sobre papa promovidos por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Entre las algas recolectadas se encontraba la *Ulva lactuca* obteniéndose valores relativamente importantes en los ensayos. Los resultados son mostrados en la tabla 7.

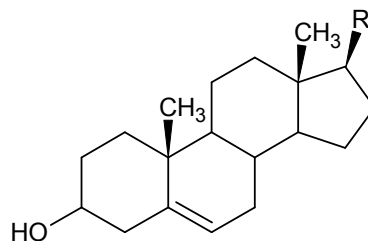
Los resultados para actividad antitumorales registrados para *Ulva lactuca* fueron: 63,8 y 32,15% (% de inhibición de los callos)

En el mismo año, se registró un estudio sobre el contenido cualitativo y cuantitativo de esteroides presentes en las algas del mar adriático *Ulva lactuca* y *Codium dichotomum* (algas verdes) y *Cystoseira adriatica* y *Fucus virsoides* (algas marrones) ^[24]. Experimentalmente las algas secas fueron extraídas en primer lugar con éter de petróleo y luego con benceno. Los extractos bencénicos fueron sujetos a cromatografía por columna con sílica gel, usando una mezcla benceno-éter de petróleo (4:1) como sistema eluyente. La composición de esteroides encontradas para *U. lactuca* se resumen en la tabla 8 y sus estructuras se muestran en la figura 12.

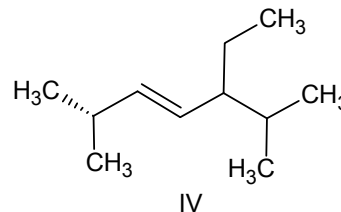
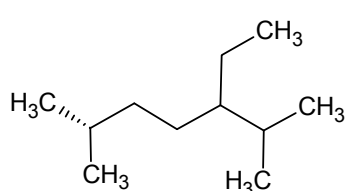
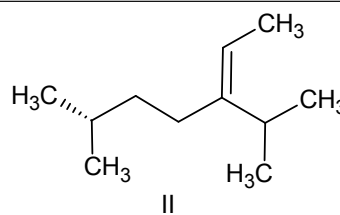
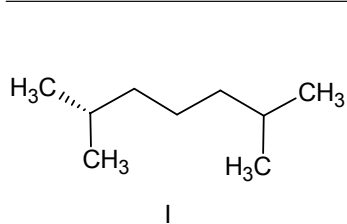
Como puede observarse en la tabla, los principales esteroides encontrados en el alga verde *Ulva lactuca* fueron colesterol e isofucoesterol. Los investigadores de este trabajo también obtuvieron en el alga parda *Cystoseira adriatica* como compuestos principales el colesterol y stigmasta-5-en-3 β -ol, mientras que el esteroide característico de las algas pardas, fucoesterol, se encontró solo en muy bajas concentraciones.

Tabla 8. Composición de esteroles (%) para *U. lactuca*

Compuesto	U. lactuca
Colesterol (I)	34
(Z)-Stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol (II) (fucosterol)	26
(24R)-Stigmasta-5-en-3 β -ol (III)	4
Stigmasta-5,22-dien-3 β -ol (IV)	4
22-dehidrocolesterol (V)	4
Ergosta-5(22)-dien-3 β -ol (VI)	2
Ergosta-5-en-3 β -ol (VII)	1.3
(E)-Stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol (VIII)	Trazas
(24R)-Stigmasta-5,25-dien-3 β -ol (IX)	--
Stigmasta-5,28-dien-38,24-diol (X)	--



R



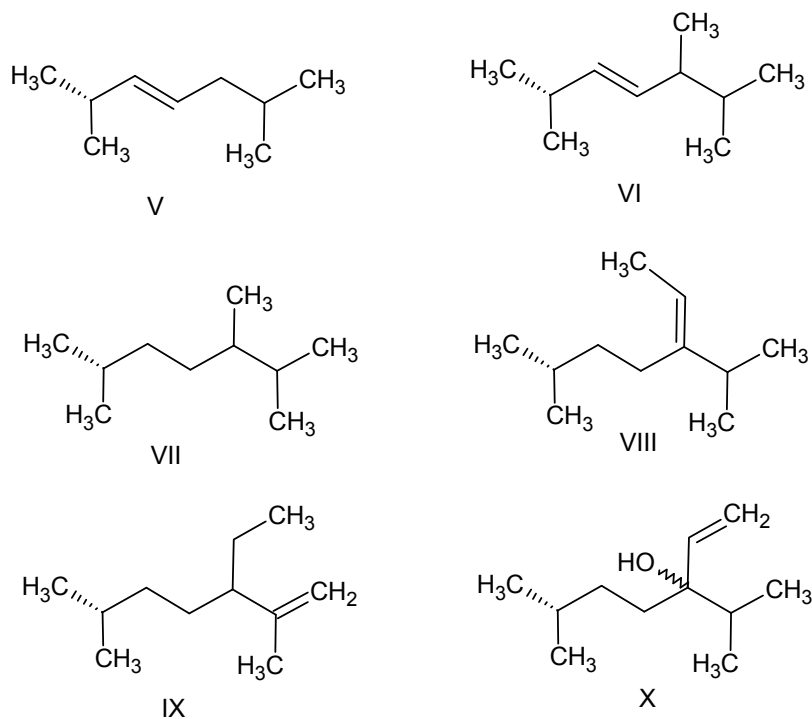


Figura 12. Estructura química de esteroides encontrados en *U. lactuca*

En el año 2006, se estudiaron los extractos etanólicos de algunos macrofitos (*Potamogeton perfoliatus*, *Ranunculus tricophyllus* y *Cladophora glomerata*) y de algunas macroalgas (*Dictyota dichotoma*, *Halopteris scoparia*, *Posidonia oceanica*, *Scinaia furcellata*, *Sargassum natans* y *Ulva lactuca*) de las aguas de Turquía ^[25]. A estos extractos se les probó su actividad in vitro antiprotozoaria. Los organismos ensayados fueron *Tripanosoma brucei*, *Tripanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum*. La citotoxicidad de los extractos fue ensayada también en las células L6 (mioblastos primarios del esqueleto de ratones).

Tabla 9. Actividad antiprozoaria in vitro del extracto etanólico de *U. lactuca* (valores de IC₅₀ en µg/mL)

Alga	T. brucei	T. cruzi	L. donovani	P. falciparum	Citotoxicidad
<i>U. lactuca</i>	22,3	>90	5,9	48,8	>90

El alga de interés, *Ulva lactuca*, tuvo una de las mejores actividades antileishmaniasis con un IC_{50} de 5,9 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo mostró actividad inhibitoria hacia el *Plasmodium falciparum* (IC_{50} de 48,8 $\mu\text{g/mL}$). El extracto de la *Ulva lactuca* inhibió eficientemente la enzima FabI con un IC_{50} de 4 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados de las pruebas realizadas a la *Ulva lactuca* son resumidos en la tabla 9. Este trabajo reporta la primera actividad antiprotozoal de las algas marinas de Turquía. Experimentalmente se tomaron 5 gramos de cada alga, los cuales fueron sumergidos en etanol por dos días, luego fue el solvente fue secado al vacío, para finalmente realizar los ensayos biológicos.

Finalmente, en el año 2007, se centró principal atención en el estudio químico y fisicoquímico del polisacárido ulvan, extraído de la *U. lactuca* [26]. El interés de estos investigadores fue la búsqueda de nuevos químicos y polímeros presentes en las algas marinas pertenecientes a los géneros *Ulva* y *Enterophormia* como fuentes de polisacáridos con estructura innovadora y propiedades funcionales atractivas desde el punto de vista industrial.

En este trabajo encontró el ulvan como el mayor de los polisacáridos sulfatados, solubles en agua y representó alrededor del 8 y 29 % del alga seca. Fue extraído de la pared celular del alga y sus principales constituyentes encontrados fueron: sulfato, ramnosa, xilosa y ácido glucurónico. Además fue hallado el ácido idurónico (carbohidrato) como constituyente del ulvan, así como pequeñas cantidades de mannososa y galactosa. En cuanto a la descripción fisicoquímica del Ulvan, los autores de este trabajo lo describieron como una familia de polímeros químicos con un alto contenido de ramificación, de una alta distribución en términos de densidad de carga y peso molecular. El carácter polimolecular del ulvan puede tener diferentes orígenes: presencia de contaminantes, diferente distribución de pesos moleculares. La química y fisicoquímica única del ulvan ha hecho de ésta familia de polisacáridos candidatos atractivos para funciones novedosas y polímeros biológicos atractivos para las industrias de alimentación, farmacia y agricultura.

I.4. JUSTIFICACIÓN

Este Trabajo Especial de Grado representa un aporte hacia el crecimiento del área de Productos Naturales Marinos, a través del estudio de los componentes principales del alga venezolana *Ulva lactuca*.

En base a la revisión bibliográfica y los antecedentes químicos y biológicos sobre la especie *Ulva lactuca*, es importante resaltar que dicha especie sólo ha sido estudiada en países del continente europeo, aún y cuando en Venezuela se encuentra una gran variedad de la misma.

Al ser esta especie parte del phylum Chlorophyta, no cuenta con extremidades, ni medios de defensa físicos que involucren uso de la fuerza, es un organismo sésil. Por ello, y con el fin de sobrevivir al hábitat en el que habitan, muchos investigadores manejan el concepto de “defensa química”, asegurando que se basa en la biosíntesis de componentes que sean dañinos para sus depredadores y en algunas ocasiones le sirvan para proveerse de alimentos.

Por tanto, tomando en cuenta que para el género *Ulva* no se ha estudiado la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa ni tampoco se ha hecho estudios fitoquímicos en nuestro país, se propuso la realización de este Trabajo Especial de Grado de manera de poder aislar alguno de los metabolitos secundarios de la especie *Ulva lactuca* y probar su posible actividad biológica como inhibidora de la enzima glucosa-6-fosfatasa.

CAPITULO II.

II.1. OBJETIVOS

II.1.1. GENERAL:

Separar e identificar los componentes químicos principales del crudo metanólico del alga *Ulva lactuca* y evaluar su posible actividad biológica como inhibidores de la Glucosa 6-fosfatasa.

II.1.2. ESPECÍFICOS:

- Preparar el crudo metanólico del alga *Ulva lactuca*.
- Obtener los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol-agua a través de la partición del crudo metanólico.
- Aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas metabolitos secundarios importantes del extracto metanol-agua.
- Caracterizar estructuralmente por espectroscopia de Resonancia Magnética nuclear de protones y de carbono (RMN-¹H, RMN-¹³C), Infrarrojo y Espectrometría de Masas, los compuestos químicos aislados.
- Evaluar la actividad biológica de los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol/agua, y de algunos de sus metabolitos secundarios como inhibidores de la Glucosa-6-fosfatasa (in vitro).

- Evaluar la toxicidad, a través del ensayo de la *Artemia Salina*, de los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol/agua del alga *Ulva lactuca*, así como de los compuestos químicos aislados.

II.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

II.2.1. Solventes

- Agua (H₂O) destilada.
- Diclorometano (CH₂Cl₂): Riedel-deHaën.
- Metanol (CH₃OH): Riedel-deHaën.
- Hexano (C₆H₁₄): Burdick and Jackson.
- Acetato de etilo: Fluka.

II.2.2. Agentes Reveladores

- p-anisaldehído: se mezclaron 0,5 mL de p-anisaldehido con 10 mL de ácido acético glacial, seguido a esto se añadieron 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, en este mismo orden. Las placas fueron sumergidas y luego colocadas en la estufa a 100°C.
- Sulfato Cérico: a una suspensión de sulfato cérico (1g en 40 mL de agua) se añadió una pequeña cantidad de ácido sulfúrico concentrado. La solución final se preparó al 10% en metanol. La placa se roció y se calentó en la estufa a 100°C.

II.2.3. Materiales y Equipos:

- Placas analíticas de sílica gel 60; 0,25mm con indicador de fluorescencia UV₂₅₄; marca POLYGRAM® para CCF.

- Sílica gel marca Riedel-De Hain Seelze-Hannover de (0,2-0,5)mm para CC.
- Rotavapor T.W.T. Heidolph Laborata 4000 modelo: 049880063 (UCV).
- Ultrasonido Sonicor. Modelo SC-300TH (UCV).
- Lámpara UV a dos longitudes de onda, λ : 254 y 366nm . MINERALIGHT, modelo UVGL-25. (UCV).
- Columnas de cromatografía (UCV).
- Equipo de RMN, marca JEOL, modelo Eclipse de 270; campo de aplicación 270 MHz para protones y 67,5 MHz para carbono 13 (UCV, Facultad de Ciencias).
- Espectrómetro de masas modelo Varian Saturn 2000 acoplado a un cromatógrafo de gases (IVIC).

II.2.4. Colección del alga verde

El material del alga de la especie *Ulva lactuca*, fue recolectado en las costas de la isla de Margarita. Fue reconocido y colectado por el biólogo marino Dr. Rosa J. Universidad de Oriente. Núcleo Punta de Piedra. El mismo ingresó al Laboratorio de Química del Mar en mayo 2006.

II.2.5. Extracción y separación

A continuación se describe todo el tratamiento químico realizado al alga *Ulva lactuca* para la obtención tanto del crudo metanólico como de los subsiguientes extractos.

Se pesó ($91,96 \pm 0,01$) g del material de alga seco y se sumergió en metanol por 48 horas (proceso de maceración), de esta manera se extrajo del alga los metabolitos secundarios importantes para este trabajo.

Pasadas las 48 horas el material fue filtrado. La solución metanólica se evaporó a sequedad para así obtener el crudo metanólico (CM) del alga *Ulva lactuca*. El proceso de maceración fue repetido dos veces más con el material filtrado, para de esta manera asegurar la mayor extracción de todos los metabolitos importantes.

Al terminar el proceso de maceración y la posterior evaporación de la solución metanólica se obtuvo ($10,02 \pm 0,01$) g del crudo metanólico, utilizado como material de partida para la separación (figura 13).

Tabla 10. Masa del material de alga seca y del crudo metanólico

Muestra	(Masa $\pm 0,01$) g	% del extracto
Material de alga seco	91,96	100,0
Crudo metanólico	10,02	10,9

El CM fue disuelto en una mezcla metanol:agua (1:1) para luego comenzar con el esquema de separación propuesto. Se extrajo primero con porciones de 30 mL de hexano, obteniendo así una fase acuosa y una fase orgánica correspondiente al extracto de hexano. La fase acuosa remanente fue extraída con porciones de 30 mL de diclorometano, teniendo como resultado una capa acuosa y una orgánica correspondiente al extracto de diclorometano. La nueva fase acuosa remanente fue tratada con porciones de 30 mL de acetato de etilo, teniendo finalmente una nueva capa orgánica denominada extracto de acetato de etilo y una acuosa (residuo) correspondiente al extracto metanol-agua.

Este esquema de separación se basó en una partición por polaridad, de ésta manera los compuestos menos polares fueron extraídos con hexano (EH), los de polaridad intermedia fueron encontrados en el extracto de diclorometano (ED) y acetato de etilo (EA) y los más polares son encontrados en el extracto metanol-agua (EM), el cual es el residuo de la extracción.

Al terminar la extracción, los extractos fueron secados con sulfato de magnesio (en el caso de EH, ED y EA) y evaporados a sequedad mediante el uso de un rotavapor. A continuación se muestra el peso obtenido de cada uno de ellos.

Tabla 11. Masa de los extractos obtenidos después de realizar la separación

Extracto	(Masa del extracto \pm 0,0001) g	% del extracto con respepto a CM
Extracto de hexano (EH)	0,2333	2,3
Extracto de CH ₂ Cl ₂ (ED)	0,2985	3,0
Extracto de acetato de etilo (EA)	0,3965	4,0
Extracto metanol-agua (EM)	5,0937	50,8

Realizando el balance de masa con respecto al crudo metanólico inicial, los 4g que faltan, corresponden a la sal separada durante la extracción.

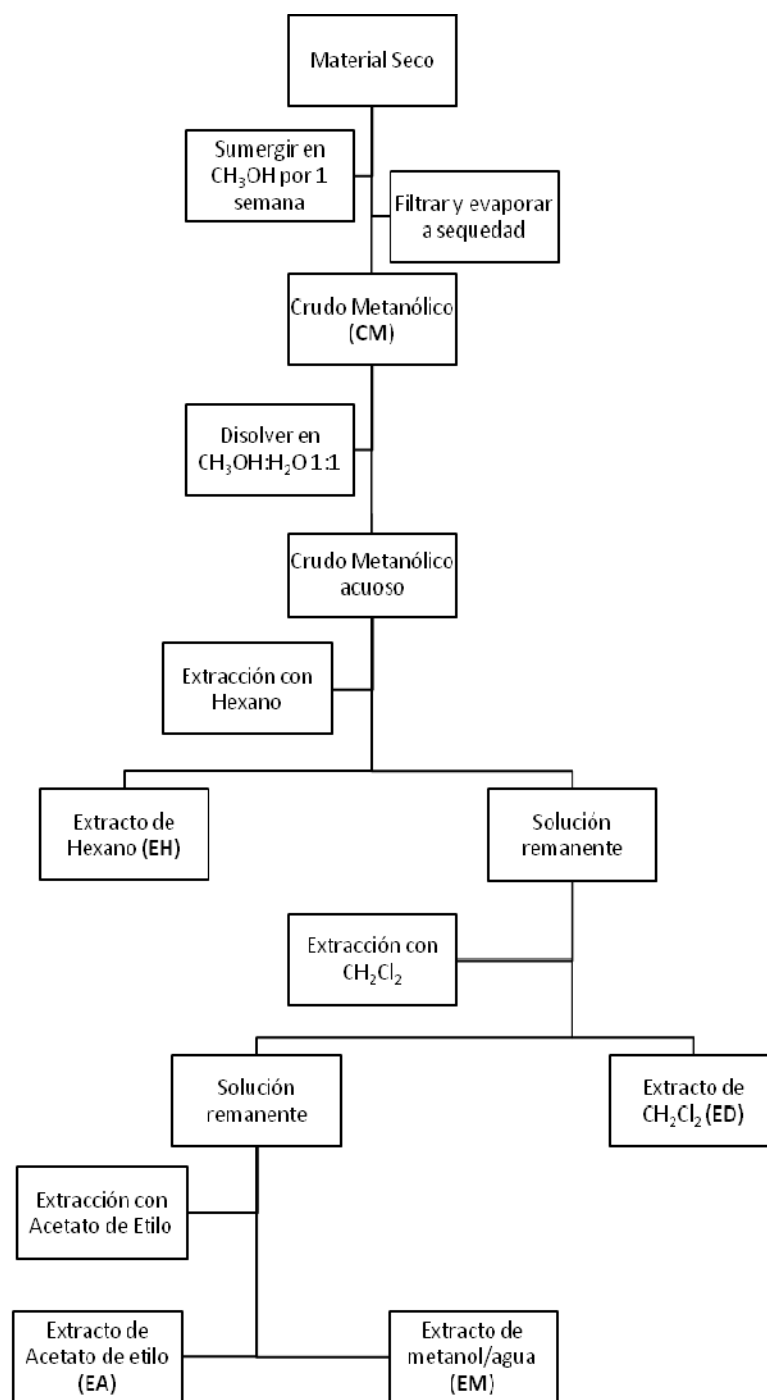


Figura 13. Esquema de separación propuesto para la separación de los compuestos en la *Ulva lactuca*.

II.2.6. Metodología empleada para los ensayos biológicos.

Los ensayos realizados fueron: inhibición de la glucosa-6-fosfatasa y toxicidad (*Artemia Salina*). El primero de éstos fue realizado por Sandra Duque en el Laboratorio de Bioensayos de la Escuela de Química, UCV.

II.2.6.1. Metodología empleada para el ensayo de mortalidad de *Artemia Salina*.

En grandes dosis los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos. Por ello, la mortalidad in vivo, de un organismo simple de la escala zoológica (por ejemplo: *Artemia Salina*), puede ser usada como un indicador de toxicidad en el estudio de productos naturales.

Se colocó una pequeña cantidad de huevos de artemia salina en agua de mar, éstos se colocaron 48 horas bajo luz blanca fluorescente, tapando el recipiente con parafilm y manteniendo aire en el agua con el uso de un motor de pecera.

Se toma una alícuota del extracto a ensayar y se trasvasa a un vial prepesado. Se evaporó el solvente y por diferencia de masas se determinó la masa de extracto en el vial (mg. A)

Luego se disolvió el extracto en un volumen conocido de solvente (V_1 , C_1).

Se tomaron alícuotas de la solución anterior (V_2) y se trasvasaron por triplicado a los viales en los que se realizó el ensayo.

Se evaporó el solvente en su totalidad y se disolvió el contenido de cada vial en un volumen fijo y conocido de agua de mar (C_3 , V_3).

Adicionalmente se prepararon 3 viales cuyo único contenido es el volumen anterior de agua de mar (V_3), correspondiente al blanco negativo. Y otros tres viales con metanol (blanco positivo)

Se adicionaron 10 nauplios (larvas de camarón) a cada vial y después de 24 horas se determinó el porcentaje de larvas vivas.

En el caso de extractos que no han sido sometidos a separaciones cromatográficas C_3 es igual a 1000 ppm, en caso contrario, C_3 es igual a 200 ppm.

$$V_1 \text{ (mL)} = \frac{\text{mg A} \cdot V_2 \text{ (mL)} \cdot 1000 \text{ (mL/L)}}{C_3 \text{ (mg/L)} \cdot V_3 \text{ (mL)}}$$

donde:

V_1 : volumen conocido de solvente

A: masa de extracto

V_2 : alícuota de V_1

C_3 : concentración del agua de mar

V_3 : volumen del agua de mar

Por lo general, V_3 es igual a 4 mL, en ese caso:

C_3 igual a 1000 ppm:

$$V_1 \text{ (mL)} = \frac{\text{A mg} \cdot V_2 \text{ (mL)}}{4 \text{ mg}}; \quad V_1 \geq 3V_2$$

C_3 igual a 200 ppm:

$$V_1 \text{ (mL)} = \frac{\text{A mg} \cdot V_2 \text{ (mL)}}{0,8 \text{ mg}}; \quad V_1 \geq 3V_2$$

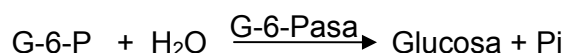
Teniendo presente que los análisis se realizan por triplicado:

$$V_1 > 3V_2$$

Todos estos datos se procesaron determinando los resultados de mortalidad en cada caso, es decir, el porcentaje de mortalidad promedio para concentración en cada ensayo.

II.2.6.2. Metodología empleada para el ensayo de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa

La enzima Glucosa-6-fosfatasa cataliza el paso final de los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis, produciendo glucosa y fosfato inorgánico; la reacción se puede medir mediante la desaparición del sustrato (Glucosa-6-fosfato) o la aparición de los productos (Glucosa o Pi).



La actividad de la G-6-Pasa se determinará siguiendo la formación de fosfato (Pi), que en medio ácido y en presencia de heptamolibdato de amonio forma un complejo azul, cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 820 nm. La ventaja del uso este método es que, además de ser económico y rápido, el reactivo que se usa para formar el complejo también detiene la reacción.

Para diferenciar si el inhibidor actúa sobre el transportador T1 o directamente sobre la subunidad catalítica, se utilizan microsomas intactos y microsomas rotos; los primeros son vesículas en las cuales la membrana limitante actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, mientras que los segundos carecen de dicha selectividad y el sustrato tiene libre acceso a la subunidad catalítica. Los microsomas rotos se obtienen mediante la incorporación de histonas durante el ensayo; estas son proteínas básicas que rompen la integridad de las estructuras microsomales.

II.2.6.2.1. Preparación de microsomas

Para la preparación de los microsomas, fuente de la enzima, se seguirá el procedimiento descrito en la figura 14 [27].

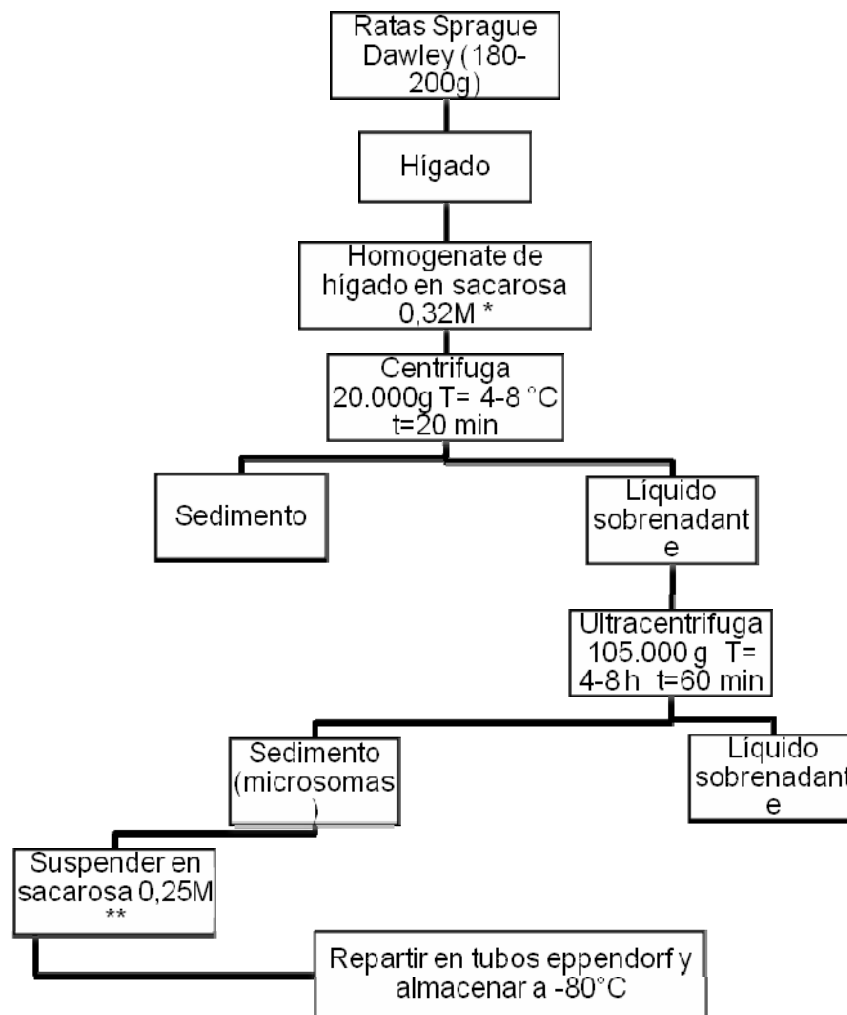


Figura 14. Procedimiento para la obtención de Microsomas

*Sacarosa 0,32 M; $MgCl_2$ 3 mM. **Sacarosa 0,25 M; HEPES 5 mM; $MgCl_2$ 1 mM pH 6,5

II.2.6.2.2. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa

Se utiliza como sustrato G-6-P 5 mM, tanto con histonas (+H) como sin histonas (-H); a continuación se presenta en la siguiente tabla la cantidad de los reactivos necesarios para prepararlos.

Tabla12. Preparación de los sustratos.

Sustrato	G-6-P	EDTA	HEPES	H ₂ O (μL)	Histonas*	
	100mM (μL) pH 6.5	0,1M (μL) pH 6.5	1M (μL) pH 6.5		(tipo II AS) (μL)	V _t (mL)
-H	250	100	80	1570	-	2
+H	250	100	80	1370	200	2

Para determinar la actividad de los extractos y compuestos purificados sobre la enzima G-6-fosfatasa se emplea la metodología que se esquematiza a continuación ^[12]:

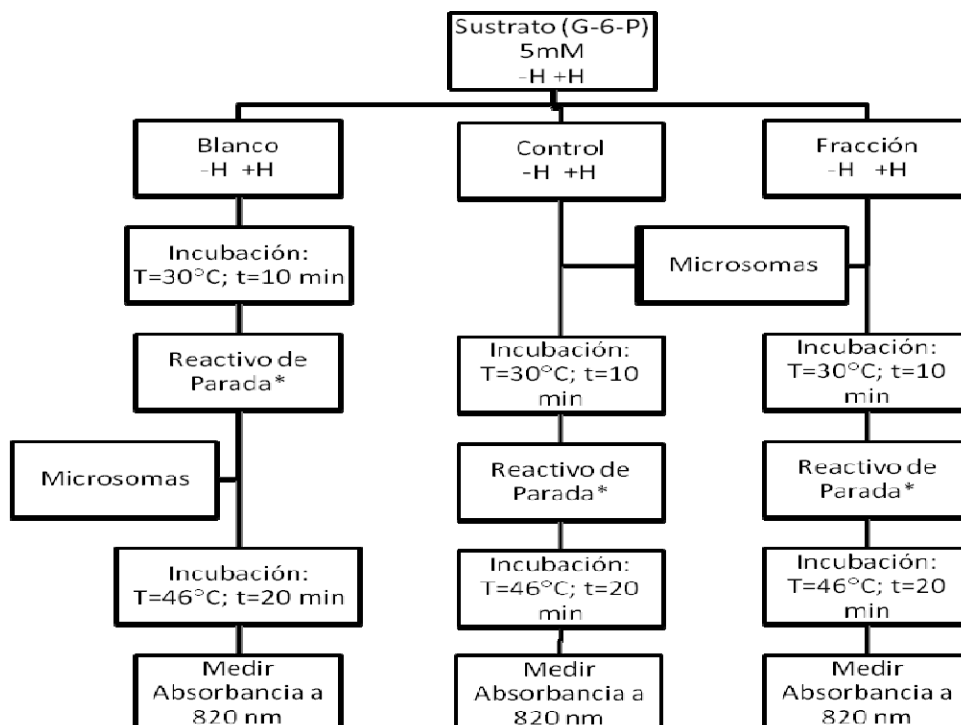


Figura 15. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa

Donde:

-H: sustrato sin histonas

+H: sustrato con histonas

*Reactivo de parada: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,42% en H_2SO_4 0,5M: SDS 5%: Acido Ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1.

A continuación se describe brevemente la metodología a seguir para el ensayo:

- Se utilizan cuatro tubos de ensayo para cada compuesto a probar (blanco y triplicados), tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H).
- Para los ensayos Control se colocan en cada tubo 40 μL de sustrato más 40 μL de agua (o del solvente en que fue disuelto el compuesto a probar). Para los ensayos con la fracción o el compuesto a analizar, se le añade 40 μL de la solución problema o del compuesto problema a la concentración que se desea en lugar de agua.
- Se diluye los microsomas hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL, en sacarosa 0,25 M; 5 mM HEPES y 1 mM de MgCl_2 (pH = 6.5).
- Se colocan los tubos en un baño de temperatura controlada a 30°C.
- Se coloca 20 μL de los microsomas a los triplicados e incubar por 10 min.
- Se detiene la reacción tubo por tubo y en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, añadiendo 0,9 mL del reactivo de parada, incluyendo a los blancos. Por último, se añade 20 μL de los microsomas a los blancos.
- Se incuban por 20 min, en un baño de temperatura controlada a 46°C.
- Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 820 nm.
- La actividad enzimática se expresa en μmoles de Pi/ mg de proteína.

Para determinar la cantidad de fosfato liberado en la reacción se realiza una curva de calibración con un rango de concentración de 0,1 a 0,75 mM de Pi tomando

alícuotas correspondientes de una solución madre de KH_2PO_4 1mM en un volumen final de 100 μL .

II.2.6.2.3. Determinación de proteínas

La cantidad de proteínas se determina combinando la reacción de Biruet ^[28], basada en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre en medio alcalino y la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu ^[29] por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, esta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína ^[30].

Para determinar la concentración de proteínas presentes en cada ensayo se elabora una curva de calibración con un rango de concentración entre 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un volumen final de 500 μL . Este procedimiento se esquematiza a continuación:

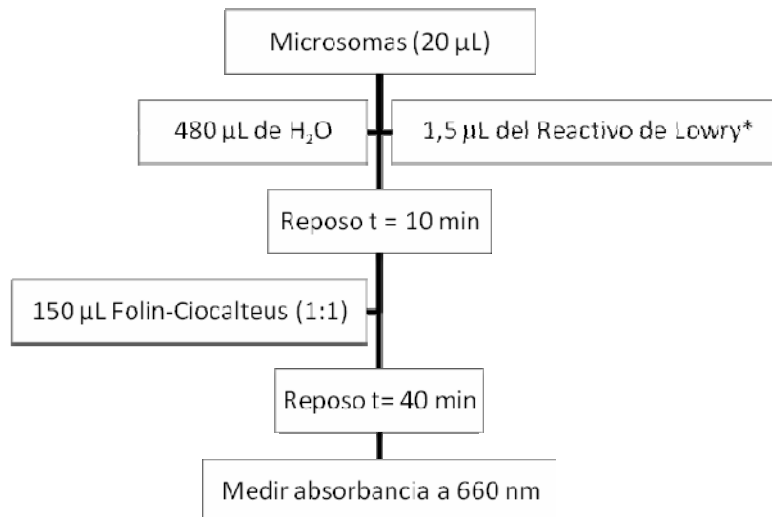


Figura 16. Procedimiento para la determinación de proteínas.

*Reactivo de Lowry: A+B (100:1)

A = Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0,16%, SDS 1% y B = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

CAPITULO III.

III.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

III.1.1. Resultados obtenidos en los ensayos biológicos

A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron en la aplicación de los ensayos biológicos tanto del CM como de los EH, ED, EA y EM después de la partición.

III.1.1.1. Resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de *Artemia Salina*

Tabla 13. Resultados del ensayo de mortalidad de *Artemia Salina* aplicado al CM como a cada uno de los extractos EH, ED, EA, y EM.

Muestra	Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia Salina</i>
Crudo Metanólico (CM)	50,0
Extracto de hexano (EH)	43,3
Extracto de diclorometano (ED)	13,3
Extracto de acetato de etilo (EA)	23,3
Extracto metanol-agua (EM)	6,7
Blanco negativo (agua de mar)	3,3
Blanco positivo (metanol)	86,7

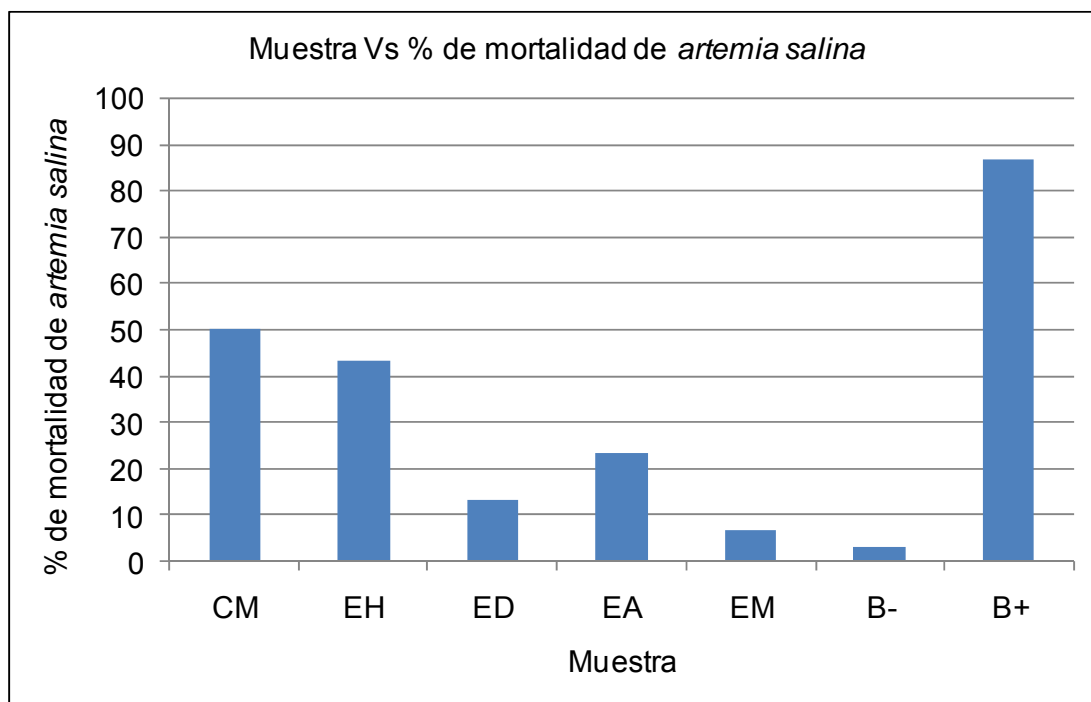


Figura 17. Gráfico de porcentaje de mortalidad de *Artemia Salina* en función del extracto (concentración de 1000 ppm).

III.1.1.2. Resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa

Tabla 14. Resultados de ensayo de inhibición de la enzima G-6-pasa, aplicado al CM y a los extractos EH, ED, EA y EM

Extracto	Porcentaje de inhibición sobre la enzima G-6-pasa (%)	
	-H	+H
Crudo Metanólico (CM)	77	64
Extracto de hexano (EH)	42	60
Extracto de diclorometano (ED)	47	43
Extracto de acetato de etilo (EA)	66	17
Extracto metanol-agua (EM)	48	49

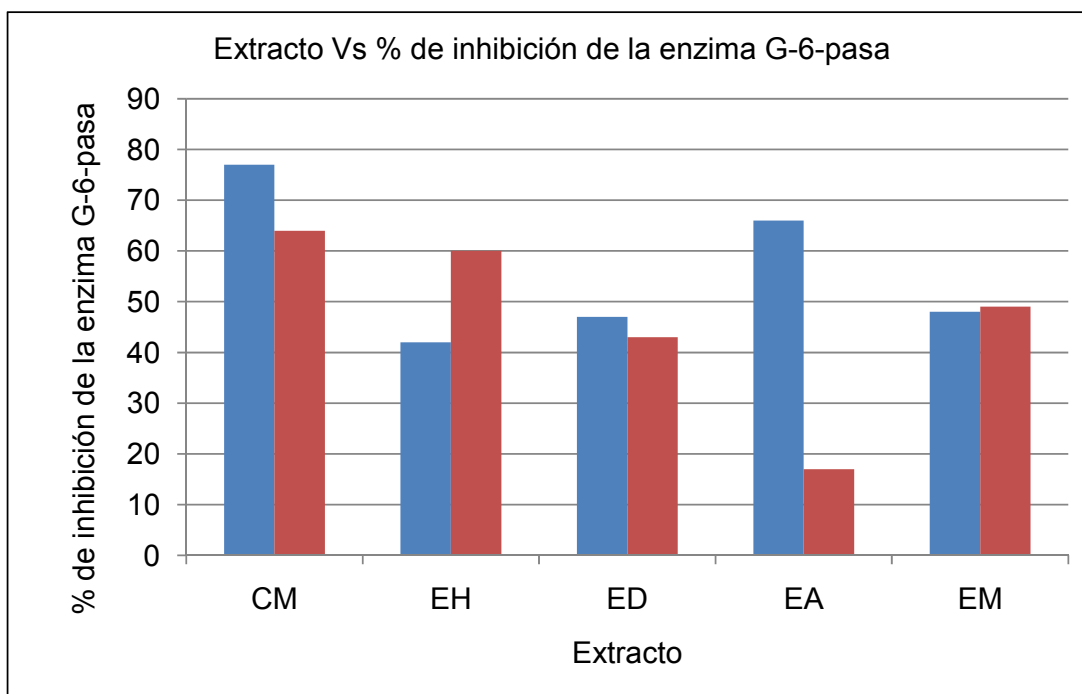


Figura 18. Gráfico de porcentaje de inhibición de la enzima G-6-pasa en los extractos.

III.1.2. Selección del extracto a separar y purificar

Una vez realizado la separación de los extractos y la posterior evaluación de los mismos hacia los ensayos biológicos, se procedió a realizar estudios por cromatografía de capa fina de los mismos. Se emplearon distintas mezclas de solventes, en particular hexano: diclorometano y diclorometano: metanol para realizar dicho estudio, con ellas se encontraron las mejores condiciones de separación. Al realizar la cromatografía de capa fina se encontró que en los extractos de hexano y metanol-agua se lograba una mejor separación de los compuestos. La cromatografía de capa fina fue revelada con p-anisaldehído, sulfato cérico y luz UV (254nm).

En este momento fue importante decidir entre EH y EM para comenzar con la separación cromatográfica. Es importante recordar que el alga estudiada *Ulva lactuca* es un alga verde, es por ello que al estudiar el EH por CCF se encontró una gran concentración de clorofila, la cual al ser revelada bajo una luz UV de longitud de onda de 366 nm produce una coloración rojiza en las manchas. Los distintos tipos de clorofilas corresponden a compuestos con baja polaridad, es por ello que se decidió hacer una partición del extracto hexano siguiendo el esquema de la figura 19. Se disolvió el EH en una mezcla metanol:agua 1:1, se extrajo primero con porciones de 15 mL de diclorometano, obteniendo así una fase acuosa y una fase orgánica correspondiente al extracto de hexano-diclorometano (EHD). La fase acuosa remanente fue extraída con porciones de 15 mL de acetato de etilo, teniendo finalmente una nueva capa orgánica denominada extracto de hexano-acetato de etilo (EHA) y una acuosa (residuo) correspondiente al extracto hexano-metanol-agua (EHM)

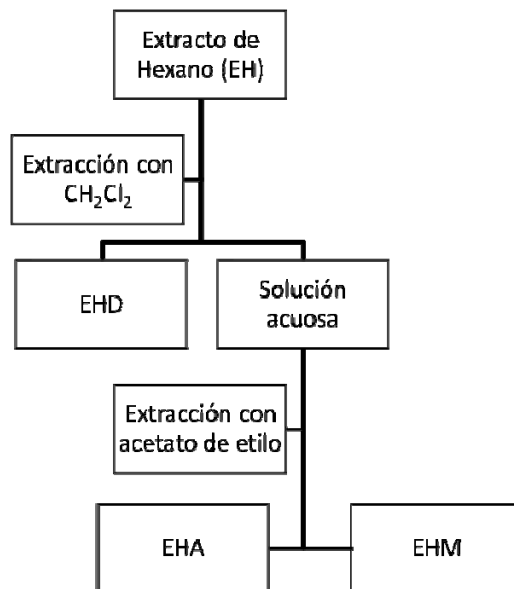


Figura 19. Partición del extracto de hexano (EH)

Tabla 15. Masa de los extractos provenientes de la partición del extracto de hexano (EH)

Extracto	(Masa del extracto \pm 0,0001) g	Porcentaje del extracto (%)
Extracto de hexano (EH)	0,2333	100
Extracto de CH ₂ Cl ₂ -hexano (EHD)	0,1948	83,5
Extracto de acetato de etilo-hexano (EHA)	0,0063	2,7
Extracto metanol-agua-hexano (EHM)	0,0364	15,6

Como era de esperarse la partición con diclorometano del EH resultó ser clorofila en su totalidad (revelado bajo la luz UV 366 nm), en cambio en los otros dos extractos EHA y EHM no se encontró clorofila. A pesar de esto, las masas de los extractos EHA y EHM resultaron muy pequeñas y no se pudo plantear un aislamiento de los compuestos ya que los mismos eran mezclas muy complejas según lo observado por cromatografía de capa fina.

Al observar todos los resultados anteriores: masa de los EH, ED, EA y EM; resultados de ensayos biológicos y además, considerando que el 83,5% de EH correspondía a clorofila, se escogió el extracto metanol-agua (EM) del alga *Ulva lactuca* como el material a ser analizado y purificado en este Trabajo Especial de Grado. A continuación se muestran los resultados de la separación cromatográfica del extracto metanol-agua.

III.1.3. Separación y purificación de algunos de los componentes presentes en el extracto metanol-agua (EM) del alga *Ulva lactuca*.

Se tomaron 2,5826 g del extracto metanol-agua y se sometieron a cromatografía de columna en fase normal. La cantidad de sílica usada para empacar la columna fue 155 g (siguiendo la relación 1:60). La columna se sembró en seco y se eluyó con una mezcla diclorometano:metanol, empezando desde 100% diclorometano hasta 100% metanol. Al finalizar la elución con metanol se observaba

todavía un color amarillento en la parte de sembrado de la columna, lo que evidenciaba presencia de compuestos muy polares, para solucionar esto se terminó de eluir con metanol al 1% en ácido acético. El esquema siguiente describe el proceso de separación cromatográfico.

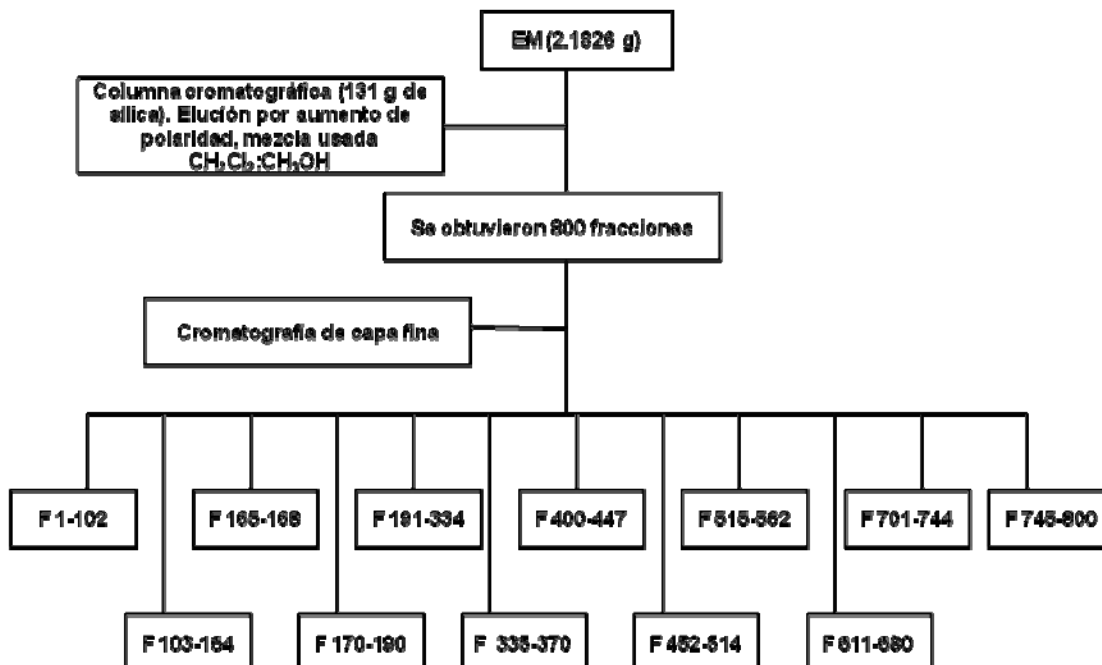


Figura 20. Separación a través de columna cromatográfica de EM

En tubos de ensayos de aproximadamente 5 mL de capacidad se recolectaron las fracciones según iban eluyendo a través de la columna. Cada fracción fue sometida a cromatografía de capa fina, lo cual permitió unir las según características similares. El total de fracciones eluidas fue 800, organizadas luego en 12 fracciones según lo encontrado por CCF. El balance de masa correspondiente a la separación cromatográfica es mostrado a continuación (tabla 16)

Tabla 16. Masa de las fracciones de la separación por cromatografía de columna de EM

Nombre fracción	Fracción	(Masa \pm 0,1) mg
F1	F1-102	10,1
F2	F102-164	5,2
F3	F165-168	14,9
F4	F170-190	24,8
F5	F191-334	1342,4
F6	F335-370	180,9
F7	F400-447	143,6
F8	F452-514	80,3
F9	F515-562	40,2
F10	F611-680	80,9
F11	F701-744	71,2
F12	F745-800	256,2

Las fracciones F5, F6 y F7 fueron seleccionadas para seguir haciendo estudios posteriores ya que fueron las fracciones donde se obtuvo los valores más significativos en masa. F12 no fue analizada porque no se tenía sílica en fase reversa para hacer el estudio cromatográfico (F12 está constituida por compuestos muy polares).

III.1.3.1. Estudio de la fracción F5 (F191-334)

Mediante cromatografía de capa fina se observó en esta fracción una mezcla de varios componentes. Dicha fracción fue sometida a cromatografía por columna para la separación y purificación de los compuestos presentes.

Se sembraron 486,6 mg de la fracción F5 en una columna cromatográfica con 29,2 g de sílica. Mientras la columna iba siendo eluída, la misma iba siendo monitoriada por CCF y revelada con p-anisaldehído y sulfato cérico. La columna fue

eluída desde 100% diclorometano hasta una mezcla diclorometano:metanol 5:5. Al utilizar la mezcla 9:1 fue eluida la primera fracción importante, denominada EM1, la misma era visible al usar la lámpara UV.visible a 254nm y presentaba coloración morada al ser revelado con los agentes reveladores anteriormente mencionados. La columna fue eluída hasta la mezcla diclorometano: metanol 5:5, donde se encontraron mezclas de compuestos, de los cuales no se pudo lograr purificación de ninguno de ellos. La figura 21 describe la purificación de la fracción EM1.

Tabla 17. Masa de las subfracciones para la purificación de la fracción F5 por cromatografía de columna

Nombre fracción	Fracción	(Masa \pm 0,1) mg
F5.1	f 1-15	82,1
F5.2 (EM1)	f16-45	11,2
F5.3	f46-73	55,3
F5.4	f74-85	196,8
F5.5	f86-102	120,4

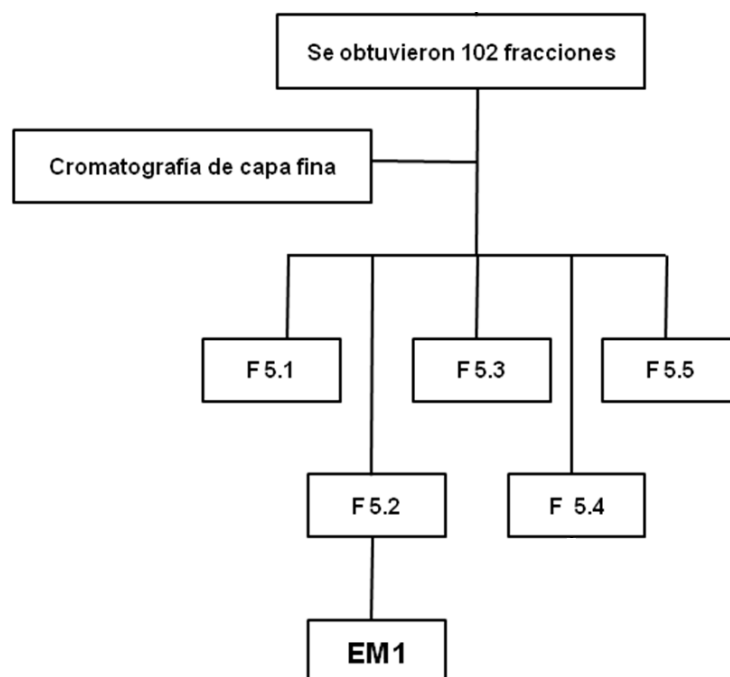


Figura 21. Procedimiento para la purificación de la fracción F5

III.1.3.2. Estudio de la fracción F6 (F335-370)

Mediante cromatografía de capa fina se observó en esta fracción una mezcla de varios componentes. Dicha fracción fue sometida a cromatografía por columna para la separación y purificación de los compuestos presentes.

La fracción F6 (180,9 mg) fue sembrada en una columna cromatográfica con 10,9 g de sílica. Mientras la columna iba siendo eluída, la misma iba siendo monitoreada por CCF y revelada con p-anisaldehído y sulfato cérico. La columna fue eluída con una mezcla diclorometano:metanol 6:4, para así aislar el compuesto mayoritario. Se recolectaron 70 fracciones en las cuales en F33-45 se encontró la segunda fracción importante, denominada EM3. El compuesto fue visible al usar la lámpara UV.visible a 254nm y presentaba coloración amarillenta al ser revelado con los agentes reveladores anteriormente mencionados. La columna fue eluída hasta la mezcla diclorometano: metanol 5:5. La figura 22 describe la purificación de la fracción EM3.

Tabla 18. Masa de las subfracciones para la purificación de la fracción F6 por cromatografía de columna

Nombre fracción	Fracción	(Masa \pm 0,1) mg
F6.1	f1-10	15,9
F6.2	f11-32	41,4
F6.3 (EM3)	f33-45	53,5
F6.4	f46-70	62,3

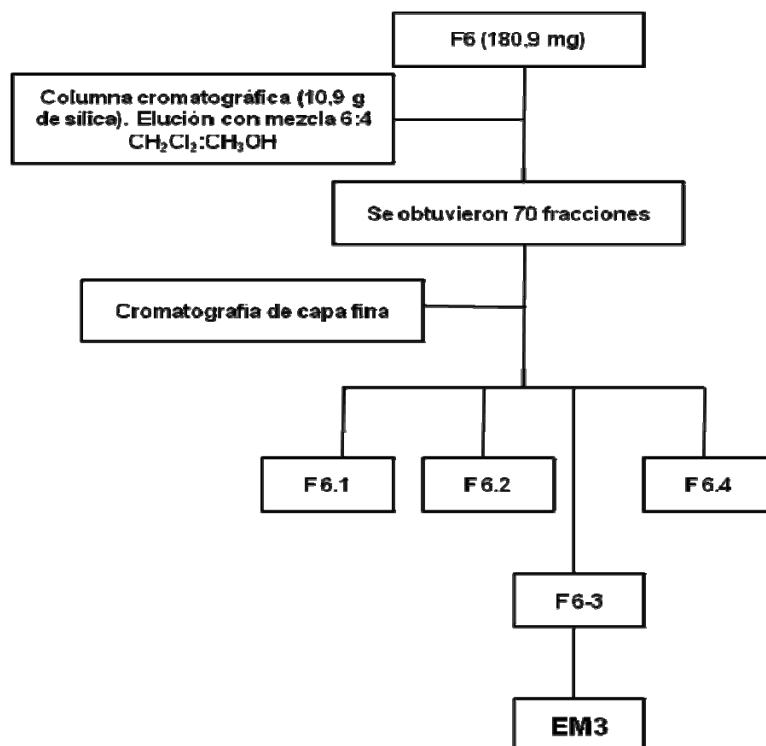


Figura 22. Procedimiento para la purificación de la fracción F6

III.1.3.3. Estudio de la fracción F7 (F400-447)

Mediante cromatografía de capa fina se observó en esta fracción una mezcla de varios componentes, incluyendo los aislados anteriormente. Dicha fracción fue sometida a cromatografía por columna para la separación y purificación de los compuestos presentes.

La fracción F7 (143,6 mg) fue sembrada en una columna cromatográfica con 8,6 g de sílica. Mientras la columna iba siendo eluída, la misma iba siendo monitoriada por CCF y revelada con p-anisaldehído y sulfato cérico. La columna fue eluída con una mezcla diclorometano:metanol 5:5, para así asilar el compuesto de interés encontrado por CCF. Se recolectaron 79 fracciones en las cuales en F53-65 se encontró una nueva fracción importante, denominada EM4. El compuesto es visible al usar la lámpara UV visible a 254nm y a diferencia de los compuestos ya

encontrados presentaba una coloración verdosa al ser revelado con los agentes reveladores anteriormente mencionados. La columna fue eluída hasta la mezcla diclorometano: metanol 3:7. Las fracciones fueron unidas lo más cuidadosamente posible ya que esta fracción tenía rastros de las fracciones importantes anteriores. La figura 23 describe la purificación de la fracción EM4.

Tabla 19. Masa de las subfracciones para la purificación de la fracción F7 por cromatografía de columna

Nombre fracción	Fracción	(Masa \pm 0,1) mg
F7.1	f1-14	10,1
F7.2	f15-36	31,4
F7.3	f37-52	23,5
F7.4 (EM4)	f53-65	15,9
F7.5	f66-79	45,1

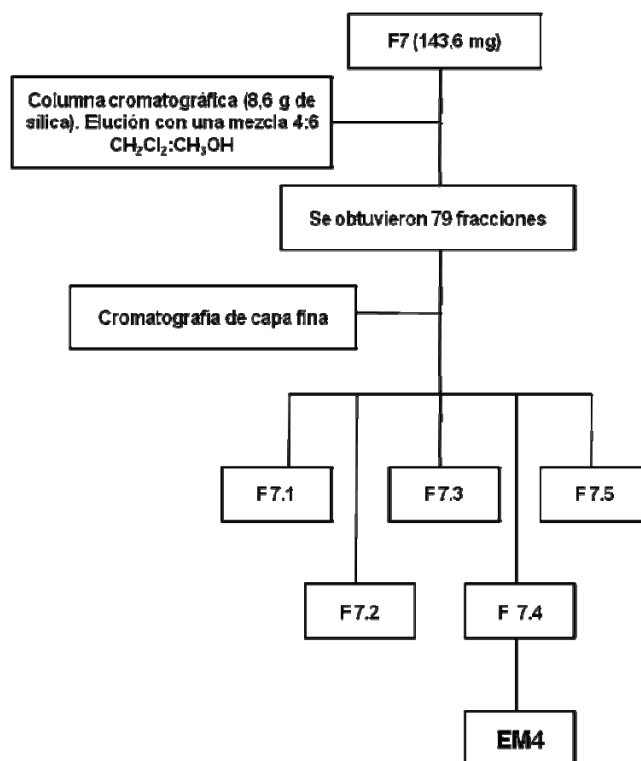


Figura 23. Procedimiento para la purificación de la fracción F7

III. 1.3.4. Porcentaje de las fracciones aisladas con respecto al EM.

Tabla 20. Porcentaje de las fracciones aisladas con respecto al EM.

Fracción	(Masa \pm 0,1) mg	% en el EM
EM1	11,2	0,51
EM3	53,5	2,45
EM4	15,9	0,73

III. 1.4. Resultados de las fracciones aisladas hacia distintos ensayos químicos

Tabla 21. Resultados de las fracciones aisladas frente a diferentes ensayos químicos

Fracción	Fehling	Benedict	Ninhidrina	α -naftol	Orcinol
EM	-	+	+	+	+
EM1	-	-	-	-	-
EM3	-	+	+	+	-
EM4	-	+	+	+	+

CAPITULO IV.

IV.1. DISCUSION DE RESULTADOS.

IV.1.1. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos para EM1

Del tratamiento cromatográfico del extracto metanólico se obtuvo 11,2 mg de una primera fracción denominada EM1. Esta fracción se aisló como un semisólido marrón, soluble en diclorometano y cloroformo. EM1 fue sometido a análisis espectroscópicos de RMN (espectros 1 y 2) y a análisis de espectrometría de masas (espectros 3,4 y 5), los datos obtenidos de los espectros de protones y carbonos son mostrados en la tabla 22.

Del espectro 1, de RMN-¹H, se obtuvo la siguiente información:

Una señal a un desplazamiento químico de 0,85 ppm en forma de triplete que puede ser asociado a protones metílicos, además se observa en un δ de 1,24 ppm una señal muy intensa característica de protones metilénicos en cadena carbonadas largas. Un multiplete encontrado en 1,65 ppm el cual es asociado a protones metilénicos en posición β a un grupo carbonilo. Un triplete a 2,31 ppm que puede ser asignado a protones de un metileno enlazado directamente a un grupo carbonilo de un ácido.

Es importante resaltar que debido a la poca cantidad de material obtenido el espectro de RMN-¹³C no se desarrolló por completo, sin embargo, un análisis detallado de las señales observadas es descrito a continuación (espectro 2):

Una señal en un desplazamiento químico de 14,12 ppm que puede ser atribuido a carbonos metílicos, seguido a éste se observa otra señal a 22,66 ppm que puede ser asignado a carbonos metilénicos enlazados directamente a un metilo. A un δ de 29,77ppm se observa una señal muy intensa característica a carbonos del

tipo $-(CH_2)_n-$ que se encuentran en un mismo entorno químico. Finalmente una señal en 31,94ppm que corresponde a un $-CH_2$ enlazado directamente a un grupo $-COOH$.

Tabla 22. Datos espectroscópicos de 1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) en $CDCl_3$ para EM1

δ 1H (ppm); mult	δ ^{13}C (ppm)
2,61; s	41,06
2,31; t	31,93
2,01; s	29,77
1,71; d	29,39
1,65; m	22,66
1,59; d	14,12
1,24; s	
0,85; t	

Las asignaciones hechas para la fracción EM1 para un ácido graso en general se muestran a continuación:

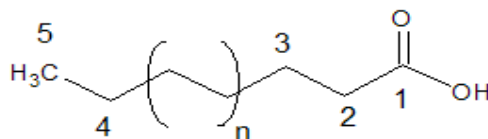
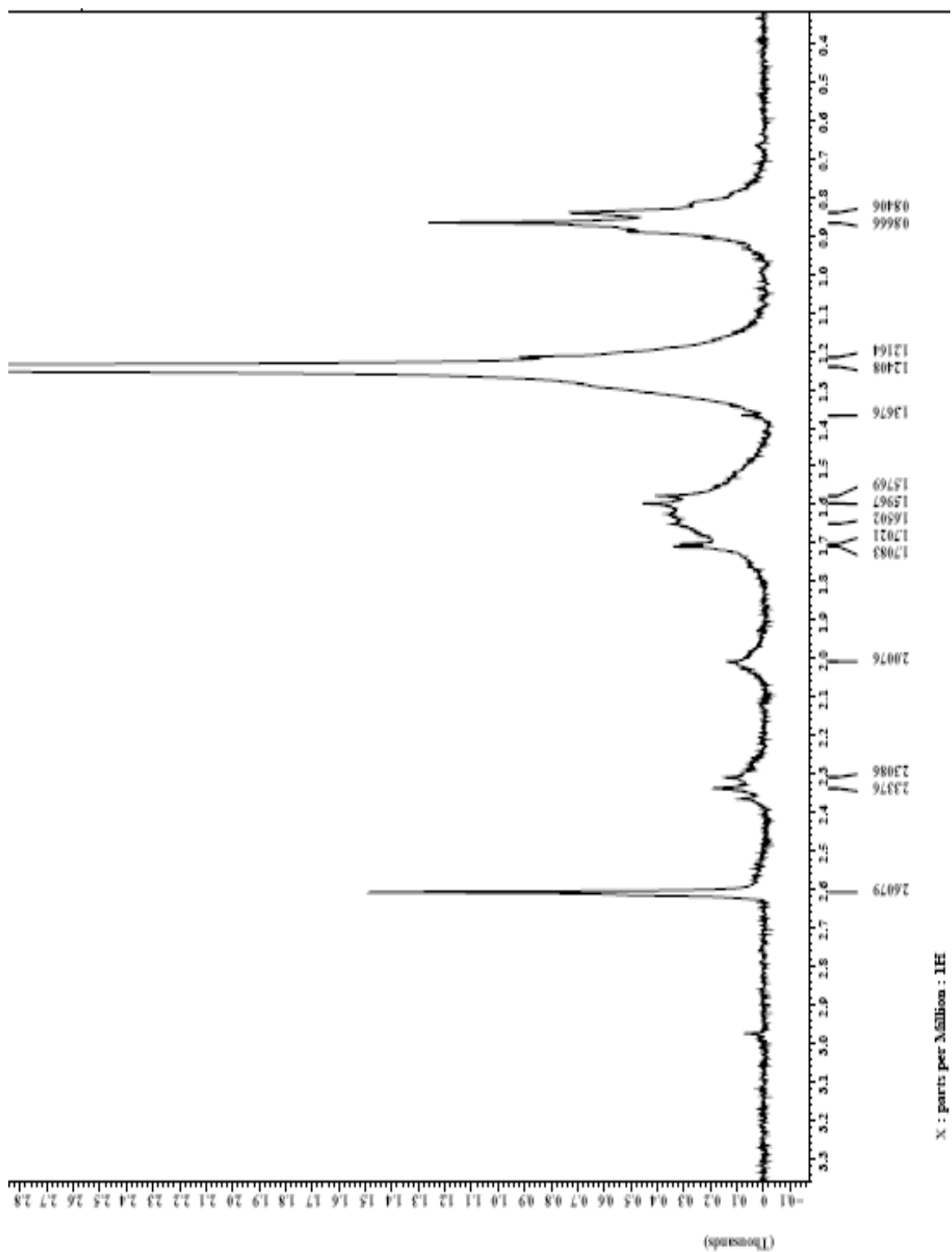


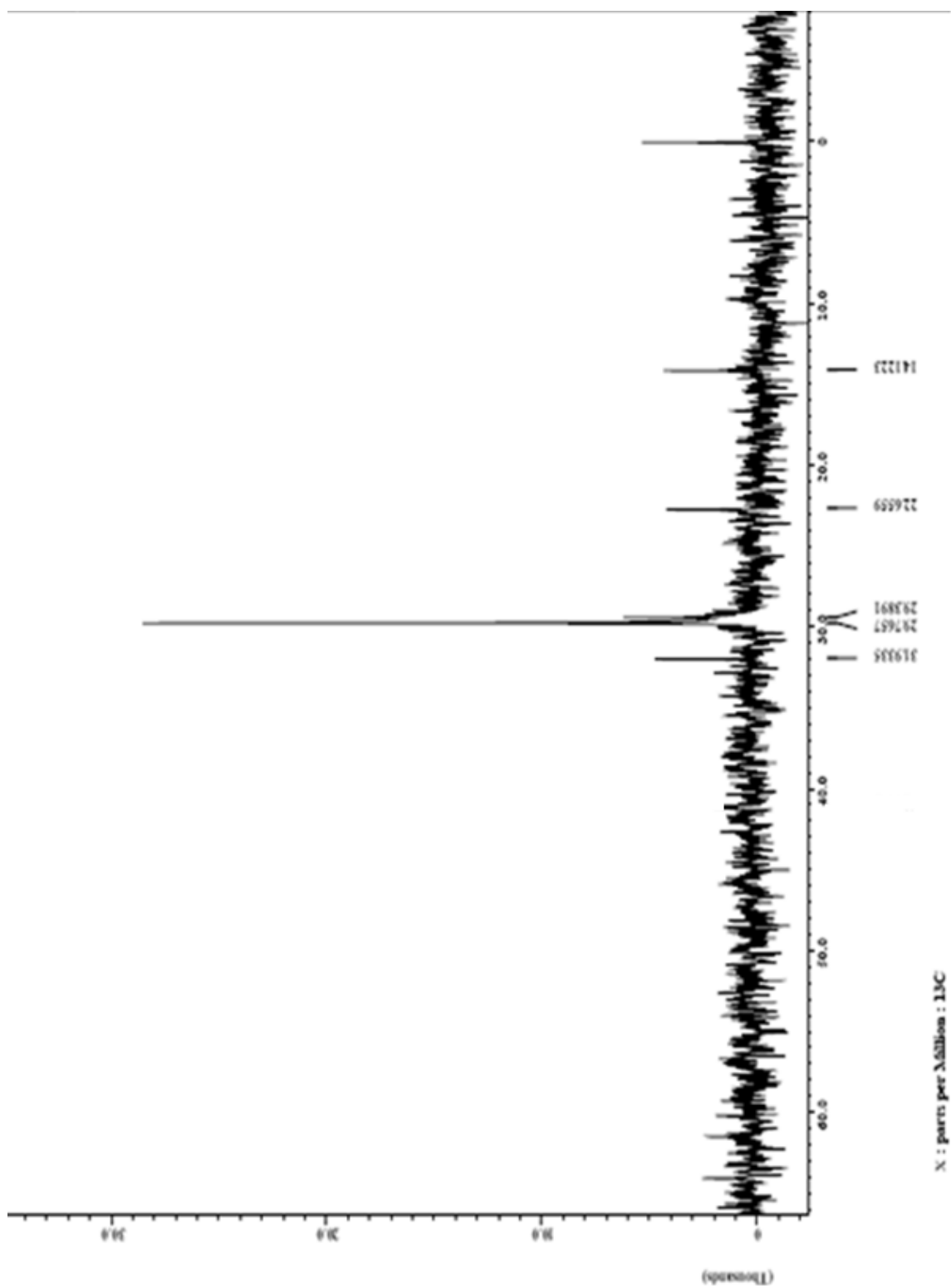
Figura 24. Estructura general de un ácido graso

Tabla 23. Tabla de asignaciones para un ácido graso en general en base a los datos de RMN obtenidos para la fracción EM1

Posición	δ 1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
2	2,31; t	31,94
3	1,65; m	29,77
n	1,24; s	29,77
4	1,24; s	22,66
5	0,85; t	14,12



Espectro 1. RMN- ^1H de la fracción EM1

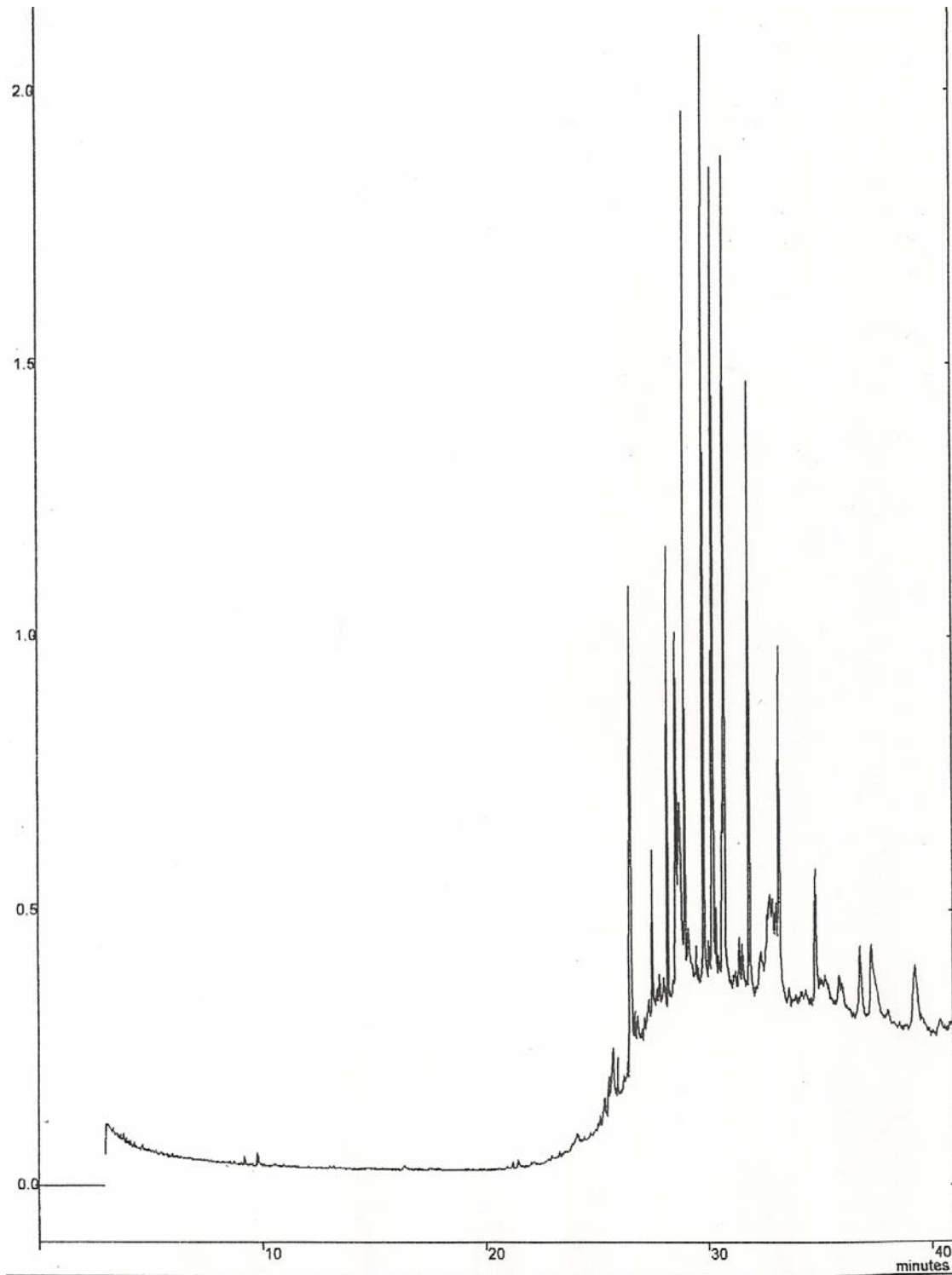


Espectro 2. RMN- ^{13}C de la fracción EM1

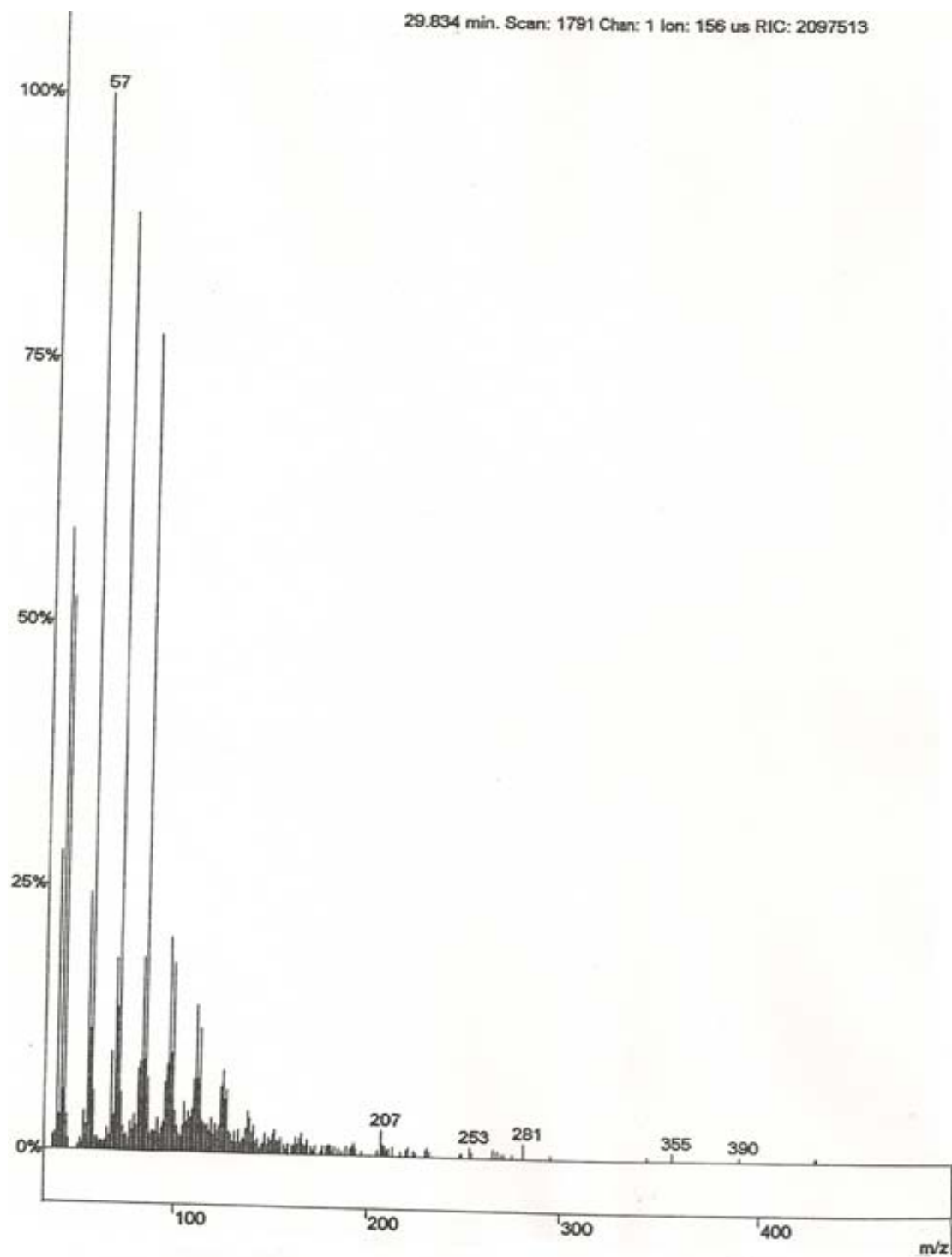
De los espectros 4 y 5, espectros de masa, se observa lo siguiente:

Esta fracción fue analizada primero por un cromatógrafo de gases, seguido del análisis espectrométrico de los picos más relevantes (CG-MS). Después de realizar dicho análisis los espectros de masas muestran un pico base en 355 m/z que asumiremos como el ión molecular a pesar de que el número correspondiente sea impar (se asume el error del equipo que es aproximadamente ± 1 m/z), por ello para un M^+ de 354 uma se puede presumir una fórmula molecular de $C_{23}H_{46}O_2$, compuesto mayoritario de la fracción EM1. La justificación de los picos más importantes encontrados en el espectro de masa es discutida a continuación:

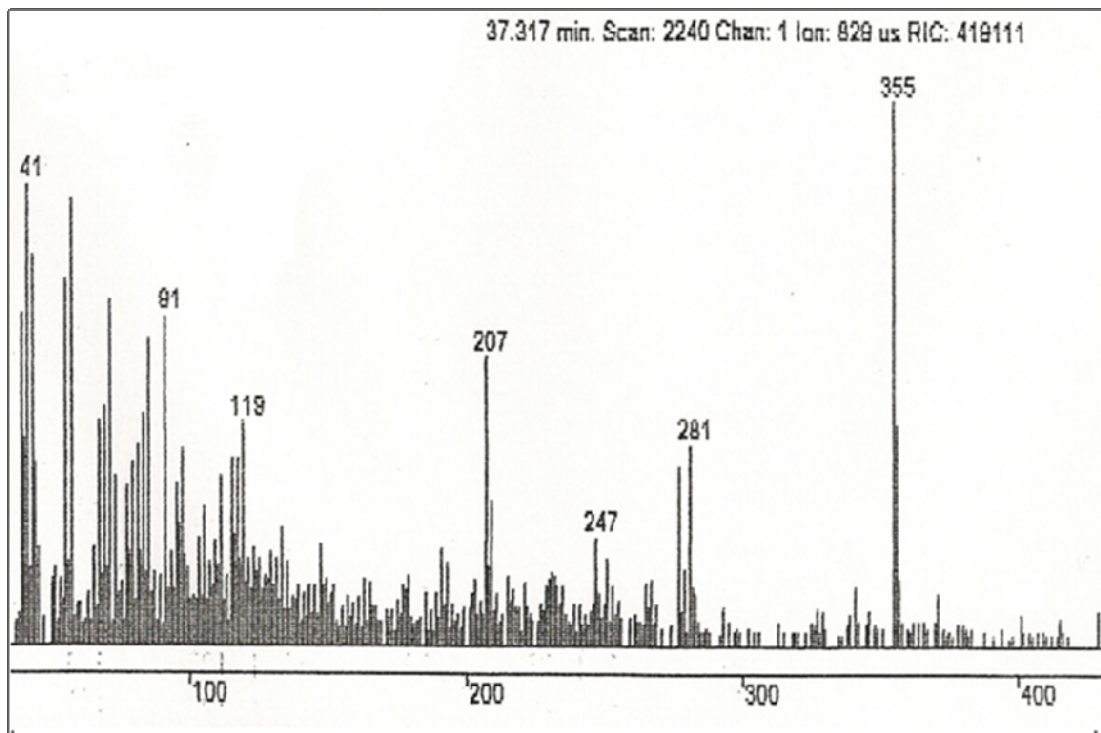
- Lo primero que se observa en el espectro de masa es un grupo de señales en forma de campana de gauss entre 14 y 100 m/z correspondiente a las sucesivas pérdidas de $\cdot CH_2$, lo cual es un patrón de fragmentación típico de los ácidos grasos lineales. Además cuando existe cadenas largas se da el clivaje de los enlaces C-C con la pérdida de un átomo de hidrógeno, de esta manera para cadenas hidrocarbonadas se observan los picos C_nH_{2n-1} o C_nH_{2n-2} ^[39]
m/z: $C_3H_5^+$
- m/z = 57 se pudiera atribuir a la especie $CH_3(CH_2)_3^+$
- m/z = 91 se pudiera atribuye a la pérdida de $\cdot CH_2CH_2$ del pico de 119 m/z
- La pérdida de 46 del pico de 253 m/z a 207 m/z se pudiera presumir a la pérdida que llevan a cabo los ácidos de $H_2O + CO$
- La pérdida de 74 uma del pico de 355 a 281 m/z se pudiera atribuir a la pérdida de $\cdot (CH_2)_2CO_2H$.



Espectro 3. Cromatograma para la fracción EM1 de 0 a 40 min



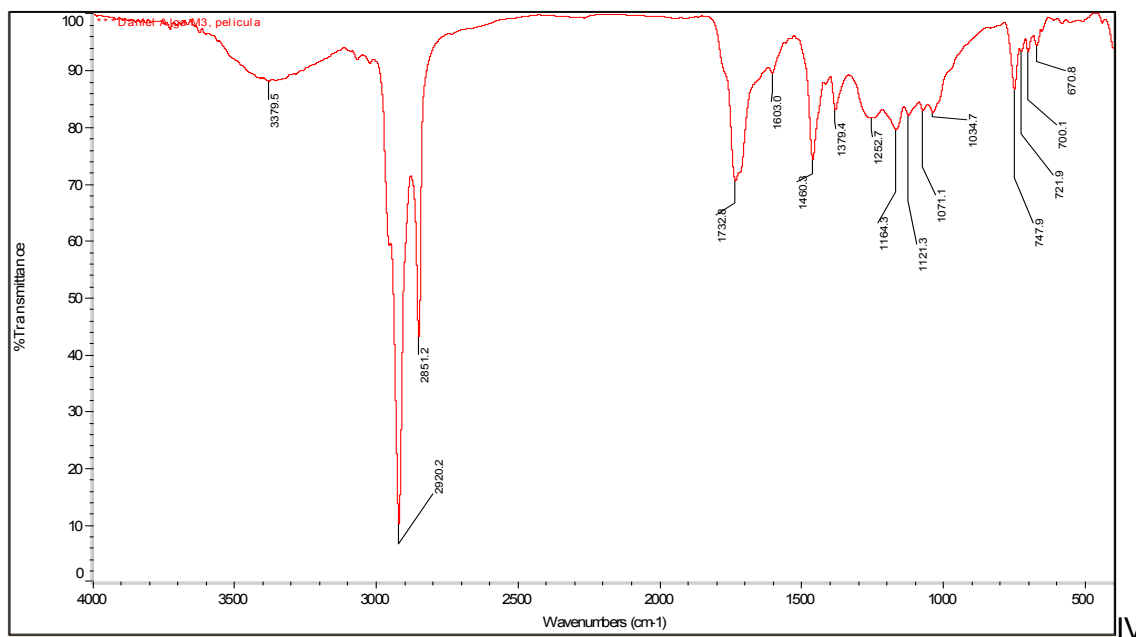
Espectro 4. Espectro de masa de la fracción EM1 a los 29.834 min



Espectro 5. Espectro de masa de la fracción EM1 a los 37,317 min

Del espectro 6, de IR, se observa lo siguiente:

Una banda ancha alrededor de $3379,5 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento del enlace O-H, seguido por unas bandas intensas en $2920,2$ y $2851,2 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento C-H de grupos metilos y metilénicos. Finalmente en $1732,8$ se observa un pico medianamente intenso que se adjudica al estiramiento C-O de un grupo carbonilo de un ácido.



Espectro 6. Espectro IR para la fracción EM1

En base a toda esta información espectrométrica y espectroscópica, se pudo caracterizar en la fracción EM1 un ácido graso como constituyente mayoritario.

En los espectros de RMN-¹³C y RMN-¹H se observa la presencia de un metilo terminal y señales muy intensas de una cadena carbonada muy larga, además de un grupo carbonilo de un ácido debido a los desplazamientos de los protones ubicados en posición α y β al mismo. Como consecuencia de la poca concentración de la muestra al realizar el análisis no se pudo visualizar el carbono carbonílico correspondiente al grupo carboxílico. Del espectro de masa se puede inferir una fórmula molecular de $C_{23}H_{46}O_2$. Del análisis de los resultados antes discutidos se propone que el compuesto principal de la fracción EM1 pudiera ser:

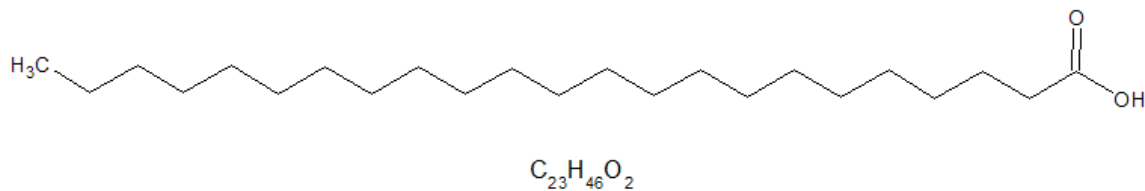


Figura 25. Posible compuesto que forma parte de la fracción EM1

IV. 1.2. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos para EM3

Del tratamiento cromatográfico del extracto metanólico se obtuvo 53,5 mg de un compuesto denominado EM3. Esta fracción se aisló como un semisólido amarillo, soluble en agua y metanol. EM3 fue sometido a análisis espectroscópicos de RMN (espectros 7,8 y 9) y a análisis de espectrometría de masas (espectro 10), los datos obtenidos de los espectros de protones y carbonos son mostrados en las tablas 24 y 25.

Del espectro 7, de RMN-¹H, se obtuvo la siguiente información:

Este espectro mostró varias señales en forma de doblete en una región entre 2,90 y 3,09 ppm, los cuales en base a sus desplazamientos químicos pueden ser asociados a protones metilénicos directamente enlazados a grupos -OH. Por otro lado, se observa en un desplazamiento químico de 3,66 ppm un multiplete que se asigna a protones metínicos que forman parte de heterociclos, los cuales están enlazados a grupos -OH o -CH₂OH. También se observa en un desplazamiento químico de 4,12 ppm un multiplete que puede ser asignable a protones metínicos de heterociclos que están enlazados directamente al heteroátomo y a su vez a grupos -OH o -CH₂OH. Finalmente, un doblete a 5,40 ppm cuyo valor es característico de protones anoméricos de carbohidratos.

Del espectro 8 y 9, de RMN-¹³C y DEPT, se obtuvo la siguiente información:

Se observaron a desplazamientos químicos de 105,34; 105,10 y 93,65ppm varias señales características de carbonos anoméricos de carbohidratos. Por otro lado, varias señales encontradas entre 83,72 y 70,36 ppm que podrían ser asociadas a carbonos metínicos de un heterociclo, los cuales están enlazados a grupos -OH o -CH₂OH. Y el último grupo de señales, cuyos desplazamientos químicos se encuentran en 72,05ppm y entre 64,17 y 62,29 ppm, que corresponden a carbonos metilénicos enlazados directamente a grupos -OH.

Tabla 24. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) en CD_3OD para EM3

δ 1H (ppm); mult	δ 13C (ppm)
5,40; d	105,34
4,15-4,08; m	105,10
3,82-3,62; m	93,65
3,60; t	83,72
3,09; d	79,67
3,04; d	76,65
2,95; d	75,89
2,90; d	74,82
	74,62
	74,37
	73,19
	72,57
	72,10
	72,05
	71,51
	70,36
	64,17
	64,08
	63,42
	62,35
	62,29
	51,98
	50,60

Tabla 25. Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN-DEPT (400 MHz) para EM3 en CD_3OD

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT
105,34	-C-
105,10	-CH
93,65	-CH
83,72	-CH
79,67	-CH
76,65	-CH
75,89	-CH
74,82	-CH
74,62	-CH
74,37	-CH
73,19	-CH
72,57	-CH
72,10	-CH
72,05	-CH ₂
71,51	-CH
70,36	-CH
64,17	-CH ₂
64,08	-CH ₂
63,42	-CH ₂
62,35	-CH ₂
62,29	-CH ₂
51,98	-CH ₃
50,60	-CH ₂ -

Analizando los espectros de RMN para esta fracción se presume que está constituida por carbohidratos. A continuación se hace la asignación de algunas señales encontradas experimentalmente en la fracción EM3 en carbohidratos como glucosa y fructosa (tabla 26)

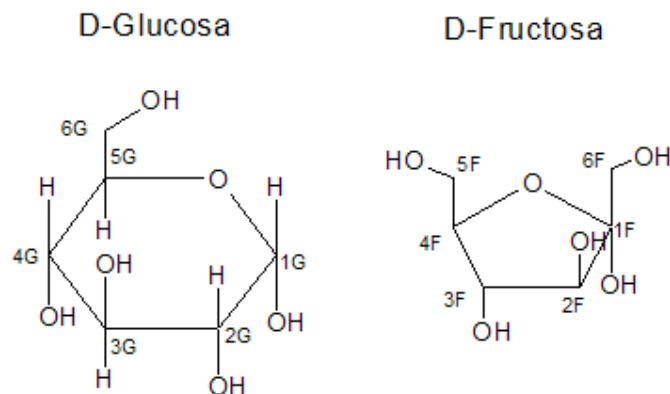
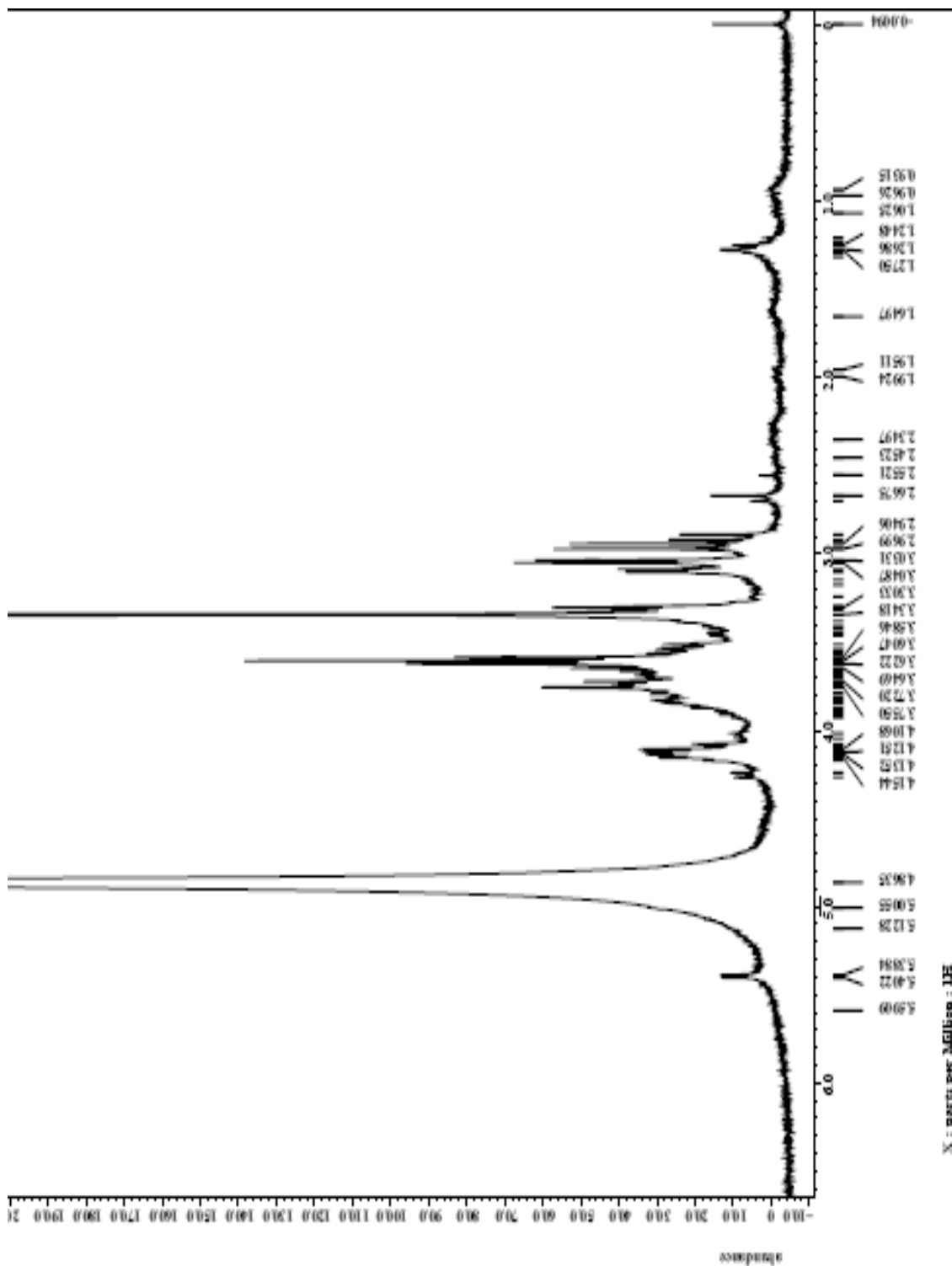


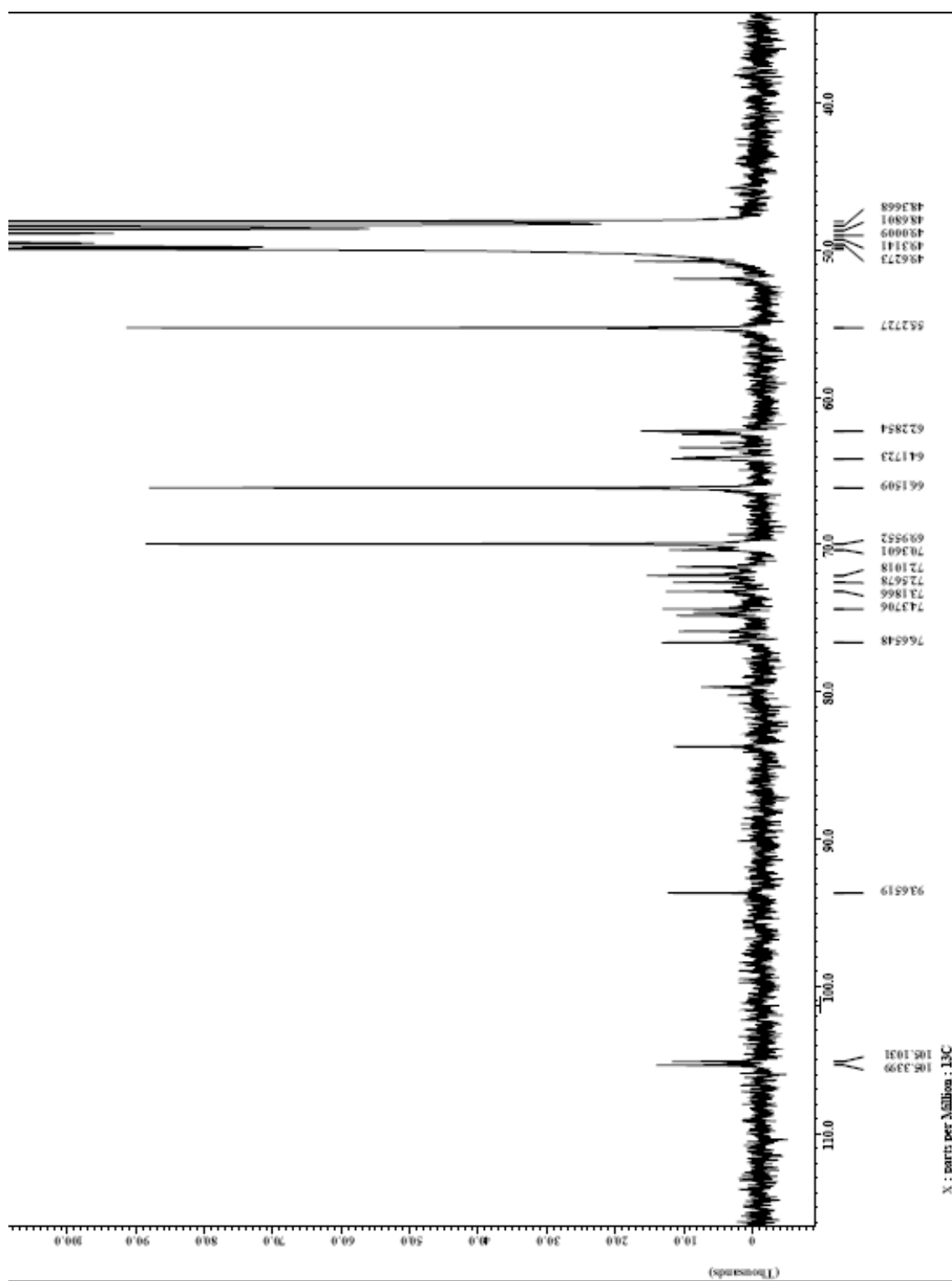
Figura 26. Estructura de la D-glucosa y la D fructosa respectivamente

Tabla 26. Asignaciones de desplazamientos químicos para la D.glucosa y la D-fructosa usando la data experimental de la fracción EM3.

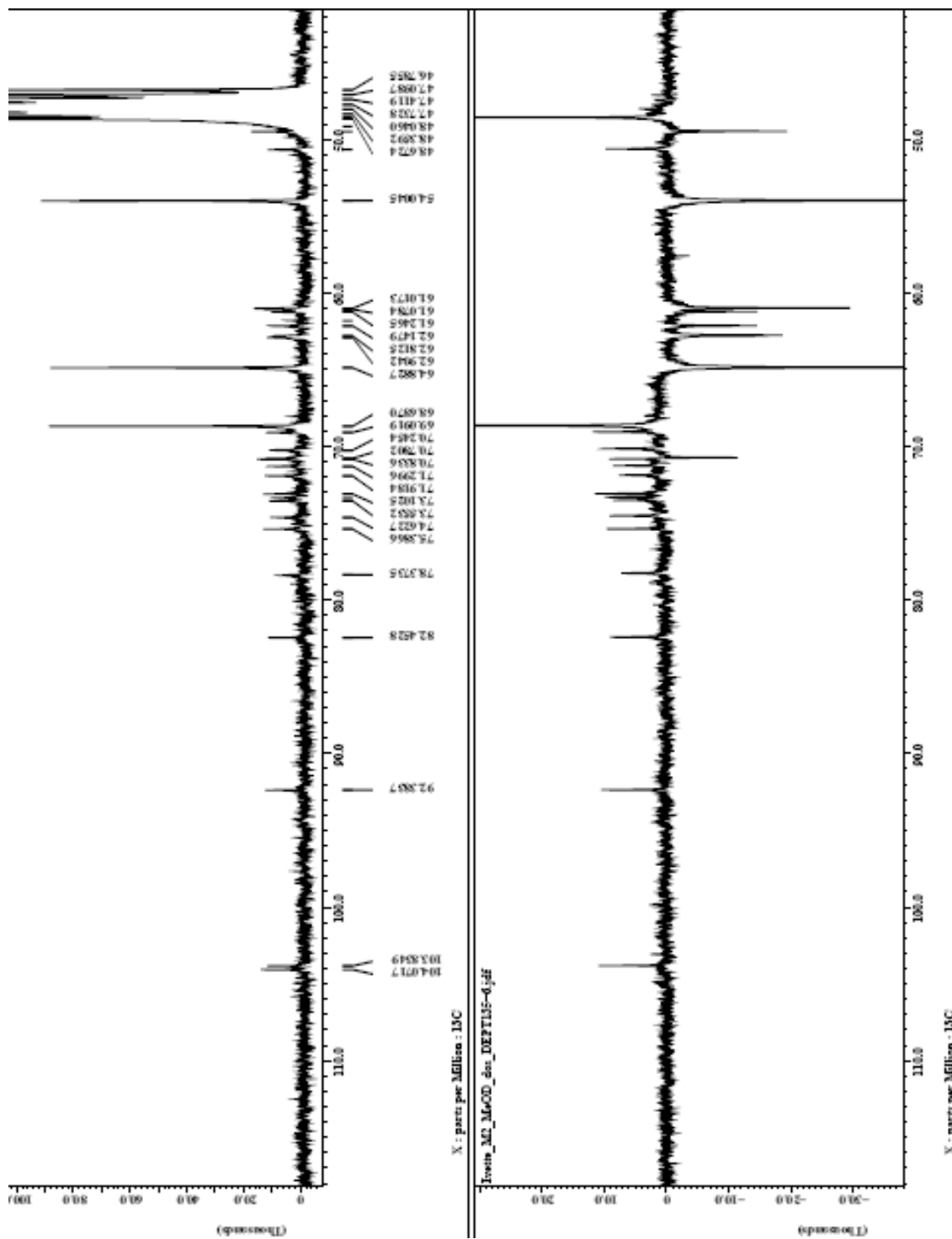
Posición	δ 13C (ppm)	δ 1H (ppm)
1F	105,1	---
1G	93,65	5,40
2F	83,72	3,73
3F	79,67	4,15
4F	76,65	4,10
4G	74,82	3,61
2G	73,19	3,58
3G	72,57	3,08
5G	70,36	3,60
5F	63,42	3,05
6G	62,35	3,04
6F	62,29	3,59



Espectro 7. RMN- ^1H de la fracción EM3



Espectro 8. RMN-¹³C de la fracción EM3



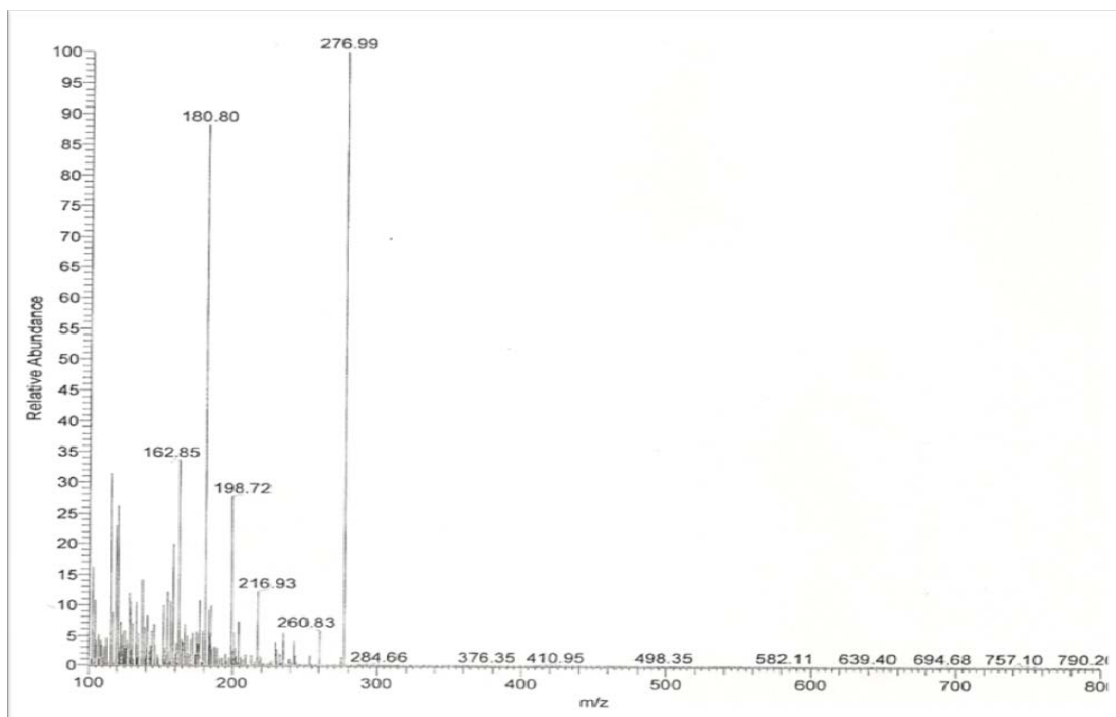
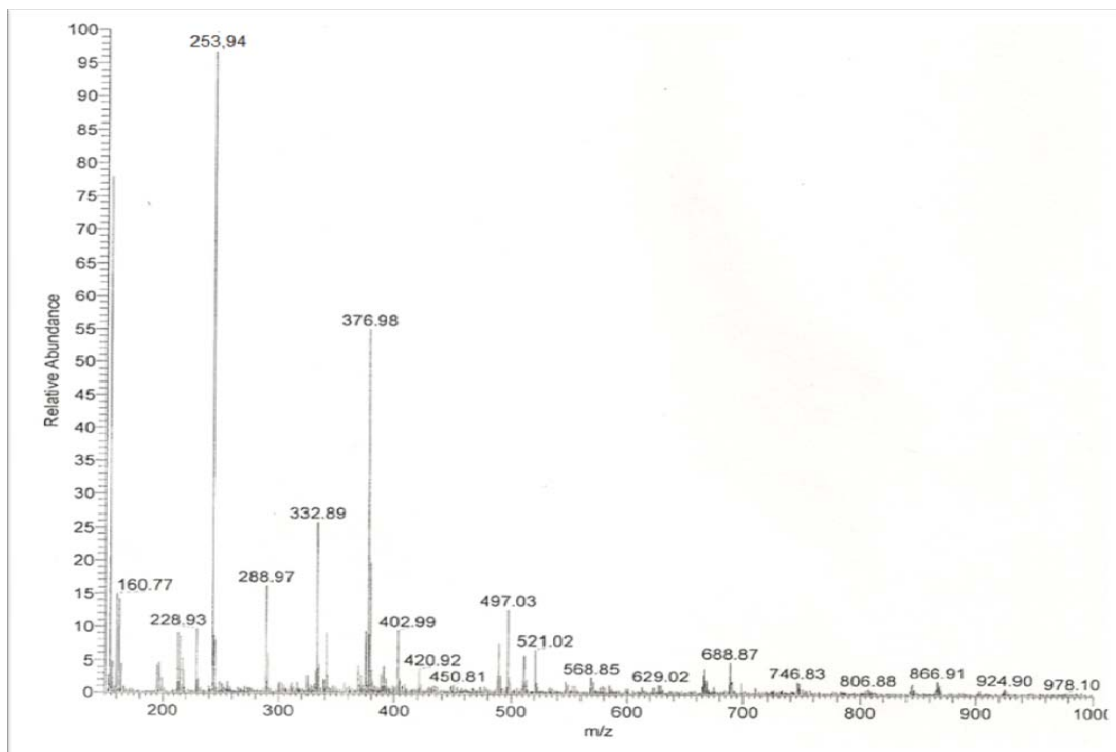
Espectro 9. RMN- ^{13}C y DEPT de la fracción EM3

Del espectro 10, espectro de masa, se observa lo siguiente:

Este espectro a diferencia del anterior fue tomado en un espectrómetro de masa con detector de electro spray (LRMSES), este tipo de análisis fue debido a la polaridad de la fracción. A diferencia de los espectros de masa anteriores, los espectros de masa por electro spray dan directamente el ión molecular de los compuestos presentes. En este caso el espectro fue tomado bajo dos condiciones diferentes, obteniendo así dos espectros diferentes para esta fracción.

Del primero de ellos se tienen dos picos relevantes en 180 y 276 m/z, el pico en 276 m/z forma parte de contaminación de la muestra, en cambio el pico en 180 m/z se atribuye a un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Por otra parte, en el otro espectro de masa se encuentra un ión molecular principal alrededor de 254 m/z, el cual pudiera ser adjudicado a un monosacárido unido a un glicerol, a este compuesto se le atribuye una fórmula molecular $C_9H_{18}O_8$. Tomando en cuenta lo anteriormente mencionado la fracción EM3 parece estar constituida por dos compuestos principalmente.

En base a la información espectroscópica y espectrométrica se puede decir lo siguiente para la fracción EM3: La fracción está constituida por un monosacárido y un monosacárido con una unidad de glicerol. Tomando en cuenta los desplazamientos químicos en el RMN- ^{13}C al menos unos de los monosacáridos debe tener forma de furanosa (ciclo de 5 miembros), esta afirmación surge de la presencia de señales a campo tan bajo (aproximadamente 105 ppm) las cuales son valores de desplazamiento químico típico para anillos de 5 miembros debido a que presentan una mayor tensión entre sus enlaces.



Espectro 10. Espectros de masa para la fracción EM3 a distintas condiciones.

En este punto fue imperativo resolver dos cosas: 1) saber cuales eran los monosacáridos que formaban parte de esta fracción y 2) cual era el monosacárido libre y cual el que estaba unido al glicerol. Para resolver el primer problema se realizó un análisis minucioso de los datos espectroscópicos obtenidos, empleando para ello las tablas de valores reportados de desplazamientos químicos, tanto de ^{13}C como de ^1H , para las pentosas y hexosas más importantes, realizando un estudio comparativo entre las señales reportadas y las encontradas experimentalmente.

Entre algunas pentosas se tiene: xilosa, lixosa y arabinosa, todas en su forma de furanosa (cíclica). Sus estructuras se muestran en la figura 27, y en las tablas 27 y 28 sus respectivos desplazamientos químicos reportados en la literatura.

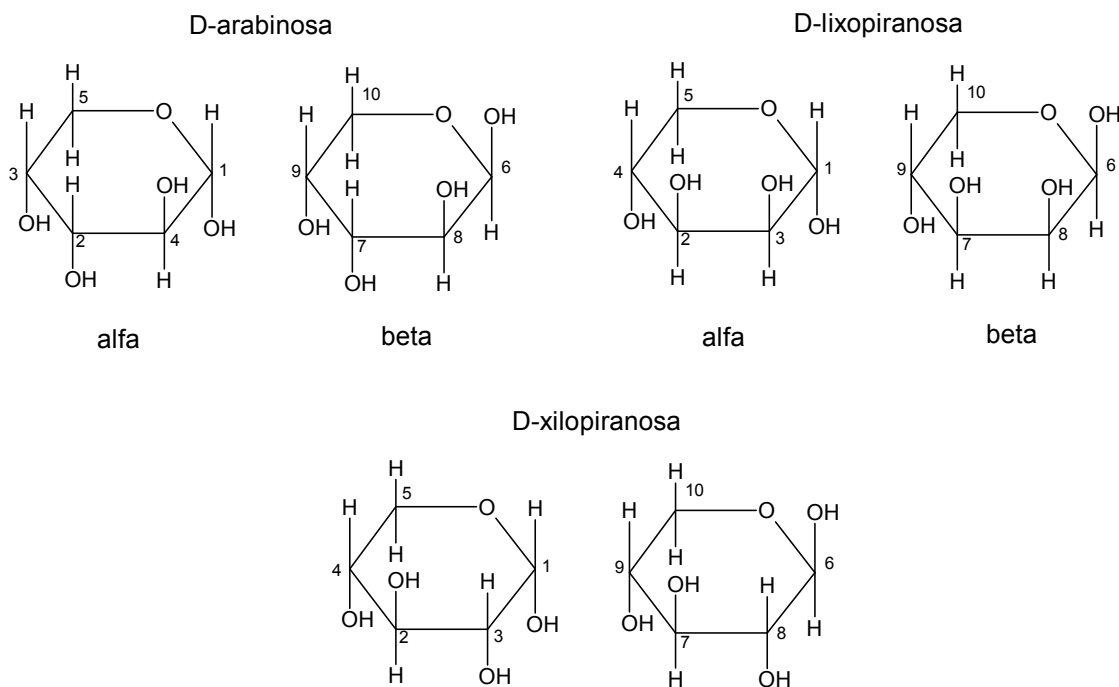


Figura 27. Estructura química de pentosas importantes

Tabla 27. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H para las α -pentosas más importantes en D_2O .

Posición	α -Ara		α -Xil		α -Lix	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	97,87		93,29	5,20	95,16	4,61
2	73,59		73,93	3,65	71,65	3,39
3	73,02		72,56	3,63	71,16	3,58
4	69,60		70,49	3,52	68,64	3,54
5	67,44		62,01	3,69	64,14	3,36

Tabla 28. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H para las β -pentosas más importantes en D_2O .

Posición	β -Ara		β -Xil		β -Lix	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
6	93,69	4,87	97,69	4,58	95,24	
7	69,77	3,60	76,92	3,43	73,73	
8	69,22	3,48	75,14	3,23	72,12	
9	65,80	3,68	70,32	3,61	67,72	
10	63,56	3,52	66,23	3,63	65,09	

Entre algunas hexosas se tiene: glucosa, mannososa, galactosa en forma de piranosa y fructosa en forma de furanosa. Sus estructuras se muestran en la figura 28, y en las tablas 29 y 30 sus respectivos desplazamientos químicos reportados en la literatura.

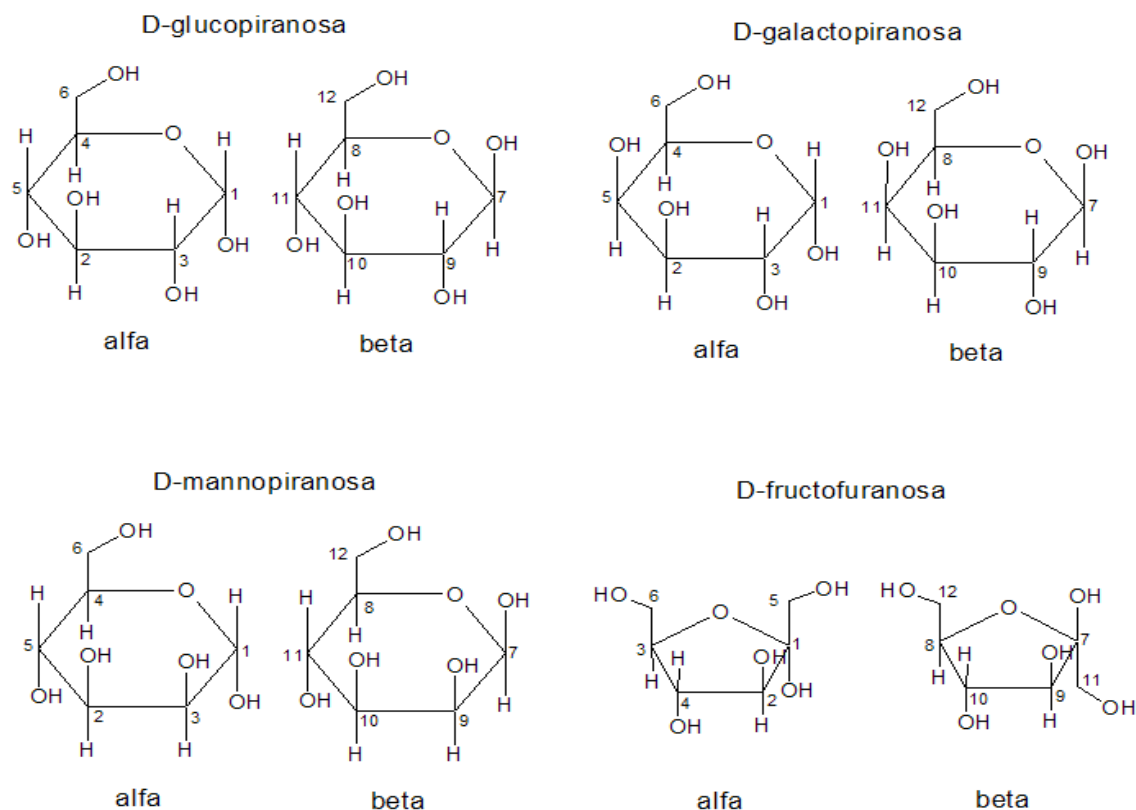


Figura 28. Estructuras químicas de las hexosas más importantes.

Tabla 29. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H para las α -hexosas más importantes en D_2O . [33]

Pos	α -Glu		α -Glc		α -Man		α -Fruc	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	93,18	5,43	93,32	5,27	95,02	4,88	104,1	---
2	73,87	3,42	71,43	4,09	73,38	3,27	82,79	3,89
3	72,57	3,10	70,37	3,99	71,75	3,52	80,76	4,22
4	75,62	3,57	70,26	3,82	71,32	3,50	75,67	4,06
5	70,75	3,04	69,45	3,85	67,96	3,60	63,60	3,78
6	61,67	3,49	69,22	3,74	62,08	3,56	60,94	3,67

Tabla 30. Valores reportados de los desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C y RMN- ^1H para las β -hexosas más importantes en D_2O . [33]

Pos	β -Glu		β -Glc		β -Man		β -Fruc	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
7	97,00	5,58	97,49	4,59	94,67	4,68	101,86	---
8	77,01	3,04	76,09	3,75	77,09	3,02	81,76	3,79
9	76,88	2,89	73,89	3,65	74,11	3,52	75,56	4,11
10	75,25	3,10	73,03	3,49	72,24	3,56	75,19	3,99
11	78,45	3,10	69,80	3,93	67,72	3,48	62,81	3,58
12	61,90	3,54	62,03	3,75	63,35	3,60	62,79	3,60

En base a la comparación de los desplazamientos químicos reportados para estos carbohidratos con los obtenidos experimentalmente se puede decir que uno de los monosáridos es α -fructofuranosa. Esto se puede confirmar al observar la tabla 31 donde se plantea un cuadro comparativo entre las señales de la fructosa y de la fracción EM3.

Tabla 31. Cuadro comparativo entre la α -D-fructosa y la fracción EM3

Pos	Fracción EM3		α -Fruc	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	105,1	---	104,1	---
2	83,72	3,73	82,79	3,89
3	79,67	4,15	80,76	4,22
4	76,65	4,10	75,67	4,06
5	63,42	3,65	63,60	3,78
6	62,29	3,59	60,94	3,67

Tomando en cuenta las señales restantes se puede predecir que el otro monosacárido es α -glucopiranososa. A fin de confirmar esta aseveración se planteó el siguiente estudio comparativo (tabla 32).

Tabla 32. Cuadro comparativo entre la α -D-glucosa y la fracción EM3

Pos	Fracción EM3		α - Glu	
	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$
1	93,65	5,40	93,18	5,43
2	73,19	3,58	73,87	3,42
3	72,57	3,08	72,57	3,10
4	74,82	3,61	75,62	3,57
5	70,36	3,03	70,75	3,04
6	62,35	3,60	61,67	3,49

Siguiendo con el análisis espectroscópico de RMN, los desplazamientos químicos reportados en la literatura para la glicerina se compararon con los datos experimentalmente encontrados en la fracción EM3, teniendo presente las asignaciones de los monosacáridos determinados anteriormente.

Tabla 33. Cuadro comparativo entre el glicerol y la fracción EM3

Pos	Fracción EM3		Glicerol	
	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$
1	64,17	3,44	63,05	3,38
2	74,62	3,56	74,37	3,44
3	64,08	3,48	63,05	3,38

Finalmente faltaría por saber si el glicerol se encuentra unido a la fructosa o a la glucosa, pero tomando en cuenta que los desplazamientos químicos de la fructosa tienen mucha similitud con los reportados, se propone a la glucosa como el compuesto unido al grupo glicerol. Los dos monosacáridos propuestos son hexosas, y en base a toda la discusión anteriormente detallada se propone que los compuestos presentes en la fracción EM3 son:

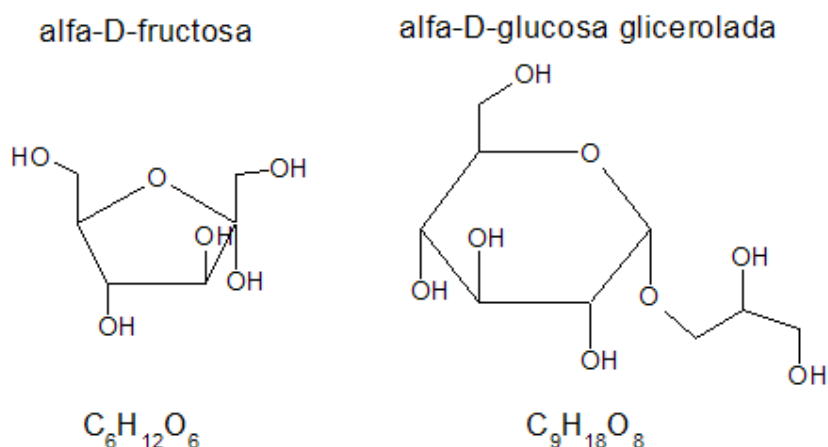


Figura 29. Posibles compuestos que forman parte de la fracción EM3

IV.1.3. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos para EM4

Del tratamiento cromatográfico del extracto metanólico se obtuvo 15,19 mg de un compuesto denominado EM4. Esta fracción se aisló como un semisólido amarillo, soluble en agua y metanol. EM4 fue sometido a análisis espectroscópicos de RMN (espectros 11, 12 y 13) así como de espectrometría de masas, los datos obtenidos de los espectros de protones y carbonos son mostrados en las tablas 34 y 35.

Del espectro 11, de RMN- 1H , se obtuvo la siguiente información:

Un multiplete alrededor de 0,9 ppm que se puede asignar a protones metílicos, una señal intensa en 1,28 ppm característica de protones metilénicos en cadenas carbonadas largas, a un desplazamiento químico de 1,63 se observa un multiplete que puede ser atribuido a protones metilénicos en posición β a un grupo –COOH, un multiplete alrededor de 2,6 ppm característico de protones metilénicos en posición α a un grupo –COOH. Este espectro mostró varias señales en forma de doblete en una región entre 2,86 y 3,07 ppm, las cuales en base a sus

desplazamientos químicos pueden ser asociados a protones metilénicos directamente enlazados a grupos -OH. Además se observa en un desplazamiento químico de 3,64 ppm un multiplete que se puede atribuir a protones metínicos que forman parte de heterociclos, los cuales están enlazados a grupos -OH o -CH₂OH. También se observa en un desplazamiento químico de 4,11 ppm un multiplete que puede ser asignable a protones metínicos de heterociclos que están enlazados directamente al heteroátomo y a su vez a grupos -OH o -CH₂OH. Finalmente, un doblete a 5,11 ppm cuyo valor es característico de protones anoméricos de carbohidratos.

Del espectro 12 y 13, de RMN-¹³C y DEPT, se obtuvo la siguiente información:

Se observó a un desplazamientos químico de 95,10 ppm una señal característica de un carbono anomérico de un carbohidratos. Por otro lado, varias señales encontradas entre 74,64 y 68,37 ppm que podrían ser asociadas a carbonos metínicos de un heterociclo, los cuales están enlazados a grupos -OH o -CH₂OH. Otras dos señales cuyos desplazamientos químicos se encuentran en 72,22 ppm y 62,69 ppm, que corresponden a carbonos metilénicos enlazados directamente a grupos -OH. La señal en 57,93 ppm puede ser atribuida a un carbono que forma parte de un grupo metoxi. Finalmente, una señal en 30,8 ppm característica de metilenos de cadenas carbonadas largas.

Lo primero que debe ser resaltado es el grado de pureza de esta fracción, la misma está constituida por carbohidratos además de algún tipo de ácido graso, esto en base a la similitud de las señales encontradas en esta fracción y la fracción anteriormente discutida EM1. Debido a que el análisis por espectrometría de masa no fue satisfactorio, no fue posible proponer ninguna estructura para esta fracción. Sin embargo, a pesar de ello, realizando un análisis detallado de la data espectroscópica, se pudo inferir que esta fracción al igual que la anterior (EM3) está

constituida por algún tipo de carbohidrato o mezcla de ellos. Como consecuencia de la poca cantidad de material aislado (15 mg), el espectro de RMN- ^{13}C no se desarrolló con buena resolución señal/ruido, sin embargo todo parece indicar que se trata de una estructura más pequeña que la anterior, pero de mayor polaridad ya que la misma fue eluida después de la fracción EM3 por la columna.

Tabla 34. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) en CD_3OD para EM4

δ ^1H (ppm); mult	δ ^{13}C (ppm)
5,11; d	95,10
4,58; s	74,64
4,12-4,09; m	73,81
3,82-3,45; m	73,29
3,07; d	72,63
3,02; d	72,48
2,91; d	72,41
2,86; d	72,22
2,69; s	72,02
2,65; s	71,49
2,44; m	70,28
2,31; m	68,37
1,99; m	62,69
1,63; s	57,93
1,28; s	30,98
0,93-0,82; m	30,69
	26,74

Tabla 35. Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN-DEPT (400 MHz) para EM4 en CD_3OD

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT
95,10	-CH
74,64	-CH
73,81	-CH
73,29	-CH
72,63	-CH
72,48	-CH
72,41	-CH
72,22	-CH ₂
72,02	-CH
71,49	-CH
70,28	-CH
68,37	-CH
62,69	-CH ₂
57,93	-CH ₃
30,98	-CH ₂
30,69	-CH ₂
26,74	

Analizando los espectros de RMN para esta fracción (EM4) también se presume que esté constituida por carbohidratos. A continuación se hace la asignación de algunas señales encontradas experimentalmente en la fracción EM4 en carbohidratos como mannososa y lixosa (tabla 36).

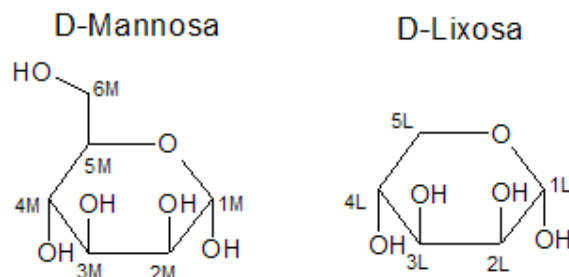
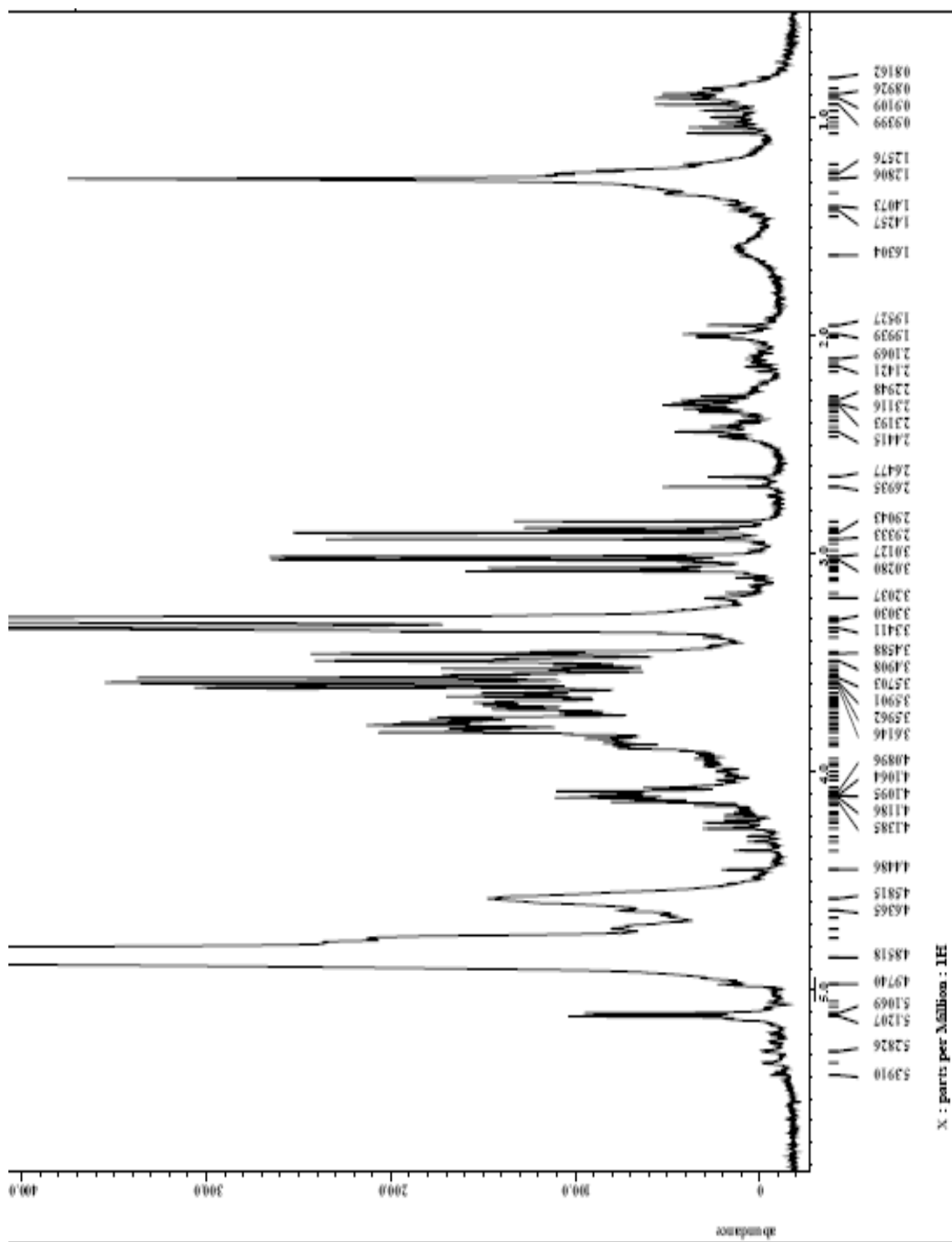


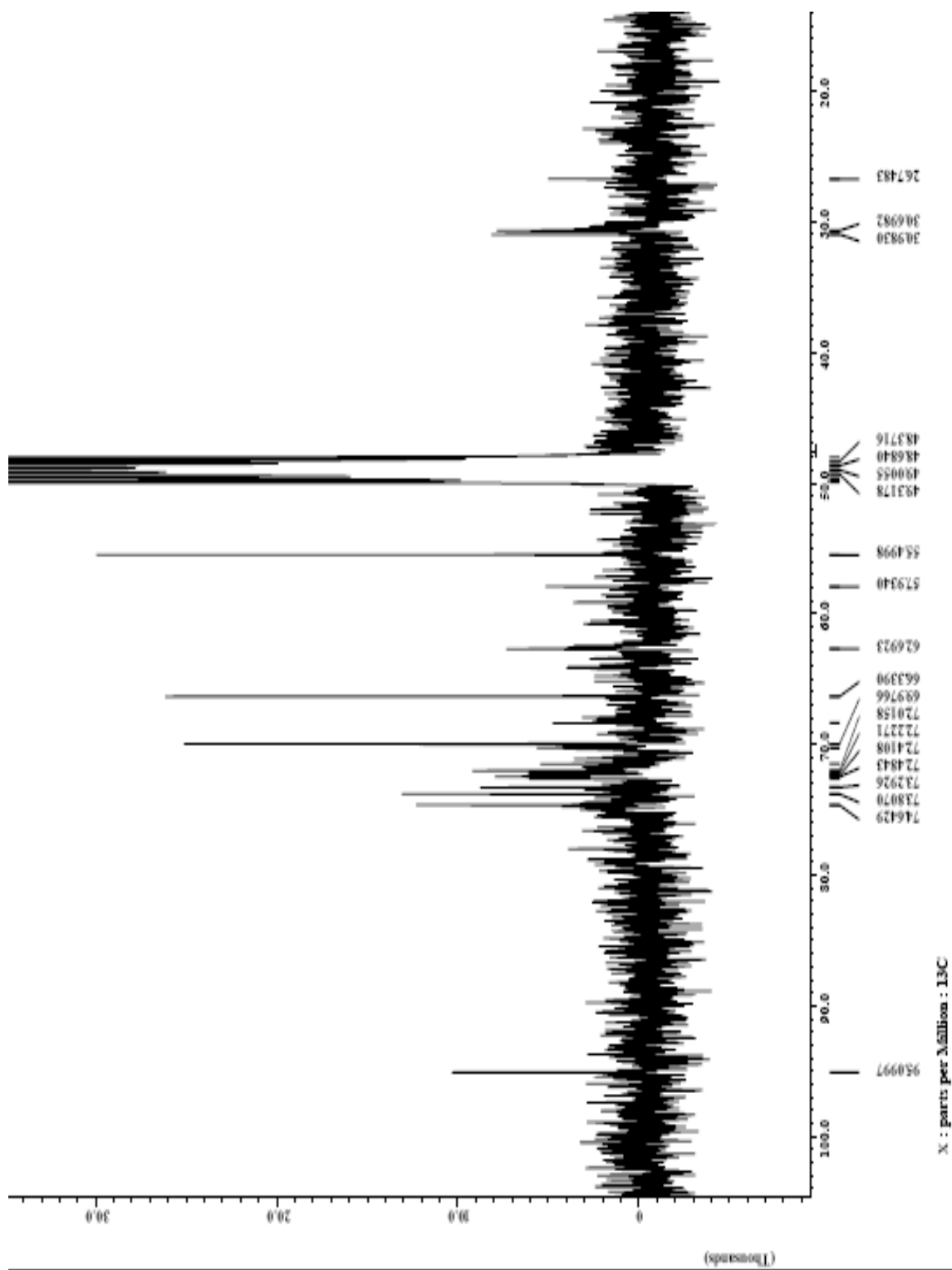
Figura 30. Estructura de la D-Mannosa y la D-Lixosa

Tabla 36. Asignaciones de desplazamientos químicos para la D-Mannosa y la D-Lixosa usando la data experimental de la fracción EM4.

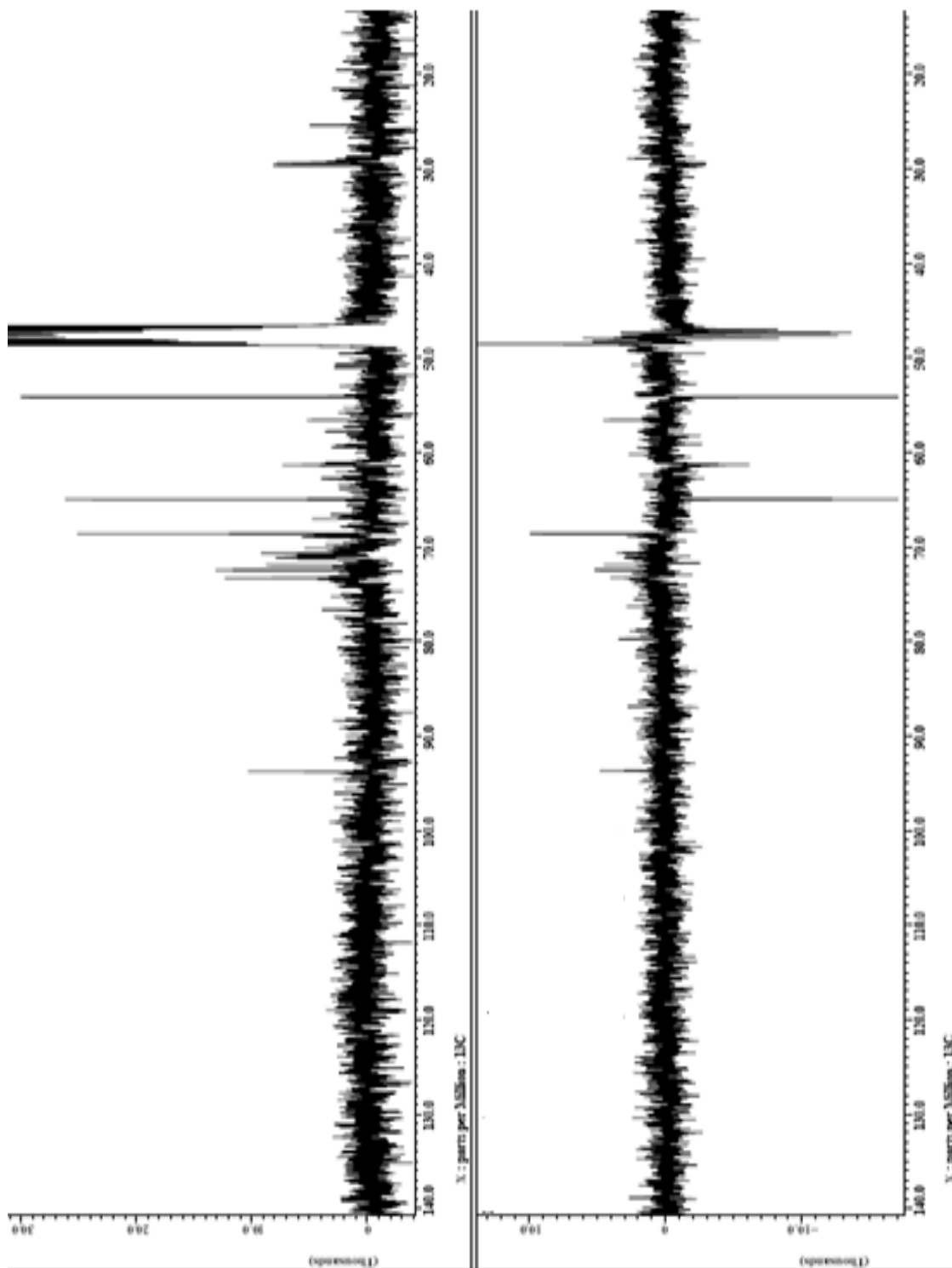
Posición	δ 13C (ppm)	δ 1H (ppm)
1M, 1L	95,10	5,10
2M	73,29	3,03
3M, 2L	72,02	3,49
4M, 3L	71,49	3,46
5M, 4L	68,37	3,61
6M, 5L	62,69	3,59



Espectro 11. RMN-¹H de la fracción EM4



Espectro 12. RMN- ^{13}C de la fracción EM4

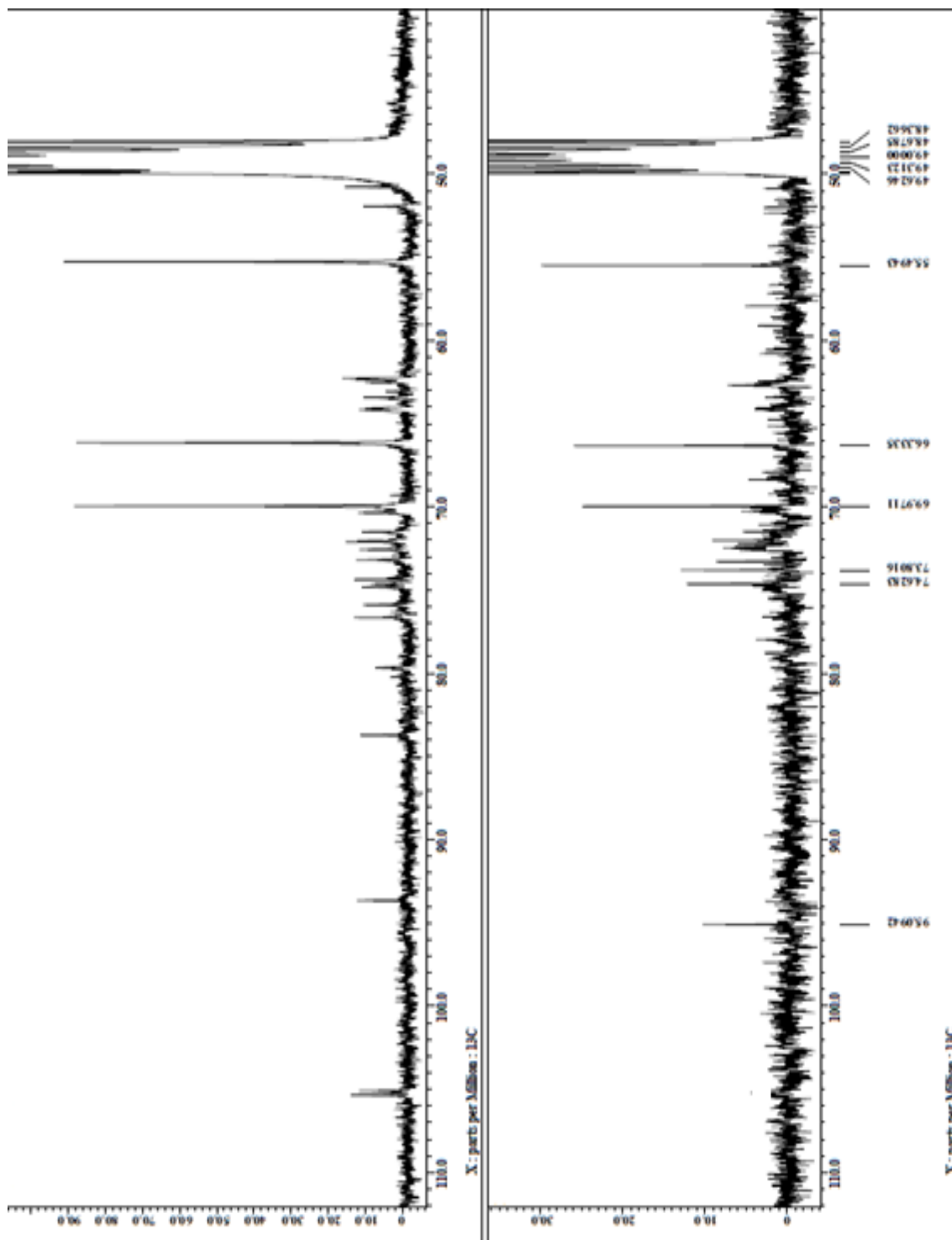


Espectro 13. RMN- ^{13}C y DEPT de la fracción EM4

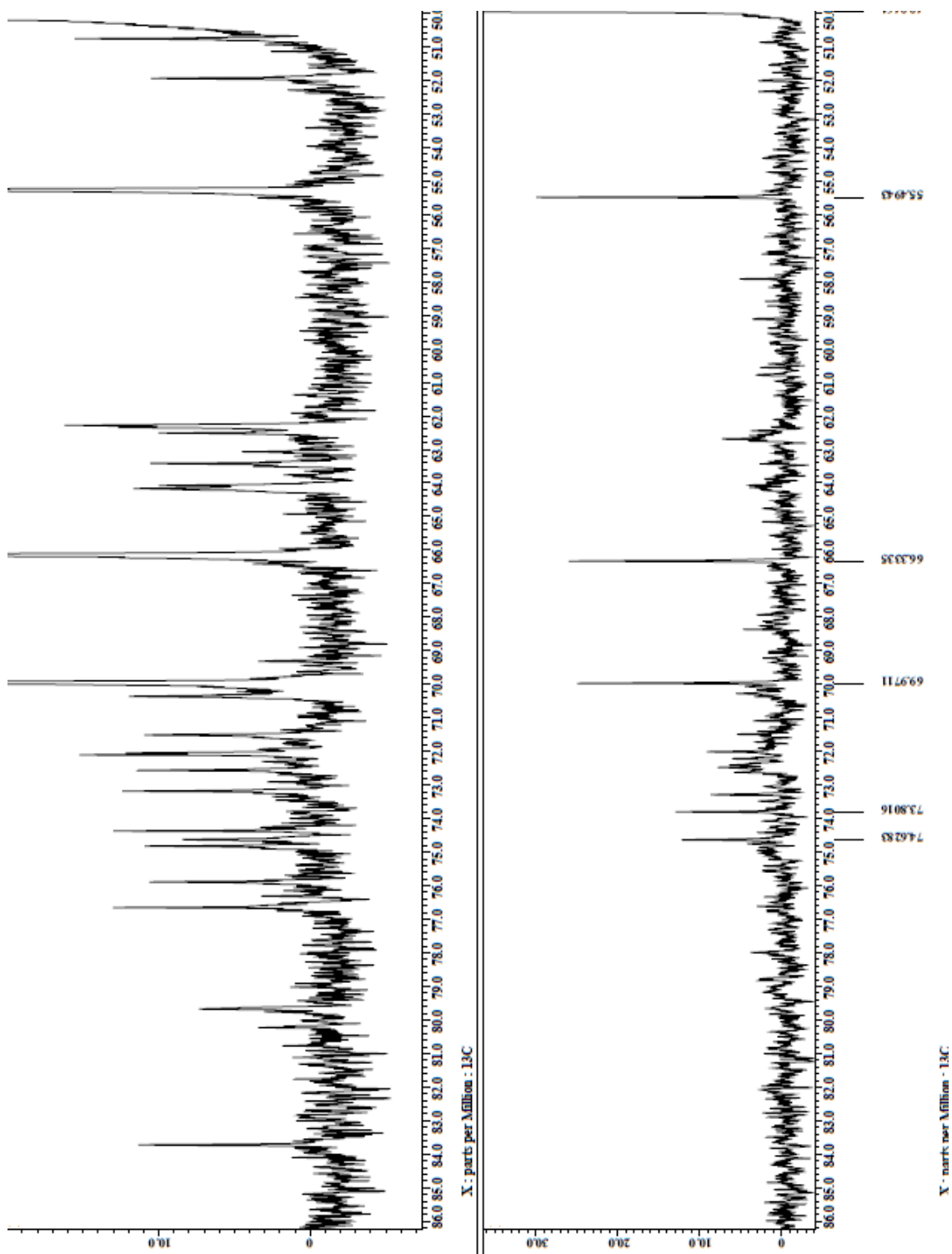
Para determinar si ambas fracciones (EM3 y EM4) tenían alguna similitud, se hizo un análisis comparativo de los espectros de RMN-¹³C. En los espectros 14 y 15 se muestran ambos espectros, en la parte superior el de la fracción EM3 y en la parte inferior el de EM4. Además en la tabla 37 se muestran las señales de RMN-¹³C para ambas fracciones; en la fracción EM4 se han omitido las señales correspondientes al ácido graso presente.

Tabla 37. Cuadro comparativo entre las fracciones EM3 y EM4

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) para EM3	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) para EM4
105,34	95,10
105,10	74,64
93,65	73,81
83,72	73,29
79,67	72,63
76,65	72,48
75,89	72,41
74,82	72,22
74,62	72,02
74,37	71,49
73,19	70,28
72,57	68,37
72,10	62,69
72,05	57,93
71,51	
70,36	
64,17	
64,08	
63,42	
62,35	
62,29	
51,98	
50,60	



Espectro 14. Comparación de RMN- ^{13}C de la fracción EM3 y EM4



Espectro 15. Comparación de RMN- ^{13}C de la fracción EM3 y EM4 (acercamiento)

Detallando ambos espectros, se encontraron señales parecidas en los mismos, sin embargo, existen algunas otras señales presentes en EM4 que no se observaron en EM3. Estas señales en la fracción EM4 son: 95,10 ppm y 68,37 ppm. Curiosamente estas señales son características de ciertos carbohidratos como lixosa y mannososa. Por lo que se realizó una comparación de los desplazamientos químicos de estos carbohidratos (tablas 27, 28,29 y 30) con los observados en esta fracción. Esta comparación esta reportada las tablas 38 y 39.

Tabla 38. Cuadro comparativo entre la α -D-mannosa y la fracción EM4

Pos	Fracción EM4		α - Man	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	95,10	5,10	95,02	4,88
2	73,29	3,03	73,38	3,27
3	72,02	3,49	71,75	3,52
4	71,49	3,46	71,32	3,50
5	68,37	3,61	67,96	3,60
6	62,69	3,59	62,08	3,56

Tabla 39. Cuadro comparativo entre la α -D-lixosa y la fracción EM4

Pos	Fracción EM4		α -Lix	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	95,10	5,10	95,16	4,61
2	72,02	3,49	71,65	3,39
3	71,49	3,61	71,16	3,58
4	68,37	3,57	68,64	3,54
5	62,69	3,46	64,14	3,36

De acuerdo a lo observado en las tablas 38 y 39 es difícil predecir o ratificar cual de estos dos carbohidratos es el que se encuentra presente en la fracción EM4. Sin embargo, dado que para la α -lixosa se observa una diferencia más pequeña en cuanto a los valores de desplazamiento químico se puede inferir que este es el carbohidrato presente.

Para confirmar lo predicho por los datos de RMN se realizó el ensayo de Bial, obteniendo un resultado positivo. De esta manera se pudo inferir que el compuesto presente en EM4 es α -lixosafuranosa. El orcinol solo forma complejos coloreados con pentosas.

alfa-D-lixofuranosa

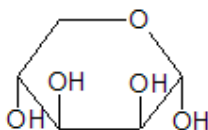


Figura 31. Posible compuesto que forma parte de la fracción EM4

IV.1.4. Discusión de resultados para el ensayo de mortalidad (*Artemia Salina*)

Hay una verdadera necesidad de crear confianza hacia los bioensayos generales los cuales pueden detectar un amplio espectro de actividades farmacológicas en plantas grandes; de manera que, esto pueda ser empleado por químicos del área de productos naturales, para guiar estudios fitoquímicos y de fraccionamiento. ^[34]

Dado que muchas plantas principalmente activas son tóxicas en elevadas dosis, una posible técnica para desarrollar un bioensayo general y efectivo podría ser simplemente visualizar sustancias que sean tóxicas en sistemas zoológicos. Una vez que una sustancia ha sido aislada o sintetizada, una gran cantidad de bioensayos específicos y sofisticados pueden ser empleados. Para este fin se han diseñado bioensayos rápidos, económicos y aplicables en cualquier área, a fin de evaluar rápidamente las fracciones de extractos de plantas fisiológicamente activas, entre ellas tenemos al bioensayo general de *Artemia Salina* que usa como herramienta primordial los huevos de larvas de camarón.

Los huevos de larvas de camarón, ensayo de *Artemia Salina*, pueden ser obtenidos comercialmente a muy bajo costo, además de permanecer en estado seco por muchos años. ^[35]

Este ensayo de mortalidad proporciona un indicio del nivel de toxicidad del material. Se aplicó tanto al crudo CM, como a cada uno de los extracto obtenidos EH, ED, EA y EM. Los resultados mostrados en la tabla 12 indican un índice de toxicidad moderado para el crudo metanólico, el cual va disminuyendo a medida que fueron separados los extractos, es decir, que se puede adjudicar la mayoría de la toxicidad del CM al EH, sin desligar, claramente, la influencia de los otros extractos en la toxicidad de CM. Finalmente, el extracto trabajado en este TEG, el extracto metanol-agua, resultó el menos tóxico de todos.

En cuanto a las fracciones obtenidas no se realizó el ensayo ya que no se contó con suficiente cantidad de material. Una vez obtenidas fracciones parcialmente purificadas es necesario medir el porcentaje de mortalidad en base a varias concentraciones del extracto. Sin embargo, se espera que estas fracciones den resultados muy bajos en cuanto a la toxicidad dada la naturaleza química de las fracciones aisladas, en particular EM3 y EM4 (carbohidratos).

IV.1.5. Discusión de resultados para el ensayo de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa.

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) es una enzima localizada predominantemente en el retículo endoplasmático (RE) del hígado y del riñón y cataliza el paso final tanto de la gluconeogénesis como de la glucólisis, convirtiendo la glucosa-6-fosfato (G-6-P) en glucosa (G) y fosfato inorgánico (Pi) ^[37]

El proceso de inhibición puede llevarse a cabo principalmente en dos sitios, en el transportador T1 (proteína transportadora de sustrato glucosa-6-fosfato), esto va a ocurrir en el caso que se tienen microsomas intactos, donde no se han colocado histonas al medio de reacción. Otro sitio donde se puede llevar a cabo la inhibición es directamente sobre la sub-unidad catalítica (SUC), esto va a ocurrir en el caso donde se tienen microsomas rotos, donde se han colocado histonas al medio de reacción con el fin de obtenerlos.

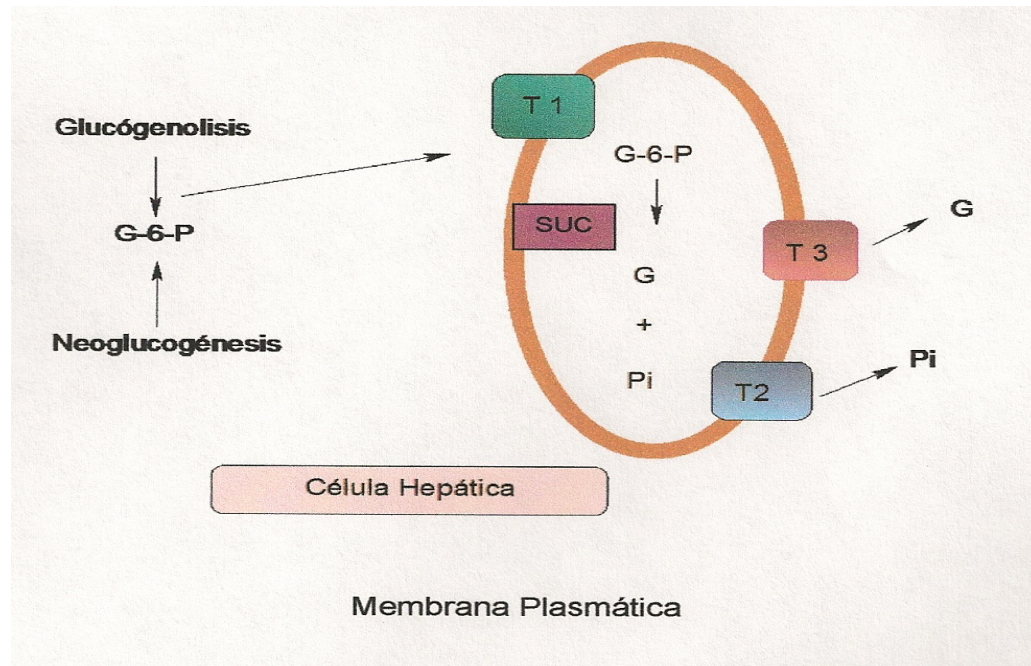


Figura 32. Diagrama esquemático del mecanismo de la glucosa hepática ^[38]

Se les midió la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa al CM, EH, ED, EA y EM, en los cuales de manera general se encontraron resultados importantes. Para el CM la inhibición fue de 77% sin histonas y 64% con histonas, resultados bastante buenos para este tipo de ensayo. Al estudiar la inhibición de cada extracto se observa una variación dependiendo del mismo. En EH se encuentra la mejor inhibición con histonas (60%) en comparación a los subsiguientes extractos. Para ED y EM la inhibición fue intermedia (cerca de 50%). Y con EA se obtuvo la mejor inhibición sin histonas (66%), pero con muy baja inhibición con histonas (17%). Es importante recalcar que el valor más importante es el obtenido con histonas, ya que de esta manera se simula el proceso que rige en el organismo.

Como no se contaba con suficiente cantidad para hacer el ensayo de las fracciones EM1, EM3y EM4 no se reportan datos para los mismos. Sin embargo es importante continuar con este tipo de estudios (inhibición de la glucosa-6-fosfatasa) ya que la diabetes sigue siendo una de las principales afecciones que padece el mundo en el que vivimos

IV.1.6. Discusión de resultados para los ensayos químicos realizados.

Ensayo de ninhidrina

El ensayo con ninhidrina es específico para la identificación de aminoácidos, en el cual el producto de la reacción involucrada la formación de una base de shift o imina. El mecanismo que describe esta reacción es mostrado a continuación:

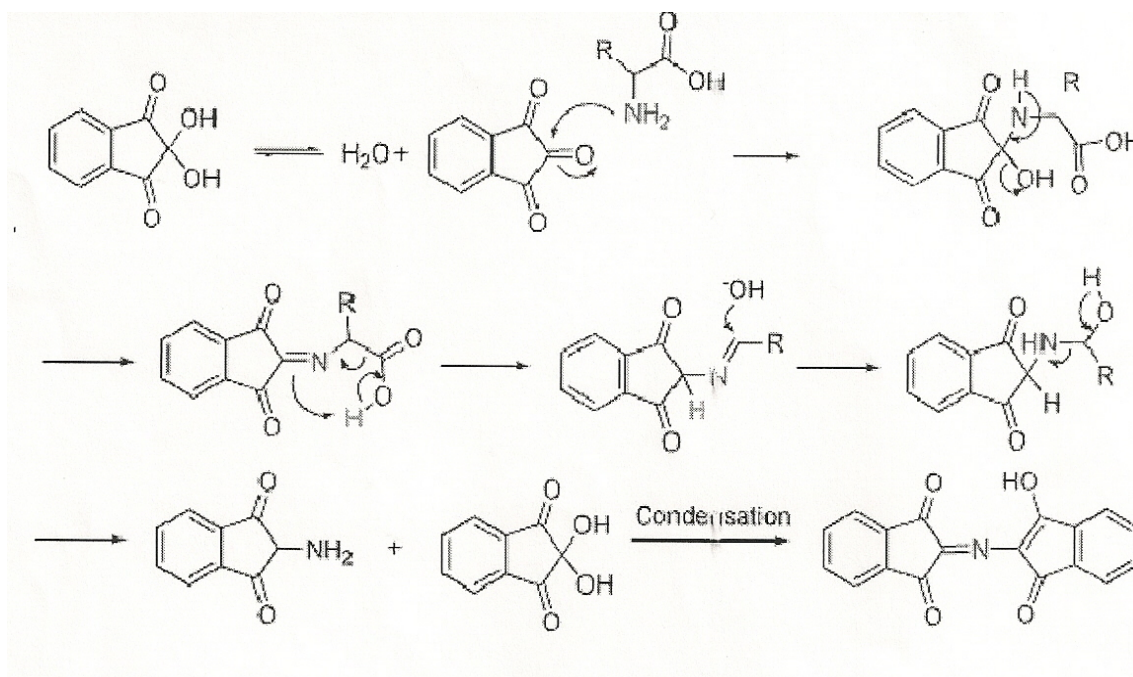


Figura 33. Mecanismo de acción para la reacción con ninhidrina ^[36]

Sin embargo se ha encontrado ^[32] que ciertos carbohidratos pueden reaccionar con este reactivo para dar lo que se conoce como un falso positivo. La diferencia radica en la coloración del ensayo, por lo general en los aminoácidos se obtiene una coloración violeta muy intensa, en cambio en el caso de los carbohidratos la coloración puede ir desde amarillo hasta rosa.

Los carbohidratos que forman compuestos coloreados con ninhidrina son todos aquellos carbohidratos reductores (pentosas y hexosas). Los no reductores como los disacáridos no dan ensayo positivo. El Hidrintantin, el bis-1,3-dicetoindanil

y el ácido ascórbico dan prueba positiva con ninhidrina, esto significa que las reacciones alternativas con ninhidrina existen, y que los compuestos coloreados son formados por la reducción de la ninhidrina.

De esta manera se puede explicar el ensayo positivo con las fracciones EM3 y EM4 debido a la presencia de carbohidratos en las mismas.

Ensayo con α -naftol

Mejor conocida como la prueba de Molish (α -naftol/ H_2SO_4), Se basa en la acción deshidratante hidrolizante del ácido sulfúrico concentrado sobre los carbohidratos. En esta prueba el ácido fuerte cataliza la hidrólisis de cualquier enlace glucosídico presente en la muestra, con una posterior deshidratación a furfural (pentosas) e hidroximetil furfural (hexosas). Estos furfurales se condensan con naftol y dan un producto colorado. Es utilizado como ensayo general para carbohidratos. Por ello se explica el ensayo positivo con la fracción EM3 y EM4, ya que éstos están compuestos por carbohidratos.

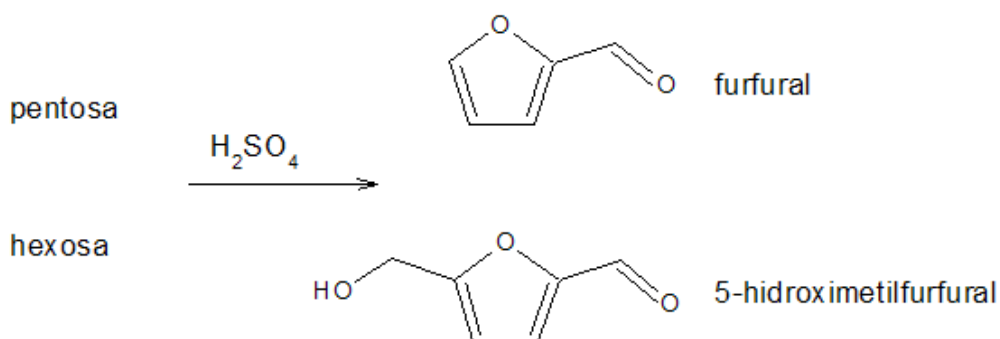


Figura 34. Reacción de pentosas y hexosas en ácido fuerte

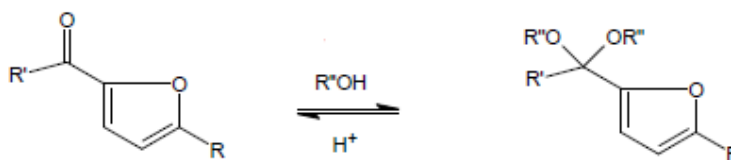
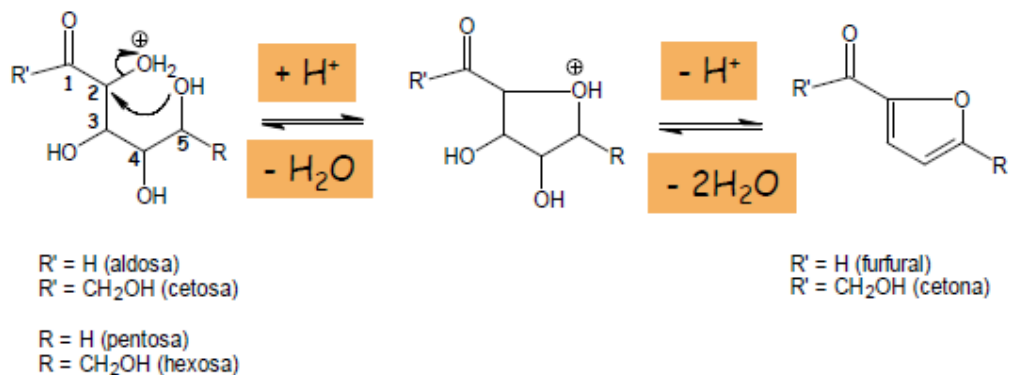
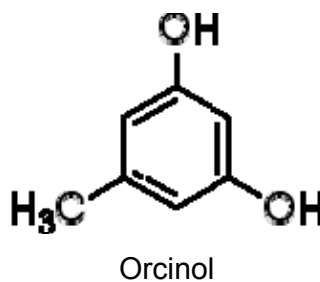


Figura 35. Mecanismo para la formación de complejos coloreados para la reacción con α -nafol.

Ensayo con orcinol

Mejor conocida como el test de Bial (Orcinol/ H_2SO_4), se caracteriza por la presentación, mediante condensación, de un producto de color azulado originado por la reacción del furfural, derivado de la pentosa, en su reacción con HCl y el orcinol. Se trata de una reacción característica tanto de pentosas como de ácidos urónicos. El ensayo positivo solo dió con la fracción EM4, lo que conlleva a que esta fracción está constituida por alguna pentosa.



Reactivo de Benedict ^[40]

Identifica azúcares reductores (aquellos que tienen su OH anomérico libre), como la lactosa, la glucosa, la maltosa, y celobiosa. En soluciones alcalinas, pueden reducir el Cu^{2+} que tiene color azul a Cu^+ , que precipita de la solución alcalina como Cu_2O de color rojo-naranja.

El fundamento de esta reacción radica en que en un medio alcalino, el ion cúprico (otorgado por el sulfato cúprico) es capaz de reducirse por efecto del grupo aldehído del azúcar (CHO) a su forma de Cu^+ . Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso (Cu_2O). El medio alcalino facilita que el azúcar esté de forma lineal, puesto que el azúcar en solución forma un anillo de piranósico o furanósico. Una vez que el azúcar está lineal, su grupo aldehído puede reaccionar con el ion cúprico en solución. En estos ensayos es posible observar que la fructosa (una cetopentosa) es capaz de dar positivo. Esto ocurre por las condiciones en que se realiza la prueba: en un medio alcalino caliente esta cetohexosa se tautomeriza (pasando por un intermediario enólico) a glucosa (que es capaz de reducir al ion cúprico).

Los disacáridos como la sacarosa y la trehalosa, no dan positivo puesto que sus OH anoméricos están siendo utilizados en el enlace glucosídico. En resumen, se habla de azúcares reductores cuando tienen su OH anomérico libre, y éstos son los que dan positivo en la prueba de Benedict.

El ensayo positivo en las fracciones EM3 y EM4 indica que entre sus constituyentes hay monosacáridos.

Reactivo de Fehling ^[40]

El reactivo de Fehling, también conocido como Licor de Fehling, se utiliza como reactivo para la determinación de azúcares reductores. Sirve para demostrar la presencia de glucosa, así como para detectar derivados de esta tales como la sacarosa o la fructosa.

El reactivo de Fehling consiste en dos soluciones acuosas de sulfato de cobre y la Sal de Seignette (Tartrato mixto de Potasio y Sodio), además de NaOH. Ambas soluciones se guardan separadas hasta el momento de su uso para evitar la precipitación del hidróxido de cobre (II).

El ensayo con el reactivo de Fehling se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre (I), que forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor.

Al reaccionar con monosacáridos, se torna verdoso; si lo hace con disacáridos, toma el color del ladrillo.

El ensayo dió verde para las fracciones EM3 y M4 lo que corresponde a la presencia de monosacáridos y la ausencia de disacáridos.

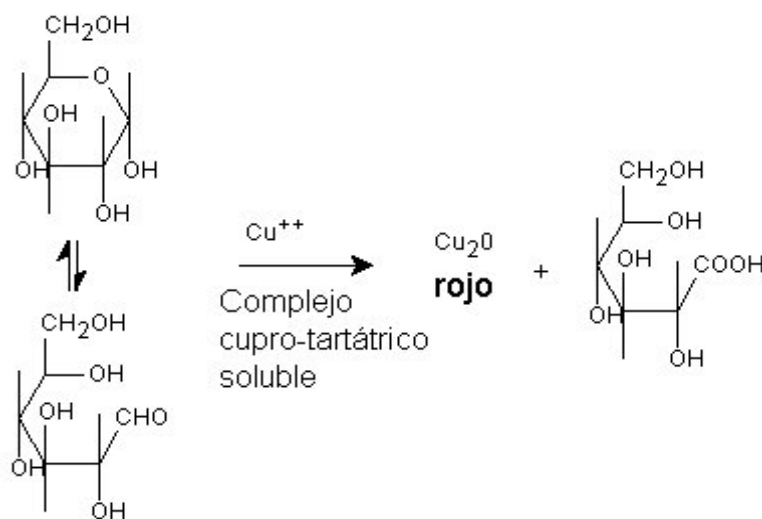


Figura 36. Reacción química de los carbohidratos con complejos de cobre.

CAPITULO V

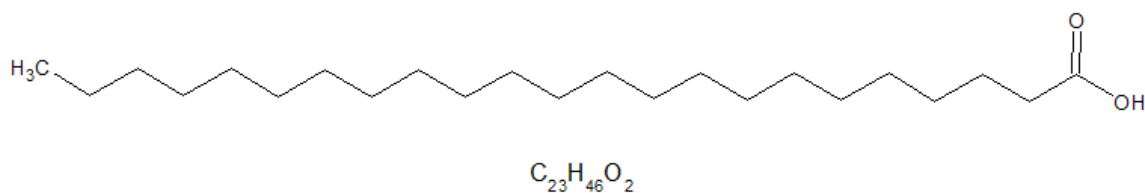
V.1. CONCLUSIONES

La especie *Ulva lactuca* presenta un alto contenido de compuestos polares debido a la masa obtenida en el extracto metanol-agua en comparación a los otros extractos separados.

El extracto estudiado, metanol-agua, presentó una baja toxicidad en cuanto al ensayo de artemia salina (6,7%) y un resultado moderado hacia la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa (sin histonas 48% y con histonas 49%)

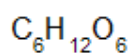
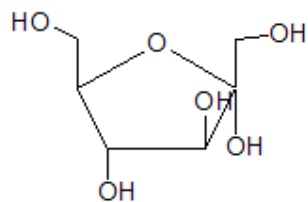
Se aislaron tres fracciones del extracto metanol-agua rotuladas como EM1, EM3 y EM4. Para ninguna de ellas se pudo identificar por completo su estructura, sin embargo se pudo caracterizar algunos datos de las mismas.

- De EM1 se logró identificar un ácido graso como componente principal. En base a la información espectroscópica y espectrométrica se presume que dicho compuesto es:

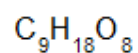
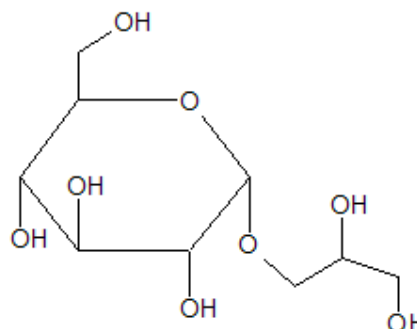


- EM3 se logró caracterizar como la mezcla de dos monosacáridos, uno libre y el otro unido a un glicerol. Usando la data espectroscópica y espectrométrica se identificó que ambos compuestos son hexosas, y en base a análisis comparativos se presume la presencia de:

alfa-D-fructosa

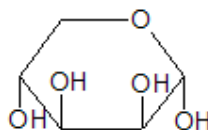


alfa-D-glucosa glicerolada



- En el caso de la fracción EM4, como no se obtuvieron datos satisfactorios en los espectros de RMN y MS, tampoco se pudo identificar los compuestos presentes. Sin embargo, de los pocos datos obtenidos se infirió que dicha fracción esta constituida por carbohidratos, y haciendo un análisis detallado y comparativo con los datos reportados en la literatura y con la fracción EM3, además del ensayo de Bial, se presume que el posible compuesto presente es:

alfa-D-lixofuranosa



V.2. RECOMENDACIONES

Al momento de trabajar con compuestos tan polares como los carbohidratos se recomienda trabajar con sílica en fase inversa para así hacer el trabajo más efectivo.

Seguir estudiando las fracciones restantes del extracto metanol-agua para así aislar compuestos importantes en la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa encontrada en el ensayo inicial.

Realizar el análisis químico de los extractos restantes de la separación inicial (EH, ED y EA) de manera de encontrar algún metabolito importante en la especie *Ulva lactuca*.

Realizar estudios de RMN en dos dimensiones que puedan ayudar a la identificación precisa de las fracciones aisladas (EM1, EM3 y EM4).

V.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Faulkner J.; Fenical W. 2000. Marine Natural Products. Consultado el 29 de marzo de 2008. <http://www.cscg.ucsd.edu>
- [2] Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). Natural Product Reports, 17 (1): 1-6. Febrero 2000. Consultado el 15 de abril del 2008. <http://www.oceansatlas.org/servlet>
- [3] Haefner B. 2003. Drug Discovery Today, 8: 536-544
- [4] a) Lynch S., Cheng C., Yee J. 2006, Ann Pharmacother, 40: 293-300
b) Leon M., Ovimette A., Fiekowsky S., Ellis D. 2004, J. of Pain, 5: 557.
- [5] Luke T., Andrianosolo E., Mcphail K., Flatt P., Gerwich W. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. Molecular Cancer Therapeutics, 4: 333-342
- [6] Paramahamsa. 2005. La importancia de las algas. Consultado el 13 de abril de 2008
<http://www.telefonica.net/web2/paramahamsa/lasalgas.htm>
- [7] Holding B. (Lenntech) 2003. Descripción de las algas y tipos. Consultado el 26 de abril de 2008
<http://www.lenntech.com/espanol/Eutroficacion-de-las-aguas/Algas.htm>
- [8] Lindorf H., Parisca L., Rodríguez P., 1985. Botánica, clasificación, estructura y reproducción, U.C.V. Ediciones de la Biblioteca, Caracas, pp. 99-124.
- [9] Menéndez J. 2004. Ulva lactuca. Consultado el 28 de abril de 2008
<http://www.asturnatura.com/especie/ulva-lactuca.html>

- [10] King H. 1999. Definition, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. World Health Organization. pp. 1-59.
- [11] Garibay M. 2002. Metabolismo de La Glucosa. Consultado el 29 de abril de 2008. <http://201.116.18.153/laciencia/biologia/fisiologia/be3.htm>.
- [12] Burchell A., Waddel I. 1991. The Molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1092: 129-137.
- [13] Gibbons G., Goad L., Goodwin T. 1968. The identification of 28-isofucoesterol in the marine green algae *Enteromorpha intestinalis* y *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*, 7: 983-988.
- [14] Castle M., Blondin G., Nes W. 1963. *Journal American Chemistry Society*, 85: 3306
- [15] Fouad A., Hussein H. 1987. Glycoproteins from *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*, 26 (5): 1447-1448.
- [16] Ivanova V., Rouseva R., Kolarova M., Serkedjieva J., Rachev R., Manolova N. 1994. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. *Preparative Biochemistry*, 24 (2): 83-97.
- [17] Whitfield F., Helidoniotis F., Shaw K., Svoronos D. 1999. Distribution of Bromophenols in Species of Marine Algae from Eastern Australia. *Journal Agric. Food Chem.*, 47: 2367-2373
- [18] Reichelt J., Borowitzka M. 1984. Antimicrobial activity from marine algae: result of a large-scale screening programme. *Hidrobiología*, 116: 158-168.

- [19] Flodin C., Whitfield F. 1999. 4-Hidroxi benzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry*, 51: 249-255.
- [20] Moore C., Okuda R. 1996. *Journal of Natural Toxins*, 5: 295.
- [21] Landymore A., Antia N., Towers G., 1978. *Phycologia*, 17: 319.
- [22] Parodossi G., Cavalieri F., Chiessi E. 2002. A conformation study on the algal polysaccharide ulvan. *Macromolecules*, 35: 6404-6411.
- [23] Kapetanovic R., Sladic D., Popov S., Zlatovic M., Kljajic Z., Gasic M. 2005. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. *J. Serb. Chem. Soc.* 70: 1395-1400.
- [24] Ibrahim A., Mostafa H., Masry H., Naggar M. 2005. Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31 (1): 146-155.
- [25] Orhan L., Sener B., Atici T., Brun R., Perozzo R., Tasdemir D. 2006. Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro actividad antiprotozoal and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. *Phytomedicine*, 13: 388-393.
- [26] Lahaye M., Robic A. 2007. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8 (6): 1765-1774.
- [27] Marcucci O., González-Mujica F., Pérez-Ayuso E. 1988. Alterations of Liver nuclear envelopes accompanying thiacetamine administration in rats. *Acta Cient. Venezolana*, 34: 105-117.

- [28] Lowry O., RosebrougH H., Farr A., Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 209-220.
- [29] Markwell M., Hass S., Bieber L., Tolbert N. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample. *Analytical Biochemistry*, 87: 206-210.
- [30] William B., Wilson K. 1981. *Principios y técnicas de Bioquímica*. Editorial Omega, Barcelona.
- [31] Fontaine M., Bonilla J. 1978. Composición química de Macroalgas Marinas representativas del Edo. Sucre, Venezuela, *Bol. Inst. Univ. Oriente*, 17: 35-54
- [32] Nielsen H. 1972. Occurrence of Ninhydrin-Positive Carbohydrates in Thin-Layer Chromatograms of Urinary Amino Acids, Dept. of Clinical Chemistry, Sundby Hospital, Denmark. 213-215
- [33] Kotiguda G., Peterbauer T., Mulimani V. 2006. Isolation and estructural analysis of ajugose from *Vigna mungo* L, *Carbohydrate Research*, 341: 2156-2160.
- [34] Mojica E., Micor J. 2007. Bioactivity Study of *Barringtonia asiatica* (Linnaeus) Kurz. Seed Aqueous Extract in *Artemia Salina*. *International Journal of Botany*, 3 (3): 325-328.
- [35] Meyer B., Ferrigni N., Putnam J., Jacobsen L., Nichols D., McLaughlin J. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*. 45: 31-34
- [36] Villanueva H. *Análisis espectrofotométrico de Aminoácidos y Proteínas*. Univ. Interamericana de Puerto Rico, *Bioquímica*. 1-6

- [37] McCormack J., Westergard N., Kristiansen M., Brand C., Lau J. 2001. Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 7: 1451-1474.
- [38] Burchell A., Hume R., Burchell B. 1998. A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. *Clinical Chemical Acta*. 173: 183-192.
- [39] Silverstein. *Spectroscopy Chemistry NMR FTIR MS. Mass Spectrometry*. Chapter 2. 15-17.
- [40] Ege S. 2000. *Química Orgánica: Reacciones de oxidación de azúcares*, editorial Reverte. 1164-1166

V.4. AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por siempre iluminar mi camino y por tener la fe necesaria para superar todos los obstáculos que se me han presentado.

A mi madre, María Fernanda Peña, por ser la mejor madre del mundo. Por guiarme a lo largo de mi vida y por enseñarme todos los valores necesarios para ser una buena persona. Por ser mi más fiel compañera y por siempre luchar por mi bienestar. A mi familia, en especial a mis tíos y tías, gracias a su ayuda y apoyo he conseguido muchos éxitos, principalmente ser licenciado. Y a mi prima Jhoserne Perdomo, por ser una gran amiga, por su gran apoyo y aceptación.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, máxima casa de estudios en el país.

A mi tutora, Prof. Ivette Piña, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Química del Mar y por su paciencia durante la realización de éste trabajo.

A mis jurados, Prof. Beatriz Vera y Prof. Gustavo Cabrera, por asumir un rol crítico y objetivo ante la realización de éste trabajo.

A todos los profesores que me guiaron por la enseñanza de la química, que me hicieron crecer académica y profesionalmente, Prof. Nancy Prieto, Prof. María Antonieta Ranaudo, Prof. Masahisa Hasewaga, Prof. Tania Córdova, Prof. Alberto Fernández, Prof. Rosa Amaro, Prof. Luis Gómez, Prof. Gustavo Pérez, Prof. Nereida Carrión, Prof. Carlos China.

A la Prof. Mary Lorena Araujo, por ser como una madre para mí, por su gran apoyo y por su gran cariño.

En especial al Prof. Gustavo Cabrera, por ser la persona que más me enseñó Química Orgánica, por su gran paciencia y apoyo en la realización de este trabajo. Por sus inigualables consejos que llevaré por siempre y por ser aparte de un gran profesor un gran amigo.

A todas las personas que conocí desde los principios de mi carrera: Kimberly China, Kamal Nasser, Daniela Kanzler, Luciano Marsella y muchos otros. Fue un gusto haberlos conocido.

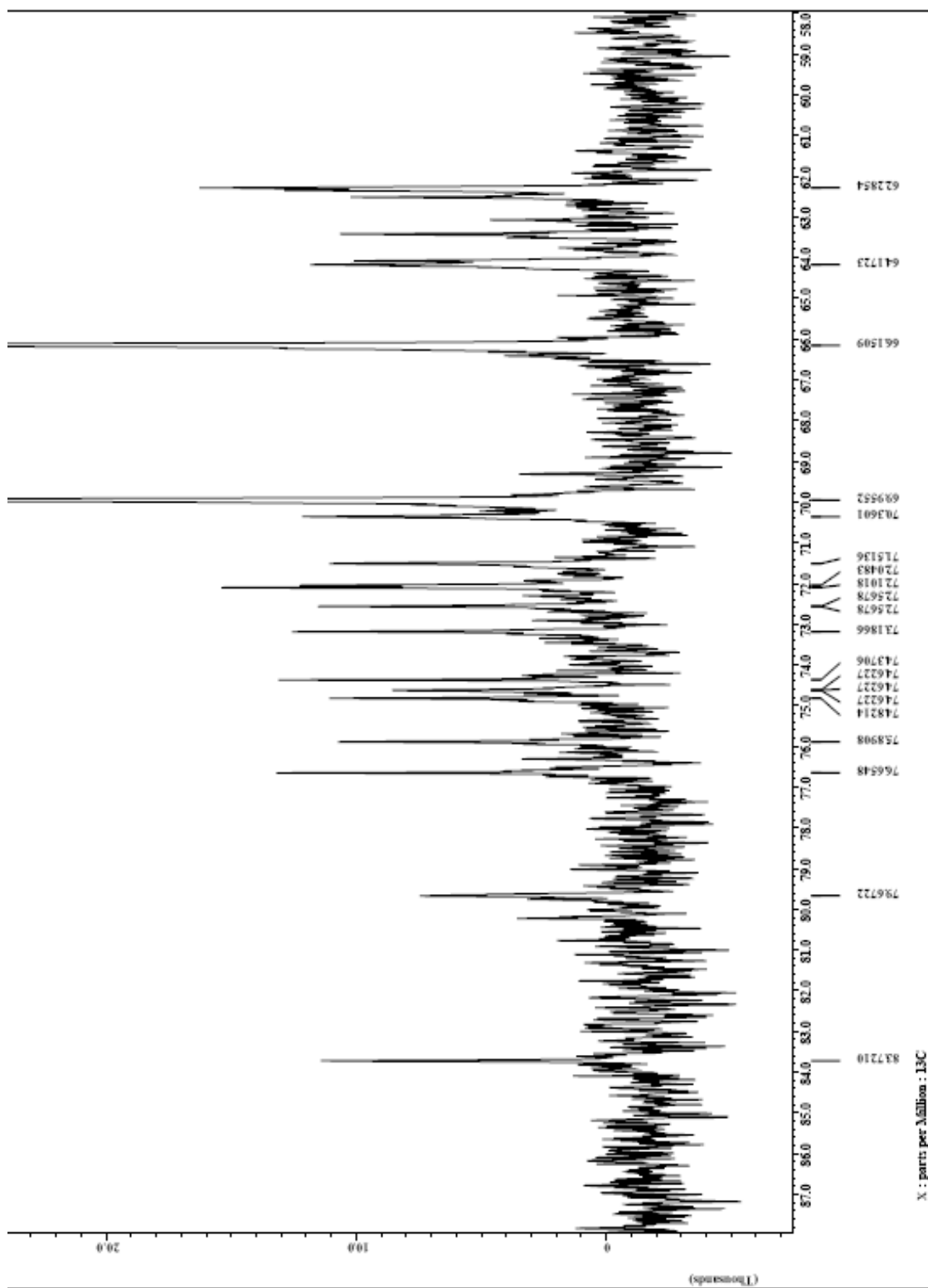
A mis amigos de siempre, Cristian Gómez, Vanessa García, Janeth Gadea y Andrea Herrero, por ser parte de mi vida desde hace muchos años, por su gran amistad y su apoyo incondicional.

A mis amigos. En especial, a Joel Medina, por ser un gran amigo y por su compañía incondicional. A Patricia Guevara (mi Paty), por ser mi amiga de toda la carrera, por su gran lealtad y por sus enseñanzas. A Karina Benavides (ami), por su una persona muy confiable, por sus atenciones y buenos consejos. A Gabriella Díaz (mi Gaby), por su maravillosa bondad, por siempre estar ahí en todo momento. A Emmely Pérez (emi), por su humildad, por su gran apoyo y por siempre querer lo mejor para mi. A Rohany Flores, por su gran carisma y su maravillosa compañía. En general gracias por aceptarme, los quiero.

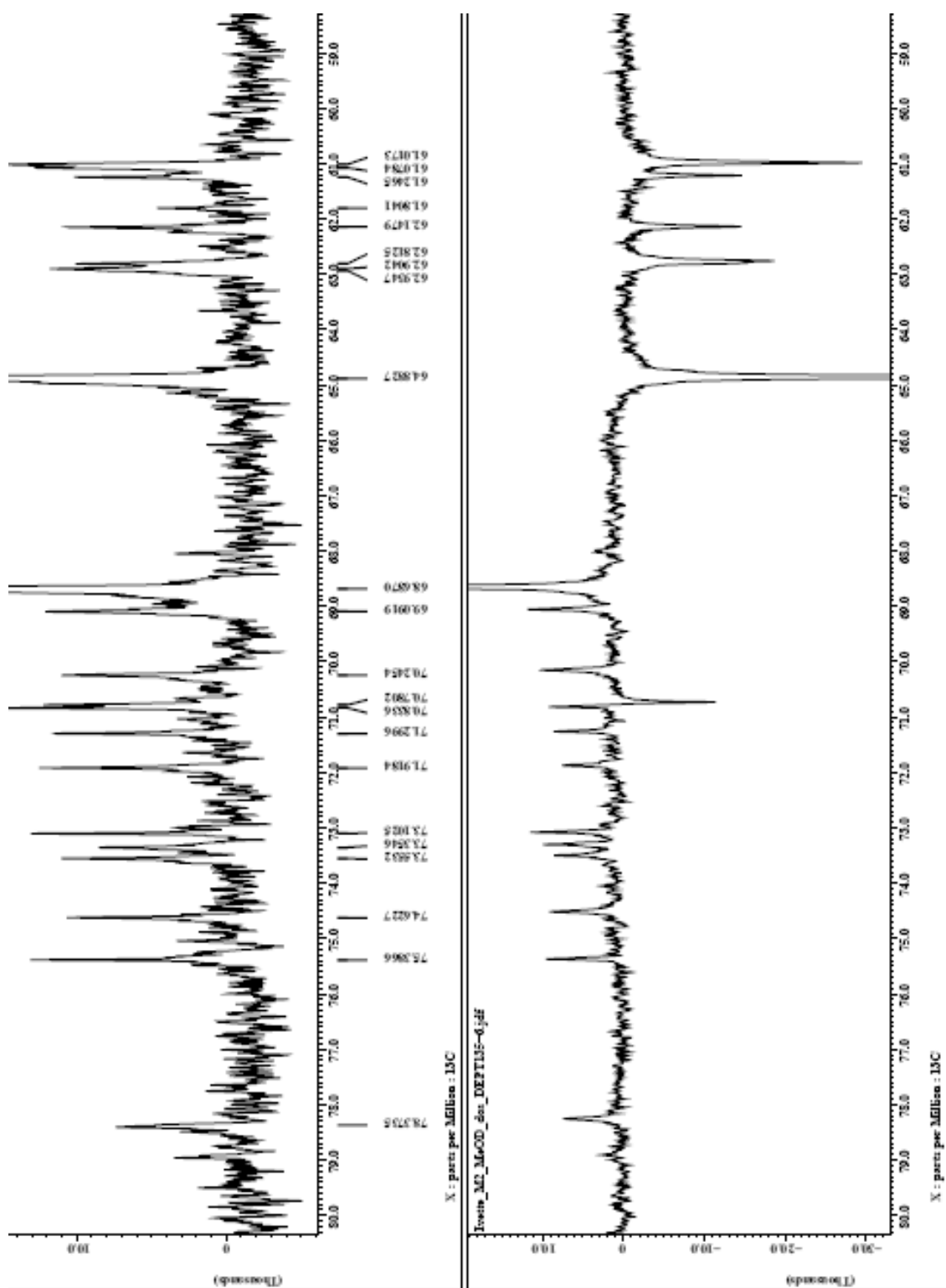
En general a todos,
Muchas Gracias.

Daniel Arismendi

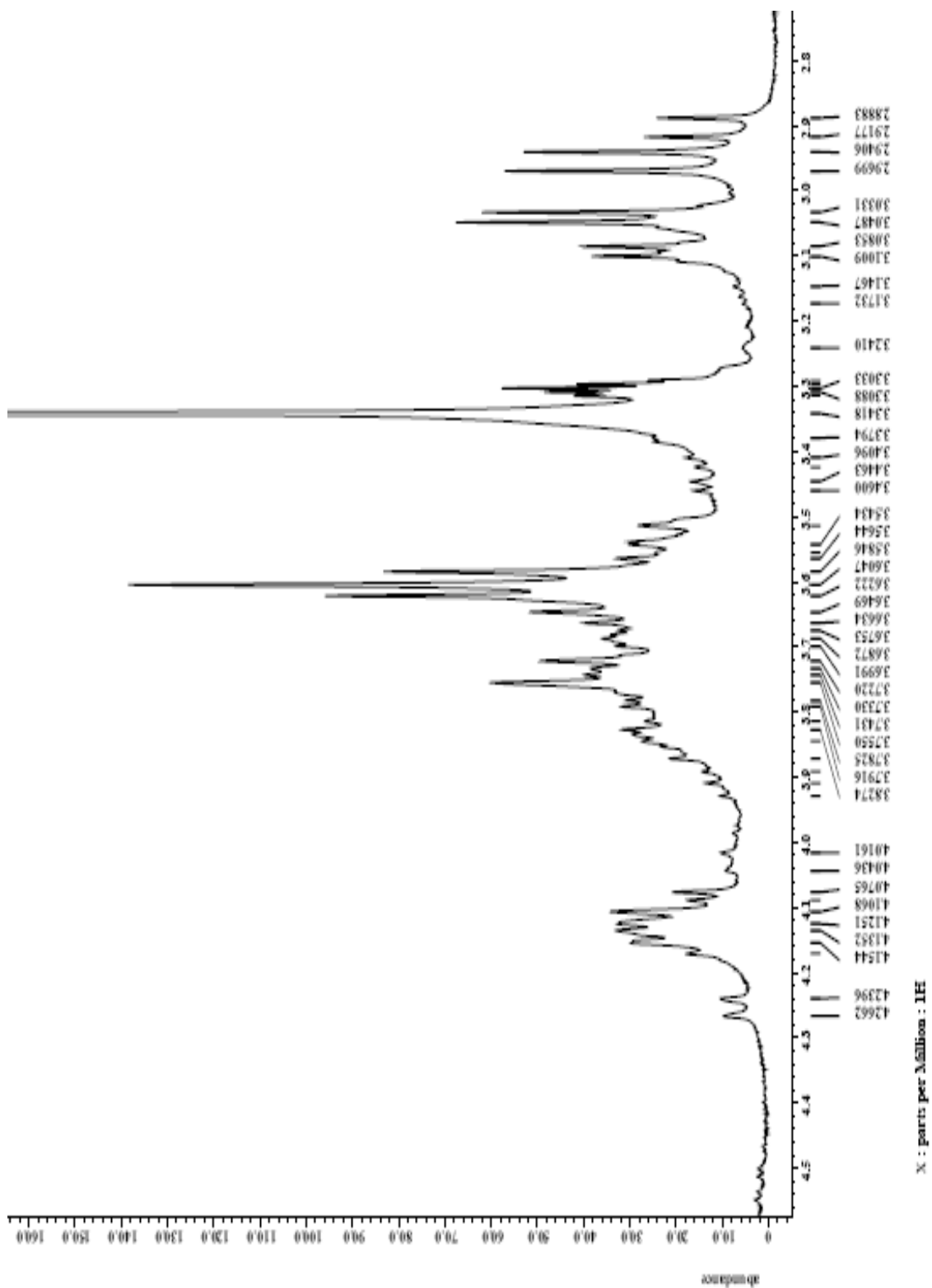
V.5. ANEXOS



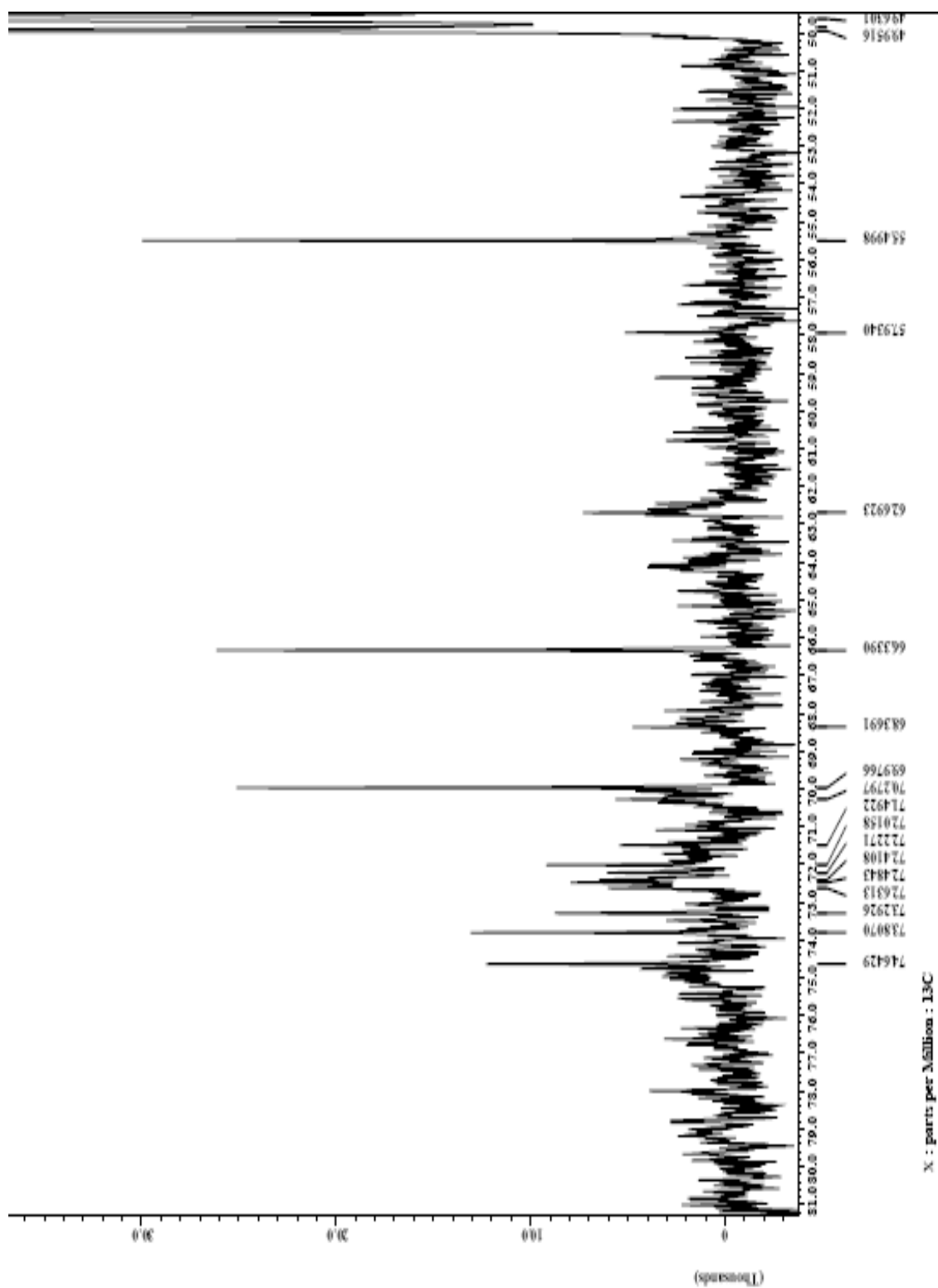
Espectro 16. RMN- ^{13}C de la fracción EM3 (acercamiento)



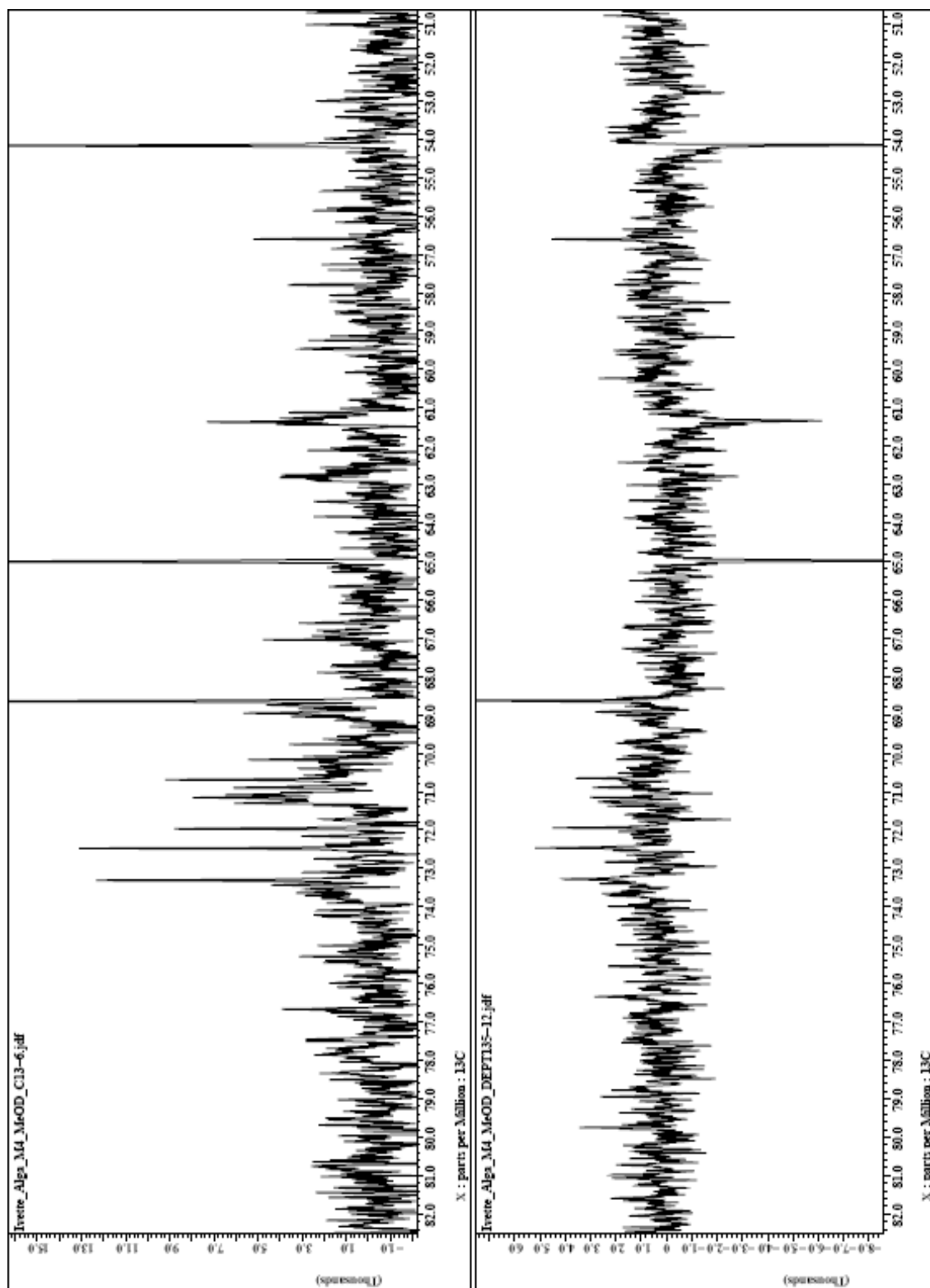
Espectro 17. RMN- ^{13}C y DEPT de la fracción EM3 (acercamiento)



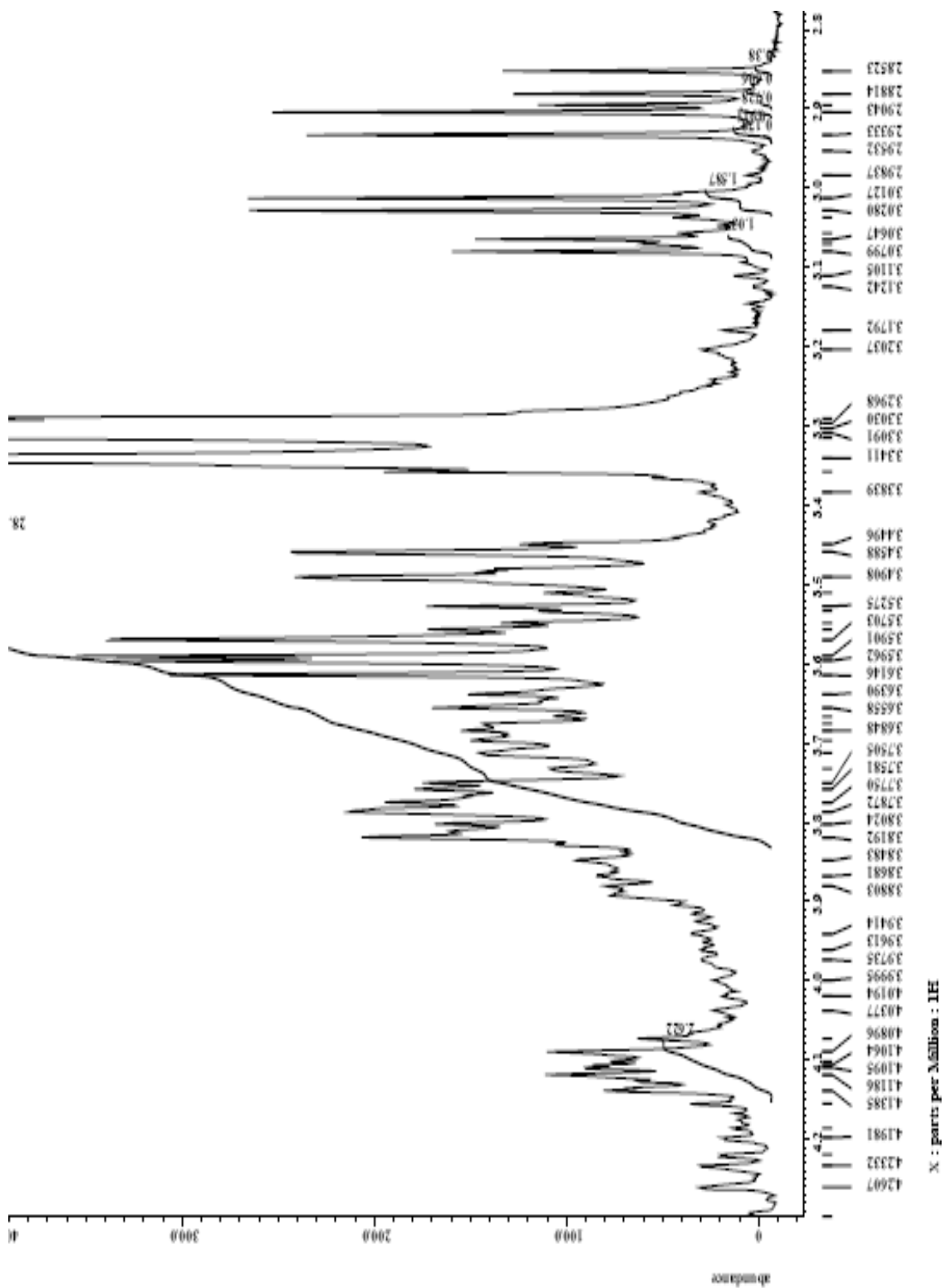
Espectro 18. RMN-¹H de la fracción EM3 (acercamiento)



Espectro 19. RMN- ^{13}C y DEPT de la fracción EM4 (acercamiento)



Espectro 20. RMN- ^{13}C y DEPT de la fracción EM4 (acercamiento)



Espectro 21. RMN-¹H de la fracción EM4 (acercamiento)