

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Gymnogongrus tenuis* Y ESTUDIOS
PRELIMINARES DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANÓLICO EN EL
MODELO DE PEZ CEBRA *Danio rerio***

Trabajo Especial de
Grado presentado ante la
Ilustre Universidad Central
de Venezuela, por la Br.
Victoria Eugenia García
Pérez, para optar al título
de Licenciada en Química,

Caracas, Octubre 2017

Nosotras, Dra. Dilsia J. Canelón, Investigadora de la Cátedra de Química de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela y Dra. María Rodríguez, Investigadora del Laboratorio Productos Naturales de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, certificamos que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Gymnogongrus tenuis* Y ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANÓLICO EN EL MODELO DE PEZ CEBRA *Danio rerio*”

Que presenta la Br. Victoria García, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos de la Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2016-2017, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Octubre de 2017



Dra. Dilsia J. Canelón



Dra. María Rodríguez

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "Metabolitos secundarios de *Gymnogongrus tenuis* y estudios preliminares de la toxicidad aguda del extracto metanólico en el modelo de Pez Cebra *Danio rerio*". Presentado por la Br. Victoria Eugenia García Pérez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios, para optar por el título de Licenciado de Química.



Dra. Dilsia J. Canelón



Dra. María Rodríguez



Dra. Beth Díaz



Dr. Jairo Bermúdez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por las inmensas oportunidades que me ha dado en la vida. Por darme la fortaleza y fe necesarias para cumplir mis metas y seguir su camino. Por darme la paciencia y perseverancia suficientes para lograr lo que me propongo.

A mis padres, por ser el mejor ejemplo de vida que tengo. Por darme su amor incondicional, los regañones necesarios y los abrazos constantes que me han hecho la persona que soy hoy en día.

A mi familia, por ser mi gran soporte; mis abuelos, tíos y primos que hacen de mi vida el mejor de los caminos.

A la familia que me regalo Dios en el camino, Isa, Gena, Maja, Pao, Andre, Luisma, Kris, Eme, Patty y los que puedan quedarme sin nombrar. Por su cariño, consejo, hombros y abrazos; mi vida no sería lo mismo sin ustedes.

A la UCV y la Facultad de Ciencias, por enseñarme valiosas lecciones de vida, además de solo teoría “química”.

A los amigos que me regalo la universidad, que hicieron de un camino duro uno de los más divertidos.

A la profesora Fátima Torrico, por creer en mí y brindarme su enorme apoyo. Esto no hubiera sido posible sin usted.

A la profesora Dilsia, por ayudarme a cumplir este proyecto.

A Rodrigo Rodríguez, por ayudarme en esta tesis siempre con la mejor disposición.

A la profesora María Rodríguez, al Profesor Marco Alvarez, la licenciada Ligia Llovera y todos aquellos profesores que me brindaron su mano y esfuerzo para cumplir esta meta.

RESUMEN

El estudio de los productos naturales marinos ha crecido significativamente en los últimos años. Biólogos y químicos en todo el mundo dirigen investigaciones orientadas a la búsqueda de moléculas biológicamente activas. En las costas de Venezuela habitan abundantes especies de algas marinas que aún no han sido investigadas. El presente trabajo presenta los resultados alcanzados al investigar los metabolitos secundarios del alga *Gymnogongrus tenuis*, así como del estudio preliminar de la toxicidad aguda de dicho extracto en el modelo de pez cebra *Danio rerio*.

El estudio fitoquímico del alga *G. tenuis*, recolectada en La Guaira, estado Vargas, resultó en la identificación de los siguientes compuestos: colesterol, fucosterol y ácido palmítico, aislados de la fracción de hexano; y floridósido, aislado de la fracción hidrometanólica. La literatura disponible a la fecha, ha reportado, solamente, el colesterol y el fucosterol para algunas especies del género *Gymnogongrus*, pero no para *G. tenuis*, por lo cual los compuestos obtenidos en la presente investigación son reportados por primera vez para esta especie

El estudio preliminar de la toxicidad aguda del extracto metanólico del alga investigada, realizada a través modelo de pez cebra *Danio rerio*, reporta que a las concentraciones utilizadas de dicho extracto (100, 75, 50 y 25 µg/mL) no hubo letalidad, se observó, además, efecto tóxico: deformación de la región cráneo facial y alteración de la locomoción de las larvas estudiadas. En un estudio complementario, se utilizó calceína y se obtuvo que las larvas de 5dpf, cinco días post fecundación, tratadas con el extracto metanólico del alga *G. tenuis* (100, 75, 50 y 25 µg/mL) poseyeron una disminución del 80,2% en su densidad ósea en comparación con el control; lo cual es consistente con los efectos tóxicos apreciados.

Palabras clave: *Gymnogongrus tenuis*, floridósido, *Danio rerio*, toxicidad aguda, calcio.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	12
1.1	Algas	14
1.2	Especie: <i>Gymnogongrus tenuis</i>	24
1.3	Técnicas de Extracción y Separación.....	28
1.4	Toxicología.....	32
1.5	Ensayos Preclínicos	34
2.	ANTECEDENTES.....	37
2.1	Estudios realizados en algas.....	37
2.2	<i>Gymnogongrus</i>	39
	<i>Gymnogongrus griffithsiae</i>	41
	<i>Gymnogongrus torulosus</i>	42
	<i>Gymnogongrus tenuis</i>	44
2.3	Modelo de Pez Cebra <i>Danio rerio</i>	45
3.	JUSTIFICACIÓN.....	49
4.	OBJETIVOS.....	50
4.1	Objetivos Generales.....	50
4.2	Objetivos Específicos	50
5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	51
5.1	Materiales, equipos y reactivos	51
5.2	Obtención del alga <i>Gymnogongrus tenuis</i>	54

5.3	Aislamiento e identificación de los metabolitos	55
5.4	Modelo de Pez cebra.....	67
6.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	70
6.1	Elucidación de los compuestos aislados.....	70
6.2	Ensayo de toxicidad aguda, modelo larvario <i>Danio rerio</i>	96
7.	CONCLUSIONES	104
8.	RECOMENDACIONES.....	106
	Bibliografía.....	107

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^{13}C y DEPT 135 del Compuesto I.	71
Espectro 2. RMN ^1H , Compuesto I.	72
Espectro 3. Espectro de masas del Compuesto I.....	75
Espectro 4. RMN ^{13}C y DEPT 135 del Compuesto II.	77
Espectro 5. RMN ^1H , Compuesto II.	78
Espectro 6. Espectro de masas del Ácido Palmítico.	83
Espectro 7. Espectro de masas del Colesterol.....	84
Espectro 8. Espectro de masas del Fucosterol.	85
Espectro 9. RMN ^{13}C y DEPT 135 del Compuesto III.	87
Espectro 10. RMN ^1H , Compuesto III.	88
Espectro 11. RMN ^1H Ampliación, Compuesto III.	88
Espectro 12. RMN HMQC, Compuesto III.	89
Espectro 13. RMN HMQC, Ampliación, Compuesto III.	90
Espectro 14. RMN HMBC, Compuesto III.....	91
Espectro 15. RMN HMBC, Ampliación, Compuesto III.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo primario y secundario	16
Figura 2. <i>Gymnogongrus tenuis</i>	26
Figura 3. Anatomía <i>Gymnogongrus tenuis</i>	27
Figura 4. Equilibrio dinámico de adsorción.....	31
Figura 5. Zona de recolección del alga <i>Gymnogongrus tenuis</i>	54
Figura 6. Procedimiento experimental para aislamiento de compuestos mayoritarios.	56
Figura 7. Procedimiento experimental para obtención de la fracción GtAL.....	62
Figura 8. Cromatograma del Compuesto II.	82
Figura 9. Correlaciones a dos enlaces, Floridósido	93
Figura 10. Frecuencia cardíaca, Latidos por minuto de larvas expuestas a solución (100 µg/mL) en 60 min	97
Figura 11. Larvas de pez cebra <i>Danio rerio</i> 5dpf expuestas a soluciones de diferentes concentraciones del extracto metanólico de <i>G. tenuis</i>	98
Figura 12. Densidad ósea de larvas <i>Danio rerio</i> 5dpf tratadas con extracto metanólico de <i>G. tenuis</i> y expuestas a calceína, y un osteo-grama que representa la densidad ósea en larvas controles y tratadas con el extracto metanólico de la especie.	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Masa de las fracciones obtenidos del alga <i>Gymnogongrus tenuis</i>	57
Tabla 2. Masa de las fracciones obtenidas de la columna Carbón activado-Celita de la fracción de Hexano.	58
Tabla 3. Masa de las fracciones obtenidas de la CC fase normal de GtHFC.	59
Tabla 4. Masa de las fracciones obtenidas de la columna Carbón activado-Celita de la fracción de Diclorometano.	60
Tabla 5. Masa de las fracciones obtenidas de la CC fase normal de GtD.	61
Tabla 6. Masa de las fracciones obtenidas de la sephadex LH-20 de GtAL.	63
Tabla 7. Masa de las fracciones de la CC fase reversa RP18 de GtAL β	64
Tabla 8. Masa de las fracciones de la CC fase reversa RP18 de GtAL γ	64
Tabla 9. Masa de las fracciones de la CC fase reversa RP18 de GtAL.	65
Tabla 10. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Compuesto I.....	73
Tabla 11. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Compuesto I.	74
Tabla 12. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Fucosterol.	79
Tabla 13. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Fucosterol.....	80
Tabla 14. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Ácido Palmítico.	81
Tabla 15. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Ácido Palmítico.....	81
Tabla 16. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Compuesto III.....	93
Tabla 17. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Compuesto III.	94
Tabla 18. Cambios observables en larvas expuestas a solución (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 60 min.	96

LISTA DE ABREVIATURAS (ACRÓNIMOS) Y SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía capa fina
CC	Cromatografía en columna
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización)
D₂O	Agua deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
dpf	Días post fecundación
Exp	Experimental
H₂O	Agua
Hex	Hexano
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
Mult	Multiplicidad
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones

1. INTRODUCCIÓN

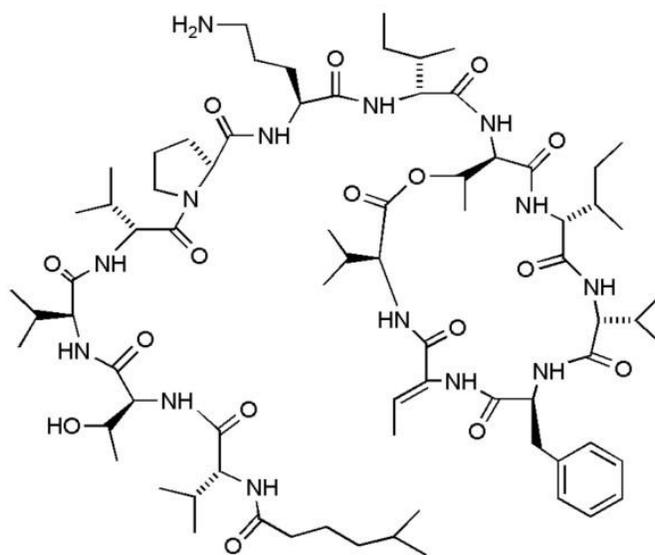
En 1928, se realizó el descubrimiento de la penicilina, lo que condujo a un incremento en la búsqueda de otros antibióticos a partir de organismos terrestres. La investigación científica se centró durante muchos años en plantas y microorganismos, posteriormente centrandó su interés en el mar¹. En los últimos cincuenta años la investigación científica en productos naturales marinos ha crecido significativamente².

La vida dio su inicio en los océanos; al menos tres cuartas partes de la superficie terrestre están cubiertas por agua, lo que significa una innumerable cantidad de organismos, con una abundante biodiversidad, que habitan las profundidades oceánicas. La evolución de los organismos marinos ha permitido la formación de moléculas que poseen un gran interés biológico; por ejemplo, las sustancias químicas que producen muchos organismos que no poseen defensas físicas, como conchas o espinas, y les permiten defenderse de sus depredadores¹. En general, los compuestos químicos que dichos organismos utilizan para comunicarse e interactuar entre sí, pueden ser altamente complejos y poseer grandes pesos moleculares, siempre y cuando posean una adecuada solubilidad en agua. Considerando la compleja cadena alimenticia, y la alta competencia entre los seres vivos de estos ambientes, no es de sorprenderse que los organismos marinos produzcan un amplio rango de moléculas con diversas actividades biológicas (antibacterianas, antifúngicas, antivirales, entre otras)².

Numerosas publicaciones han reportado propiedades biológicas de moléculas extraídas de algas, constituyendo así una amplia oferta de potenciales fármacos. Bhakuni y colaboradores, indicaron que para el 2005, más de 6.800 publicaciones reportaron aproximadamente 16.000 productos naturales aislados de organismos marinos². En el caso particular de las algas marinas, las publicaciones indican que la posible actividad biológica de sus metabolitos, dependerá del grupo al que pertenece la

especie (verdes, rojas o pardas), temporada del año o ubicación geográfica donde fue recolectada³.

Un ejemplo de un compuesto químico aislado de un alga es el Kahalalido F que es un depsipéptido cíclico producido por las algas del género *Bryopsis*, y que se encuentra en la fase IIⁱ de estudio clínico para la indicación del cáncer de próstata. Este compuesto ya fue patentado, sin embargo, es extraído más fácilmente de la babosa *Elyisia rufescens*, que es una fuente más adecuada, ya que del alga se obtienen cantidades muy pequeñas (5 mg de cada 3 Kg de algas); esta babosa se alimenta de algas y concentra el compuesto¹.



Kahalalido F

La búsqueda de compuestos biológicamente activos continúa, el mar provee infinidad de posibles nuevos medicamentos. En esta investigación se centró su atención en moléculas químicas aisladas de algas, más específicamente, del alga *Gymnogongrus tenuis* y la posible toxicidad aguda estudiada preliminarmente en el modelo de pez cebra *Danio rerio*.

ⁱ Existen cuatro fases en el período de estudio clínico

1.1 Algas

Taxonómicamente el término alga se utiliza para indicar un grupo polifilético; es decir, que incluye organismos que no comparten un origen común, pero siguen múltiples e independientes líneas evolutivas, no cohesivas y artificiales de organismos fotosintéticos⁴. Las algas son organismos simples que pueden ser unicelulares o pluricelulares. Presentan también una amplia variación desde un punto de vista morfológico y reproductivo⁵.

En general, el grupo denominado algas abarca varias familias filogenéticamente independientes. La clasificación de estos organismos protistasⁱⁱ ha resultado altamente compleja, debido a la diversidad de sus características. La investigación genética y ultraestructural ha llevado a dicha clasificación a constante revisión. Un esquema tentativo de clasificación basado principalmente en la investigación de Van Den Hoek et al., (1995), y comparado con la clasificación realizada por Bold y Wynne (1978), Margulis et al., (1990), Graham y Wilcox (2000), y South y Whittick (1987), fue utilizado en este trabajo. Los miembros procariotasⁱⁱⁱ pertenecientes a este grupo polifilético, se pueden agrupar en dos divisiones: Cyanobacteria y Prochlorophyta o Prochlorales. Los miembros eucariotas^{iv} se agrupan en 9 divisiones: Glaucophytas, Rhodophytas o algas rojas, Heterokontophyta o algas pardas, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta o dinoflagelados, Euglenophyta o euglenoideos, Chlorarachniophyta y Chlorophyta o algas verdes⁴.

En particular, las algas del grupo Rhodophyta, al que pertenece el alga *Gymnogongrus tenuis*⁶, se caracterizan por talos relativamente complejos,

ⁱⁱ Reino protista: aquellos que pertenecen al reino de organismos eucariontes que no pueden clasificarse dentro del reino animal, vegetal o fungi.

ⁱⁱⁱ Procariota: organismo que carece de un verdadero núcleo cerrado y sus plastos tienen una estructura particular.

^{iv} Eucariota: organismo celular provisto de núcleos genuinos.

multicelulares, con la excepción del primitivo grupo de las protoflorídeas que son unicelulares y coloniales. Las algas rojas, poseen una organización más diferenciada que las algas verdes y se distinguen primordialmente por su reproducción sexual, aunque también son capaces de reproducirse asexualmente. La mayoría de las algas rojas son marinas, con excepción de unas pocas especies que viven en agua dulce. Cada célula contiene varios cromoplastos laminados o discoidales, situados en la capa periférica del citoplasma. La clorofila a, está presente y generalizada en todo el grupo, y el β -caroteno es el principal de los pigmentos carotenoides. Las distintas formas ecológicas de una misma especie, pueden mostrar variadas tonalidades según la cantidad de pigmentos ficocromoproteidos, como la ficoeritrina (rojo) y ficocianina (azul), que combinados con la clorofila y carotenos originan la tonalidad rojiza de este grupo de algas⁴.

Las algas habitan en un ecosistema complejo y fluctuante, en donde el crecimiento, desarrollo, reproducción y productividad se ven afectados por cambios en la temperatura, humedad, salinidad, radiación, disponibilidad de nutrientes e interacciones entre los organismos vivos de dicho ecosistema. Debido a esto, las algas son capaces de sobrevivir en ambientes en constante cambio producto de una serie compleja de cadenas metabólicas, que les permiten responder y adaptarse a las nuevas condiciones⁷.

En general, los organismos vivos realizan, a nivel celular, un conjunto de reacciones químicas para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples o para degradar sustancias complejas y obtener las simples; a este proceso se le llama metabolismo. Los organismos autótrofos^v, específicamente las algas, utilizan la mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía obtenida para producir moléculas necesarias para su funcionamiento; es decir, para realizar los procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas,

^v Autótrofos: organismos que son capaces de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas.

carbohidratos o lípidos. Los compuestos resultantes del metabolismo primario son, por ejemplo: los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos. La Figura 1 muestra un esquema sencillo de dicho metabolismo⁸.

Estos compuestos están presentes en todas las algas y siempre desempeñan las mismas funciones, a estos se les denomina metabolitos primarios⁸.

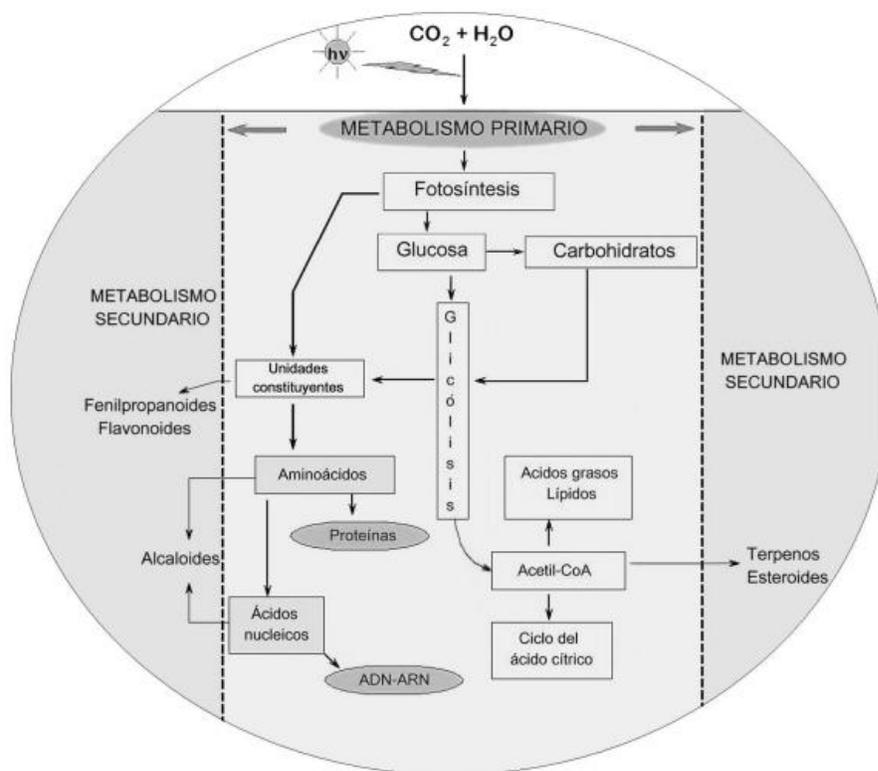


Figura 1. Metabolismo primario y secundario⁸

Además del metabolismo primario, los organismos autótrofos destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía obtenida, en un metabolismo secundario que permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados de dicho metabolismo se denominan

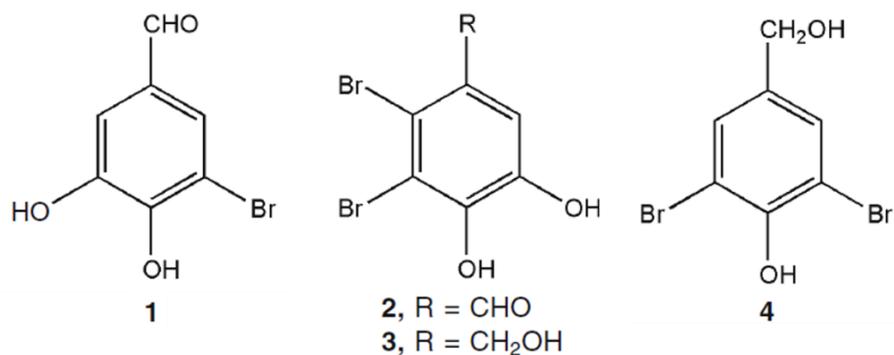
metabolitos secundarios; los cuales se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales⁸.

Los metabolitos secundarios, además de no presentar una función definida en procesos como la fotosíntesis, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida; es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todas las algas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género, a una familia, o incluso a algunas especies de algas⁸.

Entre los metabolitos mayoritarios presentes en las algas se encuentran: aminoácidos, proteínas, lípidos, polisacáridos, vitaminas y minerales, y compuestos con propiedades farmacológicas interesantes (antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas antihipertensivas, etc.), tales como: bromofenoles, heterociclos bromados y oxigenados, heterociclos nitrogenados, esteroides, terpenos, alcaloides, entre otros².

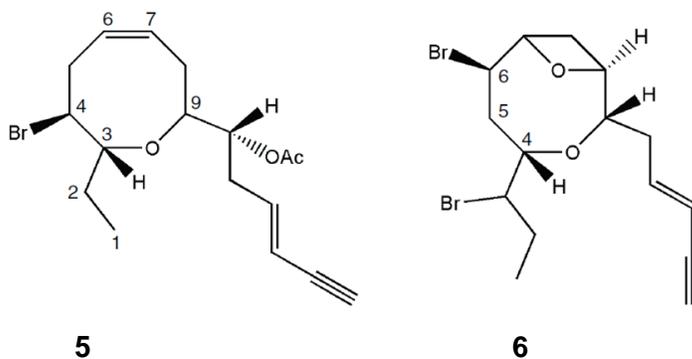
Bromofenoles

Las algas verdes, pardas y rojas han sido extensamente estudiadas para evaluar su actividad antibacteriana y antifúngica. Algunos bromofenoles poseen estas propiedades; tal es el caso de los compuestos: 5-bromo-3,4-dihidroxibenzaldehído (**1**), alcohol 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibenzaldehído (**2**), alcohol 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibencílico (**3**) y alcohol 3,5-dibromo-p-hidroxibencílico (**4**); aislados del extracto etanólico de las especies *Symphyocladia gracilis*, *Rhodomela larix* y *Polysiphonia lanosa*^{2,9}.



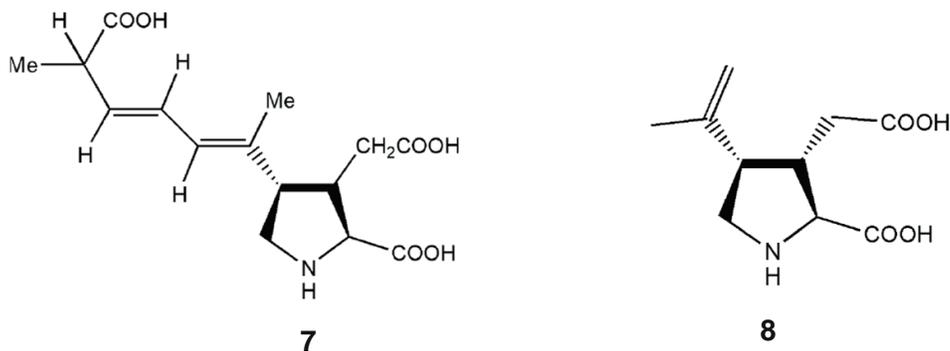
Heterociclos bromados y oxigenados

Las algas rojas del género *Laurencia* producen diversas clases de productos naturales. De las especies *L. glandulifera* y *L. nipponica*, se han reportado dos compuestos heterocíclicos bromados oxigenados, llamados laurencina¹⁰ (**5**) y laureatina¹¹ (**6**), respectivamente, extraídos en metanol².



Heterociclos nitrogenados

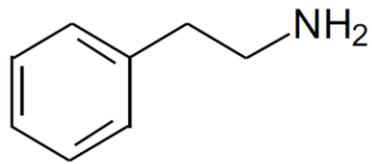
Las algas marinas poseen compuestos que contienen heterociclos nitrogenados, como los ácidos domoico (**7**) y ácido kaínico (ácido α -kaínico) (**8**)^{2,12}.



Alcaloides

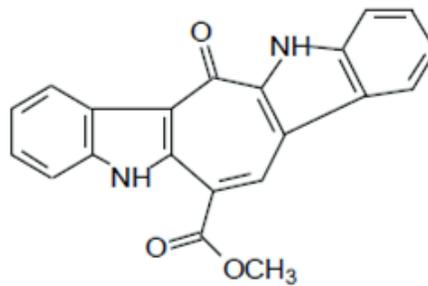
Los alcaloides presentan un especial interés debido a gran diversidad de actividades farmacológicas que poseen. En las algas se pueden encontrar, principalmente, alcaloides del tipo feniletilamina y alcaloides indólicos e indólicos halogenados¹³.

La feniletilamina (**9**) se puede encontrar en las algas rojas *Gelidium crinale*, *Gracilaria bursa-pastoris*, *Halymenia floresii*, *Phylophora crispera*, *Polysiphonia morrowii* y *Polysiphonia tripinnata*^{13,14}. Este alcaloide actúa en el cerebro como neuromodulador y neurotransmisor. Barroso y colaboradores, obtuvieron en su investigación que a dosis bajas, la feniletilamina estimula la liberación de dopamina desde el medio citoplasmático, y actúa como agonista del receptor de dopamina con una acción rápida y corta^{13,15}.



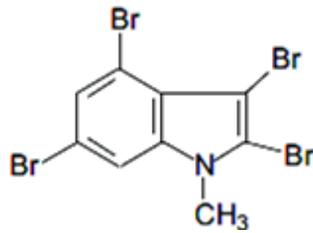
9

Los alcaloides indólicos poseen una estructura de benzopirrol, la cual deriva del aminoácido aromático conocido como triptófano. Este grupo incluye alcaloides como la caulersina (**10**) aislada del extracto metanólico del alga *Caulerpa serrulata*^{13,16}.



10

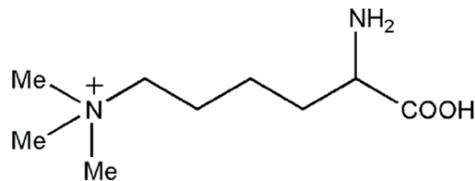
Muchos de los alcaloides indólicos halogenados han sido aislados de algas rojas; como el bromoindol-2,3,4,6-tetrabromo-1-metilindol (**11**) aislado del extracto metanólico del alga roja *Laurencia decumbens*, recolectada de la Isla Weizhou (al sur del mar de China)^{13,17}.



11

Aminoácidos

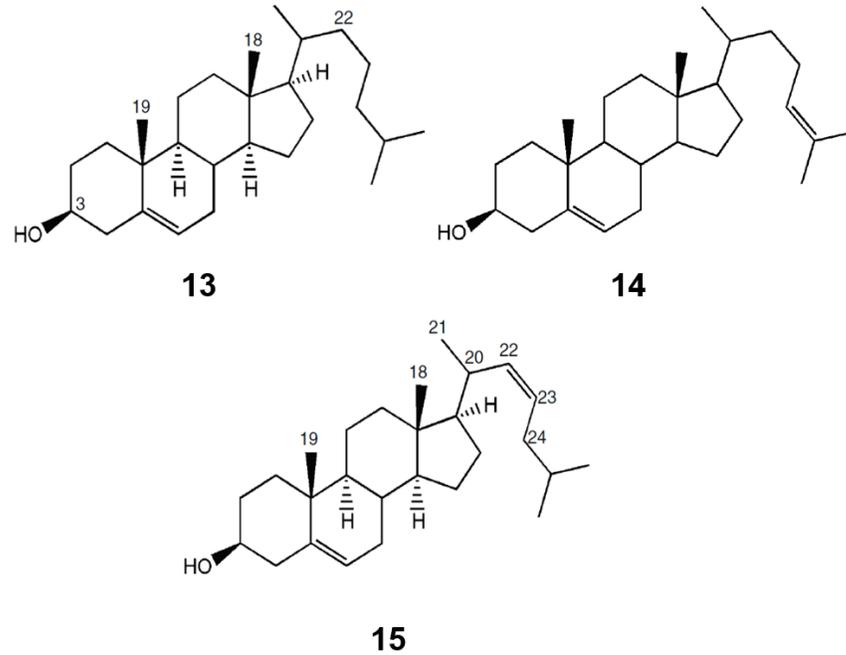
Laminine (**12**) es un aminoácido básico parecido a la colina que ha sido aislado del alga *Laminaria angustata*. El compuesto ha sido caracterizado como: trimetil-(5-amino-5-carboxi-pentil)-amonio^{2,18-19}.



12

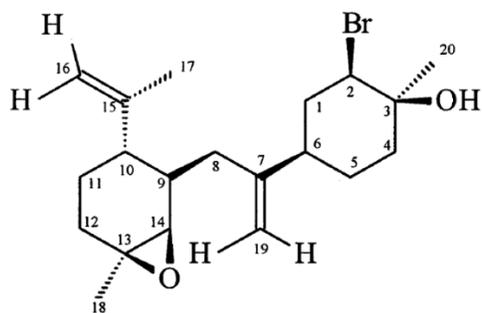
Esteroles

Heilbron y colaboradores (1935)²⁰, reportaron por primera vez la presencia de esteroides en las algas. En 1971 Patterson, G., reportó en su trabajo "The Distribution of Sterols in Algae", que el colesterol (**13**) es el esteroide principal en la mayoría de las algas Rodophita. El alga *Porphyra purpura* tiene como principal esteroide el demosterol (**14**). Ambos esteroides mencionados anteriormente son los mayoritarios en las algas *Halosaccion ramentaceum* y *Rhododymenia palmata*²¹⁻²². El esteroide mayoritario en el alga *Hypnea japonica* es el 22-dehidrocolesterol (**15**)²¹.

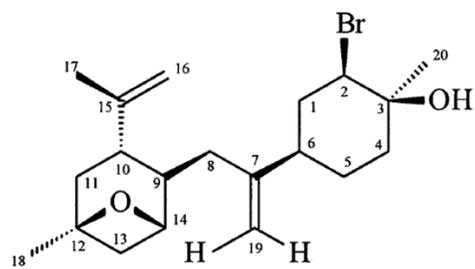


Terpenos

Los terpenos provenientes de las algas constituyen un amplio grupo de productos naturales, con estructuras que difieren de sus análogos biosintéticos de las plantas terrestres²³. Las algas marinas pardas son consideradas una de las fuentes más ricas en terpenoides. Los diterpenos bromados, prevezol A (**16**) y B (**17**) fueron aislados del extracto orgánico del alga *Laurencia obtusa*²⁴.



16



17

1.2 Especie: *Gymnogongrus tenuis*

El alga *Gymnogongrus tenuis* pertenece a el phylum Rhodophyta⁷; específicamente al orden Gigartinales, familia Phylophoracea y género *Gymnogongrus*. Dicho género es uno de los más grandes de la familia Phylophoracea (más de 40 especies), altamente diversa y con un gran número de líneas evolutivas. Las especies de este género están distribuidas alrededor del mundo, reportándose a ambos lados del océano atlántico, desde Alaska, pasando por el trópico, hasta la antártica. El mismo aparece centrado en aguas de temperatura templada o fría, aunque algunas especies se pueden encontrar en aguas tropicales como las del mar Caribe. Su hábitat es aguas litorales o sublitorales poco profundas, generalmente se encuentran sobre superficies rocosas^{6,25-27}.

Las especies más grandes de este género alcanzan 25 cm de longitud, pero en general tiende a ser un género de algas pequeñas; se pueden encontrar individualmente o en agregados densos de las mismas, y son tupidas. Se caracterizan por poseer talo y gametofitos erectos, ser de textura coriácea^{vi} o cartilaginosa. Poseen una forma terete^{vii} en la región inferior y forma aplanada en la región superior de su estructura; se encuentran ramificadas regularmente de forma dicotómica. Su anatomía es pseudo-parenquimatosa, con una médula conformada por una mezcla intercalada de células anguladas grandes con unas más pequeñas; y una corteza de líneas anticlinales de células pequeñas. Algunas especies carecen de fase tetrasporongial^{viii}; otras especies de este género poseen nematecios^{ix} reducidos o tetrasporofitos pustulares que se desarrollan desde los gominoblastos^x. Además, algunas carecen de

^{vi} Coriácea: Textura parecida al cuero.

^{vii} Terete: Redondeado, duro y de carne fuerte.

^{viii} Tetrasporongial: fase dipliote del ciclo vital de las rodofitas que originará por meiosis tetrasporas.

^{ix} Nematecio: especie de almohadilla fructífera y superficial formada de filamentos paralelos, que contienen tetrasporas.

^x Gominoblastos: estructura reproductiva del alga.

los carposporofitos^{xi} típicos. Son algas dioicas^{xii}. En las células internas corticales nacen las ramas carpogoniales^{xiii}, poseen los cistocarpos^{xiv} maduros incrustados, globosomas sin carpostoma^{xv} y carposporangia separada en grupos por células estériles^{6,25-27}.

A nivel bioquímico existe un interés, debido a que se reporta en las especies de este género la presencia de carragenanos. La investigación de dichas especies se ha centrado en los últimos años en el estudio del contenido y composición de los carragenanos presentes. Al igual que con otros miembros de la familia Phylloporaceae, los gametofitos de *Gymnogongrus* contienen carragenanos *kappa-iota*; mientras que los tetrasporofitos contienen carragenanos *lamda*²⁵.

El alga objeto de estudio en esta investigación es la especie *Gymnogongrus tenuis*, cuya clasificación taxonómica se presenta a continuación:

Phylum: Rhodophyta

Clase: Florideophyceae

Subclase: Rhodymeniophycidae

Orden: Gigartinales

Familia: Phylloporaceae

Género: *Gymnogongrus*

Especie: *Gymnogongrus tenuis*⁶

^{xi} Carposporófito: fase en el ciclo biológico trigenético de las Rhodophytas formada por conjunto de gonimoblastos, desarrollada sobre el gametófito.

^{xii} Dioicas: Poseen dos géneros, masculino y femenino, en talos distintos.

^{xiii} Carpogonial: donde se desarrollan los gominoblastos.

^{xiv} Cistocarpo: estructura fructífera procedente del gametófito en las Rhodophytas.

^{xv} Carpostoma. Abertura que presenta la fructificación de algunas algas, y por la cual tiene lugar la emisión de las esporas.



Figura 2. *Gymnogongrus tenuis*²⁸.

Caracterizada por ser algas erectas, gregarias, totalmente comprimidas, de textura cartilaginosa, entre los 3 y los 4 centímetros de altura y de una coloración entre rojo vinotinto y púrpura. Se encuentran fijadas al sustrato por un disco rizoidal común y poseen ramificaciones dicotómicas de hasta seis veces desde la parte media del ápice. Los ángulos entre las dicotomías son superiores a los 90° y posee láminas de entre 1 y 2 milímetros de ancho. Posee una estructura pseudo-parenquimatosa, al igual que las otras especies pertenecientes al género *Gymnogongrus*; multiaxial, constituida por células corticales pigmentadas, formando así de tres a cinco hileras, de dos a cinco micrómetros de diámetro, en donde la hilera externa está conformada por células cilíndricas. La médula está formada por células incoloras de entre cuarenta a cincuenta micrómetros de diámetro. Nematocios verrucosos, inmersos en la parte media del eje principal^{6,28}.



Figura 3. Anatomía *Gymnogongrus tenuis*²⁸.

Esta especie se puede encontrar desde México hasta Trinidad, generalmente hacia la zona intramareal²⁹. En Venezuela, ha sido reportada en distintas playas del territorio; más específicamente, en los estados Vargas, Miranda, Sucre, Nueva Esparta, Carabobo, Falcón, Aragua y en el territorio insular Francisco de Miranda, P.N. archipiélago de Los Roques³⁰.

El estudio de la composición química de un alga comienza con la extracción de las sustancias químicas que la componen. Como se ha mencionado anteriormente, los organismos marinos elaboran una variedad de compuestos químicos, tales como: aminoácidos, péptidos, alcaloides, terpenoides; dichos compuestos, o una variedad de ellos, pueden aislarse mediante el uso de técnicas de extracción y de separación.

1.3 Técnicas de Extracción y Separación

La obtención de los principios activos de productos naturales, en este caso algas, se realiza mediante la utilización de solventes adecuados, seleccionados de acuerdo a la solubilidad de los compuestos a extraer. El método define las condiciones de tiempo, temperatura y presión a la cual se realiza cada proceso de extracción³¹.

Los principales métodos de extracción son: maceración, percolación, digestión, infusión, decocción y extracción mediante Soxhlet³¹.

- Maceración: Consiste en dejar reposar por un período de tiempo, tres días o más, el material natural a investigar, en un recipiente lleno del solvente escogido para la extracción, por ejemplo: agua, metanol o etanol. El alga a investigar suele triturarse antes de comenzar el proceso de maceración para incrementar la superficie de contacto y así promover la extracción de los compuestos químicos.

- Percolación: Este proceso no difiere mucho de la maceración, consiste en colocar el material en un recipiente cónico o cilíndrico, y hacer pasar un solvente apropiado a través del mismo. El material adecuadamente compactado eluye con una cierta lentitud, permitiendo de esta manera la extracción de los compuestos presentes. Esta técnica requiere de la agregación continua de solvente.

- Digestión: Es una forma de maceración, con ligero calentamiento durante el proceso de extracción. Esta es una técnica altamente efectiva para extraer, y puede ser utilizada siempre y cuando la temperatura no altere los principios activos del material. Las temperaturas más comúnmente utilizadas están entre los 35°C y 40°C.

- Extracción mediante aparato de Soxhlet: Método de extracción continuo; consiste en colocar el material a extraer, previamente molido y pesado, en una cámara de extracción conectada a un balón de destilación y, por la parte superior, a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón, se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral a la cámara (conectado por encima de la boca del balón al espacio superior de la cámara) y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el

material. Cuando alcanza el nivel conveniente el líquido condensado pasa a través de otro tubo más pequeño que conecta la parte inferior de la cámara al balón.

Del proceso de extracción se obtiene una mezcla compleja de compuestos, de los cuales no se conoce la naturaleza química de las estructuras presentes; debido a esto, no existe un protocolo de separación determinado para aislar las sustancias químicas. Sin embargo, una separación general puede ser conseguida por fraccionamiento con solventes orgánicos. Normalmente, los compuestos lipofílicos (no polares o poco polares), se pueden encontrar en las fracciones solubles de hexano y cloroformo, como lo son los ésteres, éteres, terpenos, esteroides, ácidos grasos, entre otros; al igual que compuestos polares, del tipo alcaloide o polisacárido, se encuentran mayormente en las fracciones solubles en acetato de etilo y agua-metanol 1:1. La técnica usual para el aislamiento y purificación de los compuestos químicos resultantes de dicho fraccionamiento, es la cromatografía. De igual forma, la separación general también puede conseguirse utilizando técnicas cromatográficas².

La cromatografía es una técnica que agrupa un conjunto de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de sustancias, estrechamente relacionadas, en mezclas complejas. Se basa, principalmente, en la elución de la muestra utilizando una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico), a través de una fase estacionaria inmisible; con el objetivo de que durante su elución, los componentes de la mezcla se separen en dependencia de su afinidad con la fase móvil o la fase estacionaria³².

Los métodos cromatográficos se puede clasificar de dos maneras³²:

- a) Basado en medios físicos por los cuales la fase estacionaria se pone en contacto con la fase móvil:
 - Cromatografía en columna.
 - Cromatografía en plano.

- b) Basado en los tipos de fases móviles y estacionarias, y en la clase de equilibrios involucrados en la transferencia de los solutos entre las fases:
- Cromatografía de gases (CG): Gas-líquido, Gas-sólido.
 - Cromatografía de líquidos (CL): Líquido-líquido o reparto, Líquido-sólido o adsorción, intercambio iónico, exclusión por tamaños y afinidad.
 - Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS).

En general, la mayoría de los tipos de cromatografía funcionan bajo el mismo principio, la separación depende de las diferentes solubilidades y adsorptividades de las sustancias en relación con las dos fases entre las cuales ocurre la distribución. Los compuestos se adsorben o adhieren a las partículas de fase estacionaria mediante diferentes tipos de fuerzas intermoleculares (fuerzas de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, entre otras); la fortaleza de estas interacciones varían en función de la polaridad y tipo de compuestos, y el tipo de fase estacionaria que se utilice. En el caso de la solubilidad en la fase móvil, esta depende de la similitud en polaridad entre la fase y el analito. El grado en el que cualquier solvente dado puede eluir un compuesto adsorbido en la fase estacionaria, depende de la polaridad relativa del solvente. Por cada analito adsorbido, se puede decir que se forma un equilibrio dinámico de distribución entre el material de adsorción, fase estacionaria, y el solvente, fase móvil³³.

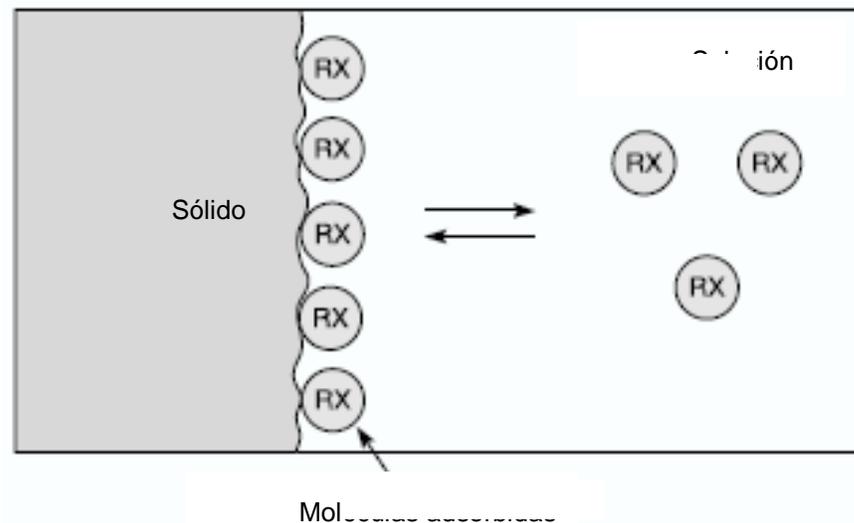


Figura 4. Equilibrio dinámico de adsorción³³.

Las técnicas cromatográficas mayormente utilizadas son: cromatografía en columna (adsorción en sílica gel o alúmina, intercambio iónico o por partición) y cromatografía de capa fina (CCF). Estas utilizan una amplia variedad de sistemas de solventes adaptados a la polaridad de la fracción estudiada².

La cromatografía en columna se realiza utilizando un tubo angosto de vidrio relleno con alúmina o sílica, que actúa como fase estacionaria. La fase móvil, se agrega al tope de la columna y eluye los componentes de la mezcla. La distribución e interacción entre la muestra, la fase móvil y la fase estacionaria, permite la separación de dichos componentes, ya que estas eluyen a velocidades diferentes³²⁻³³.

La cromatografía de capa fina (CCF) se realiza en placas de aluminio revestidas con la fase estacionaria. Generalmente, la aplicación de la muestra se realiza disolviendo la misma y agregándola en la lámina como un punto, del menor diámetro posible, a uno o dos centímetros del extremo de la placa. La fase móvil se desplaza por la fase estacionaria por capilaridad, eluyendo así la muestra y permitiendo el desarrollo de la placa³²⁻³³.

La CCF es utilizada mayormente para la identificación de compuestos y para la determinación de su pureza. En cambio, la cromatografía en columna se utiliza para la separación de mezclas complejas. Cuando se habla de cromatografía de capa fina preparativa, se refiere al uso de esta técnica para el aislamiento de compuestos; es decir, utilizando placas más grandes que las utilizadas para CCF, se coloca la muestra en una línea en el extremo inferior de la placa y se eluye con la fase móvil escogida. Una vez desarrollada la placa, las bandas producidas por la separación de los compuestos son raspadas y colocadas en un frasco para, posteriormente, separar el adsorbente del compuesto utilizando los solventes adecuados. Frecuentemente, para obtener un compuesto puro es necesario realizar múltiples cromatografías³³.

El análisis químico de un producto natural termina con la identificación de los compuestos puros aislados por las distintas técnicas aplicadas. Para ello se utilizan equipos como RMN, infrarrojo, lámparas UV y espectrometría de masa; las cuales proveen data espectral, la cual se compara con aquellas referencias reportadas en la literatura con respecto al género y a la especie relacionada².

Los compuestos químicos aislados en un estudio fitoquímico, es decir, de un estudio de la composición química de un alga, pueden poseer actividades biológicas interesantes. La primera prueba que se realiza, ya sea a un compuesto aislado o a una fracción o un extracto crudo, es la de toxicología.

1.4 Toxicología

En el descubrimiento de nuevos compuestos químicos con potencial farmacéutico, es necesario conocer principalmente dos cosas: si determinado posible fármaco posee una actividad biológica positiva contra el objetivo propuesto, y si dicho fármaco potencial produce o no un efecto adverso en los procesos biológicos de un organismo vivo. El área de la ciencia que estudia la variedad de posibles efectos adversos que pueden causar una diversidad de moléculas químicas es la Toxicología.

En general, todo compuesto químico tiene el potencial de lesionar o causar muerte si se encuentra a la concentración o dosis necesaria. Algunas sustancias causan muerte en dosis de microgramos, mientras que otras son inofensivas en dosis de varios gramos³⁴.

El efecto tóxico que puede producir un agente químico en el sistema biológico, ocurre cuando dicho agente o su derivado metabólico (biotransformación), alcanzan el sitio apropiado en el organismo, a la concentración adecuada y por el lapso de tiempo necesario. En consecuencia, que ocurra una respuesta tóxica dependerá de las propiedades químicas y físicas del agente, el sitio y tiempo de exposición en el organismo, cómo se metabolice el agente y la susceptibilidad general del sistema biológico estudiado³⁴.

Con respecto al sitio de exposición, los principales factores que influyen la toxicidad de un químico en específico, son: las rutas de administración (tracto gastrointestinal, pulmones, piel, entre otras rutas parenterales) y la duración y frecuencia de la exposición. La ruta de administración, puede influenciar la toxicidad de un agente químico; por ejemplo, un agente que puede ser desintoxicado a nivel de hígado se consideraría poco tóxico, pero si este entra directamente al torrente sanguíneo, el efecto toxicológico que tenga lesionará al organismo; este agente sería poco tóxico por vía oral, pero tóxico por vía intravenosa³⁴.

Los investigadores que analizan los efectos tóxicos de compuestos químicos en modelos animales dividen el tiempo de exposición en cuatro categorías: aguda, subaguda, subcrónica y crónica. El tiempo de exposición aguda, se define como exposición del organismo al compuesto a estudiar por menos de 24h, esta se realiza, usualmente, en una sola administración. El tiempo de exposición subaguda se realiza exponiendo al sujeto de prueba al químico a estudiar, repetidas veces, por un mes o menos. Dicho tiempo de exposición se realiza de 1 a 3 meses y el tiempo de exposición crónica es la evaluación realizada por más de 3 meses³⁴.

En los estudios de toxicidad se conoce la viabilidad de que un determinado compuesto pueda servir como fármaco; dichos estudios forman parte de lo que se conoce como ensayos preclínicos.

1.5 Ensayos Preclínicos

Antes de que un posible principio activo pueda ser probado en seres humanos, es necesario realizar ensayos preclínicos; estos son pruebas que se realizan en un contexto científicamente controlado, utilizando cultivos celulares (pruebas *in vitro*), órgano aislado (prueba *in vitro*) y/o modelos animales (pruebas *in vivo*). De esta manera se pueden conocer no solo sus propiedades farmacológicas, sino también su toxicidad para el organismo humano³⁵. En los estudios toxicológicos se aborda el potencial de que el fármaco o compuesto con actividad biológica, destruya o lesione células y órganos, causen cáncer u origine problemas relacionados con la reproducción³⁵.

El hecho de que las condiciones experimentales *in vitro* sean sencillas, estáticas y aisladas, produce que no siempre reflejen de manera correcta el dinamismo integrado y la complejidad del organismo humano; de allí, la importancia que los científicos dan a la búsqueda de resultados *in vivo*³⁶.

Los modelos animales incrementan la capacidad de los científicos de estudiar la eficacia y seguridad de los compuestos biológicamente activos. Un modelo animal apropiado debe poseer similitudes al humano, a nivel de fisiología o de bioquímica.²⁸ Los ratones y otros roedores como ratas y hámsters constituyen el 90% de los animales utilizados en dichos estudios. En general, dependiendo del estudio que se vaya a realizar, se pueden utilizar diferentes tipos de animales, por ejemplo: en los estudios de interacción de fármacos o drogas se utilizan mayormente roedores, perros y monos; mientras que, entre los tipos de animales utilizados en estudios de toxicología del

desarrollo, se encuentran el nematodo (*Caenorhabditis elegans*), la mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*), ratones y el pez cebra *Danio rerio*^{36,37}.

En esta investigación se escogió evaluar la toxicidad del extracto metanólico del alga *G. tenuis* en el modelo de pez cebra *Danio rerio*. A continuación se presenta información sobre este interesante modelo animal.

1.5.1 Modelo de Pez Cebra

El pez cebra es pequeño, usualmente de menos de 5 cm de largo, con rayas en el cuerpo. Se encuentra distribuido geográficamente desde Pakistán hasta Myanmar y desde Nepal hasta Karnataka en la India, viven en aguas tranquilas como estanques, lagos, arrozales, etc. Son activos durante el día y descansan en la noche; son omnívoros, se alimentan de zooplancton e insectos³⁸.

Este modelo animal se comenzó a utilizar en el año 1960, y cuando fue secuenciado su genoma se incrementó su uso debido a que su secuencia genética es bastante similar a la humana (70%); lo cual permite utilizarlo como modelo animal para la investigación de enfermedades humanas. El pez cebra ha sido utilizado para estudiar casi todos los aspectos de la biología de los vertebrados, incluyendo el desarrollo y funcionamiento de los sistemas: cardiovascular, nervioso central y digestivo. Hoy en día se utiliza en biología molecular, biología del desarrollo, neurobiología e investigación genética³⁹⁻⁴⁰.

El sistema del modelo del pez cebra puede ser utilizado en evaluaciones de medio o alto rendimiento, debido a numerosas ventajas, tales como: relativa facilidad de mantenimiento de grandes poblaciones de animales, alta fecundidad que proporciona un gran número de animales para analizar y rápido desarrollo embrionario fuera del útero; esto provee al investigador una facilidad en la manipulación experimental y le

permite la observación directa de la formación de tejido y la organogénesis *in vivo*. Como el modelo utiliza mayormente a la larva del pez cebra, se necesitan mínimas cantidades de compuesto para realizar dichas evaluaciones³⁹. La capacidad de contener grandes números de embriones de pez cebra y larvas en pequeños volúmenes, facilita los ensayos a realizar debido a que los compuestos son absorbidos por el animal a través de la piel y las branquias en las etapas embrionarias, y a través del sistema digestivo durante la etapa larvaria⁴⁰. Otra ventaja de utilizar la larva del pez cebra, es que es transparente, lo que permite observar el desarrollo de órganos y tejidos³⁹⁻⁴⁰.

En los últimos años muchos investigadores han comenzado a explorar el uso del pez cebra como un modelo alternativo para realizar pruebas toxicológicas, en orden de proveer una evaluación *in vivo* de los efectos que puedan producir dichos compuestos. Este modelo es válido para el análisis de productos naturales, donde puede utilizarse para el aislamiento guiado por bioensayos de posibles metabolitos secundarios obtenidos de algas, plantas u otros organismos⁴¹.

2. ANTECEDENTES

Como parte del proceso de investigación se realizó una revisión bibliográfica del alga *Gymnogongrus tenuis* y del modelo de pez cebra *Danio rerio* aplicado a investigación de compuesto provenientes de algas.

Del análisis bibliográfico correspondiente al alga, se encontró que esta especie, e incluso su género, ha sido poco investigado. Es por ello que se decidió investigar primero distintos estudios realizados en algas en general, luego estudios realizados a especies dentro del género *Gymnogongrus*, y por último a la especie *Gymnogongrus tenuis*.

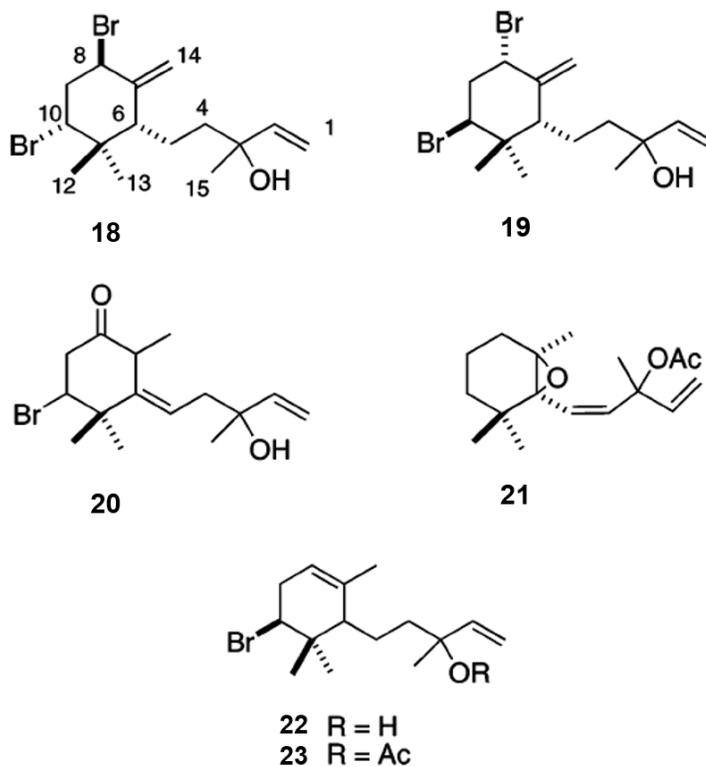
2.1 Estudios realizados en algas

Anggadiredja y colaboradores, en 1997, evaluaron la actividad antioxidante de diferentes extractos obtenidos de algas frescas y secas, utilizando el método de tiocianato de Osawa y Namiki (1982). Las algas, *Sargassum polycystum* y *Laurencia obtusa*, fueron colectadas en aguas de las islas de Seribu, Indonesia. Solo los extractos obtenidos del material fresco mostraron actividad antioxidante. En general, los extractos de *L. obtusa* mostraron una mayor actividad que los extractos de *S. polycystum*⁴².

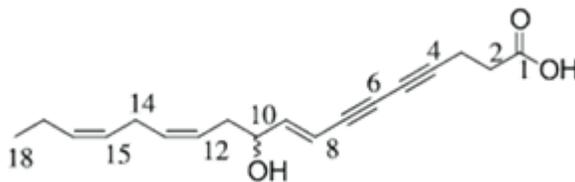
Cuatro sesquiterpenos: (8R^{*xvi})-8-bromo-10-epi-β-snyderol (**18**), (8S^{*})-8-bromo-β-snyderol (**19**), 5-bromo-3-(3'-hidroxi-3'-metilpent-4'-enilideno)-2,4,4-trimetilciclohexanona (**20**) y el epóxido, derivado del ciclohexeno (**21**), fueron reportados por los investigadores Topcu y colaboradores, junto con los compuestos conocidos: α-snyderol (**22**), acetato de α-snyderol (**23**) y estigmasterol; aislados del extracto CHCl₃-MeOH de *L. obtusa* colectada en Bademil, Turquía. Además, al evaluar la actividad antimalárica

^{xvi} (*) El asterisco presente en la molécula indica la presencia de un centro quiral, que puede ser R o S.

de todos los compuestos, el sesquiterpeno (**18**) mostró una actividad antimalárica Cl_{50} de 2700 y 4000 ng/mL contra *Plasmodium falciparum* D6 y W2, respectivamente⁴³.



El ácido (8*E*,12*Z*,15*Z*)-10-hidroxi-8,12,15-trien-4,6-diinoctadecanóico (**24**) fue aislado del extracto etanólico de la especie *Caulerpa racemosa*, colectada en Zhanjiang, China, por los investigadores Shui-Chun y colaboradores⁴⁴.

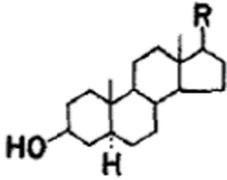
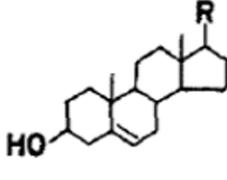
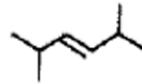
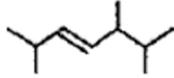
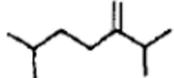
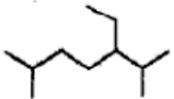
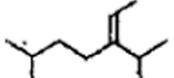


24

2.2 *Gymnogongrus*

En el estudio de los esteroides mayoritarios de las algas rojas, en 1976, los investigadores Chardon-Loriaux y colaboradores, estudiaron doce especies, colectadas en Japón, pertenecientes a los órdenes Gelidiales, Cryptonemiales y Gigartinales; entre las cuales, se encontraban las especies *Gymnogongrus flabelliformis* y *Gymnogongrus divaricatus*. Cuatro de las especies estudiadas tuvieron el dihidrocolesterol o colestano-3 β -ol (**25**) como el esteroide presente en mayor cantidad, acompañado de C₂₆, C₂₈ y C₂₉ estanoles. Se reportó la presencia de los esteroides 24-dimetil-5 α -col-22-en-3 β -ol (**26**), colest-22-en-3 β -ol (**27**), colest-7-en-3 β -ol (**28**), 24 ξ -metilcolest-22-en-3 β -ol (**29**), 24-metilencolestano-3 β -ol (**30**), 24 ξ -etilcolestano-3 β -ol (**31**) e isofucostanol (**32**)⁴⁵.

Las algas rojas examinadas pueden ser clasificadas en tres grupos: un grupo de siete especies que poseen colesterol (**33**) como su esteroide principal, acompañado de una variedad de esteroides C₂₆₋₂₉. La mezcla de esteroides del segundo grupo, cuatro especies, contuvo una serie de 5,6-dihidroesteroides (estanoles) de los cuales el colestano (**25**) es el mayoritario. El tercer grupo, consta de una sola especie que posee 22-dehidrocolesterol (**34**) como esteroide principal. De este estudio también se encontró la presencia de 24-metilencolesterol o chalinasterol (**35**), esteroide C₂₆ (**36**), el dihidro derivado del esteroide C₂₆ (**26**), 24 ξ -metil-colest-5,22-dien-3 β -ol (**37**) y 24 ξ -etilcolesterol (**38**)⁴⁵.

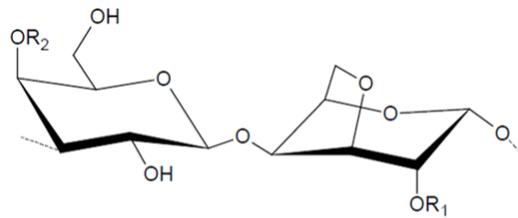
R		
	25,28 (Δ^7)	33
	26	36
	27	34
	29	37
	30	35
	31	38
	32	-

La composición de ácidos grasos en lípidos y galactolípidos fue determinada para una variedad de algas, entre las cuales se encontró la especie *Gymnogongrus flabelliformis*. Los ácidos grasos C_{16} , estuvieron distribuidos en ambas posiciones sn-1^{xvii} y sn-2 de galactolípidos en el alga *G. flabelliformis*, pero se localizaron principalmente en la posición sn-1. Con respecto a los ácidos grasos C_{20} , estuvieron localizados exclusivamente en la posición sn-1 de los galactolípidos, pero en ambas posiciones sn-1 y sn-2 de los monogalactosil diacilgliceroles, encontrándose más los ácidos grasos C_{20} en la posición sn-1 que en la posición sn-2⁴⁶.

^{xvii} La clasificación sn refiere a la posición en la que se encuentra el ácido graso en el glicerol. sn-1 es el CH_2OH y sn-2 es $CH-O-R$.

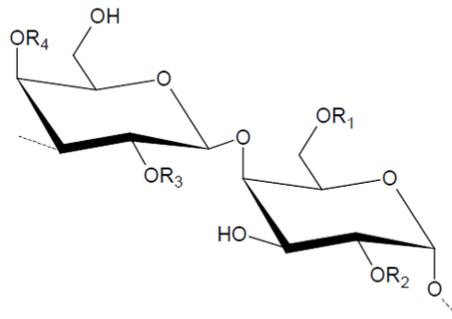
Gymnogongrus griffithsiae

Talarico y colaboradores, analizaron la composición química y la actividad antiviral contra el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2) de los extractos crudos, acuosos, del alga roja recolectada en Brasil, *Gymnogongrus griffithsiae*. Los polisacáridos obtenidos, entre ellos el carragenano homogéneo kappa/iota/nu y el DL-galactano híbrido, exhibieron actividad antiviral, con CI_{50} entre los rangos de 0,5-5,6 $\mu\text{g/mL}$; determinado en un ensayo de reducción de placa de virus en células Vero. Los galactanos no tuvieron efectos citotóxicos y mostraron un amplio espectro de actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2. La acción observada por estos compuestos puede atribuirse a un efecto inhibitorio en la absorción del virus. Una representación esquemática de las diferentes unidades que se repiten de carragenanos y agaranos, y de las unidades disacáridas de galactanos sulfatados aislados del alga *G. griffithsiae*, se presenta a continuación. Unidad carragenano iota- (39), kappa- (40), lambda- (41), mu- (42), nu- (43). El galactano proveniente del alga *G. griffithsiae* consiste de las unidades kappa/iota/nu⁴⁷.



39 $R_1 = R_2 = \text{SO}_3^-$

40 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{SO}_3^-$



41 $R_1 = \text{SO}_3^-; R_2 = \text{SO}_3^-; R_3 = \text{SO}_3^-; R_4 = \text{H}$

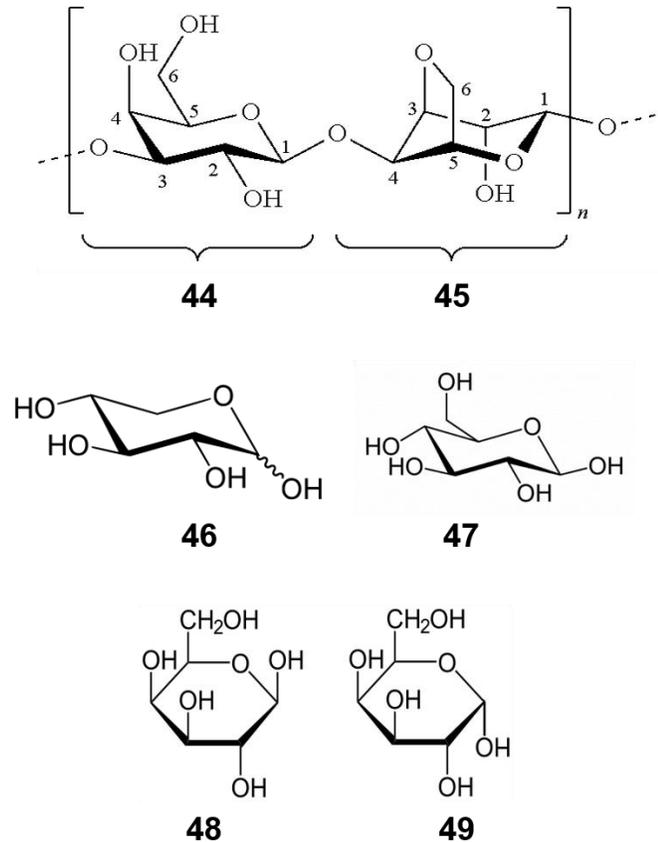
42 $R_1 = \text{SO}_3^-; R_2 = \text{H}; R_3 = \text{H}; R_4 = \text{SO}_3^-$

43 $R_1 = \text{SO}_3^-; R_2 = \text{SO}_3^-; R_3 = \text{H}; R_4 = \text{SO}_3^-$

Gymnogongrus torulosus

El género *Gymnogongrus* es conocido por producir carragenanos. La investigación realizada por Estevez y colaboradores, propone que el sistema de galactanos, biosintetizado por el alga *G. torulosus*, está conformado por DL-galactanos híbridos, teniendo una mayor cantidad de cadenas tipo carragenano o tipo agarano. Del análisis ficoquímico se obtuvieron cuatro fracciones (C1-4), de las cuales, la mayor cantidad de material (59%) se obtuvo de la primera extracción (C1); en la cual hubo presencia de galactosa (**44**), 3,6-anhidrogalactosa (**45**) y trazas de xilosa (**46**). Las fracciones

restantes tuvieron, de igual manera, la presencia de los compuestos antes mencionados, junto con 6-O-metilgalactosa y glucosa (**47**). Entre los polisacáridos encontrados en la fracción C1, se obtuvo presencia del carragenano *kappaliota* y pequeñas cantidades de α -galactosa (**48**) y β -galactosa (**49**)⁴⁸.



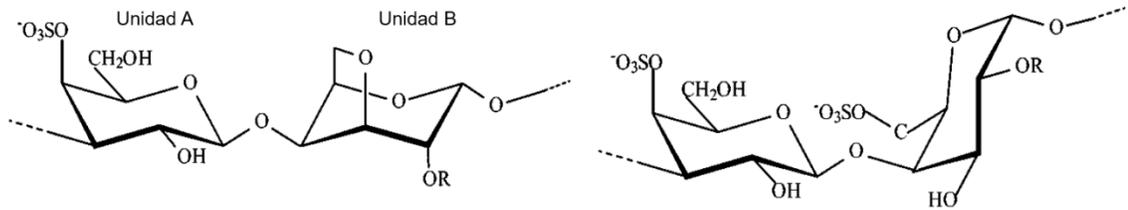
Adicionalmente, se analizaron las propiedades antivirales *in vitro* contra el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) y contra el virus del dengue 2 (DEN-2) de los extractos, polisacáridos aislados, en un ensayo de reducción de placa de virus de células Vero. Se obtuvo una alta actividad contra ambos virus, con un CI_{50} en el rango de 0,6 – 16 $\mu\text{g/mL}$ para HSV-2 y de 0,19 - 1,7 $\mu\text{g/mL}$ para DEN-2. Se logró una inhibición completa de la actividad durante el período de absorción del virus en presencia de los galactanos; lo

cual sugiere que el modelo de acción de estos compuestos, es en la interferencia en el enlace de la glicoproteína superficial con el receptor celular⁴⁹.

Gymnogongrus tenuis

El sistema galactano biosintetizado por el alga *Gymnogongrus tenuis* está constituido, en su mayor parte, por carragenanos del tipo *kappaliota*, con una predominancia de estructuras *iota*; y en menor cantidad, por carragenanos no ciclados del tipo *nu*. El 12% de dichos galactanos aislados poseen estructuras agarano. Dichos galactanos están conformados por tres unidades enlazadas de β -D-galactosa, parcialmente sustituidas en C-6 con grupos sulfatos o residuos de β -D-xilosa, y cuatro residuos enlazados que comprenden, unidades α -L-galactosa parcialmente sulfatada o metoxilada en C-3 o sulfatada en C-3 y C-6, y unidades de 3,6-anhidro- α -L-galactosa. A continuación se muestran los carragenanos (50) y agaranos (51) mayoritarios del alga *Gymnogongrus tenuis*⁵⁰.

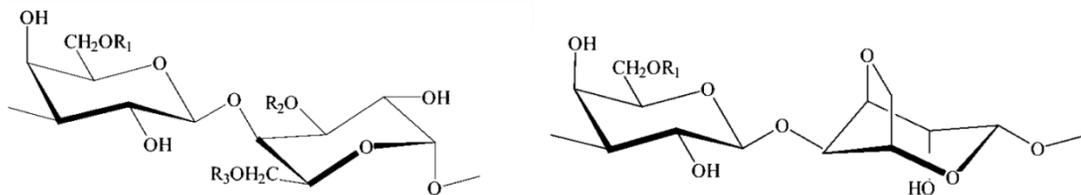
50



v-carragenano R= SO₃⁻ (minoritario)

μ-carragenano R= H (trazas)

51



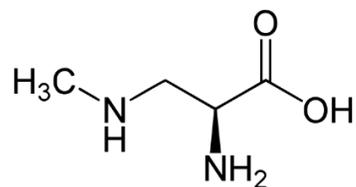
R₁= H⁺, SO₃⁻, β-D-Xil, R₂= R₃= H⁺ o R₂= SO₃⁻, CH₃, R₃= H⁺

En el presente trabajo de investigación se realizó el estudio preliminar de la toxicidad aguda del extracto metanólico del alga *G. tenuis*, utilizando el modelo de pez cebra *Danio rerio* como modelo animal *in vivo*.

2.3 Modelo de Pez Cebra *Danio rerio*

Los investigadores Purdie y colabores expusieron embriones del pez cebra a varias concentraciones (5 - 50.000 μg/L) de un aminoácido neurotóxico, producido por las cianobacterias, llamado β-N-metilamin-L-alanina (**52**) (BMAA); dicha evaluación se

realizó utilizando el aminoácido neurotóxico sólo y en presencia de carbonato de sodio. La exposición a BMAA indujo un rango de anomalías neuro-musculares y de desarrollo, dependientes de la dosis, relacionado con defectos en las vías de transmisión del glutamato. La exposición a BMAA en presencia de carbonato, produjo un incremento en la incidencia de edemas pericardiales en el 21% de los sujetos evaluados, correlacionado con una disminución en el ritmo cardíaco⁵¹.



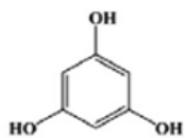
(52)

El modelo de pez cebra fue utilizado en la evaluación de nuevos agentes con actividad inhibitoria sobre la tirosinasa. Los extractos acuosos de las algas: *Enderachne binghamiae*, *Schizymenia dubyi*, *Ecklonia cava* y *Sargassum silquastrum*, evidenciaron una potente actividad inhibitoria. Entre esas algas, al extracto de *E. cava* y *S. silquastrum* (50 – 100 µg/mL), se les realizaron más estudios; en los cuales se evidenció que ambas especies reducen la síntesis de melanina celular y la actividad de la tirosinasa. Utilizando el pez cebra como un modelo *in vivo* alternativo, obtuvieron que todas las muestras presentaron efectos inhibitorios en la pigmentación del pez, probablemente debido a su potencial como inhibidor de la tirosinasa; dichos efectos fueron dependientes de las dosis. Los inhibidores de tirosinasa pueden ser útiles a nivel clínico ya que podría utilizarse en el tratamiento de algunas enfermedades dermatológicas, debido a que esta enzima es responsable del primer paso en la producción de melanina⁵².

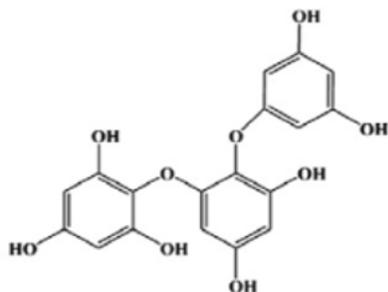
Seung-Hong Lee y colaboradores, evaluaron el efecto antiinflamatorio *in vivo* del fucoidano extraído del alga *Ecklonia cava* utilizando el modelo de inflamación inducida

por corte de cola y estimulación lipopolisacárida (LPS), en el pez cebra *D. rerio*. De este estudio se obtuvo que dicho compuesto alivió la inflamación inhibiendo la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) y de óxido nítrico (NO); las cuales son inducidas por el tratamiento de inflamación. Adicionalmente, se demostró que el compuesto posee un efecto protector en los embriones del pez cebra, contra la toxicidad producida por la exposición al LPS⁵³.

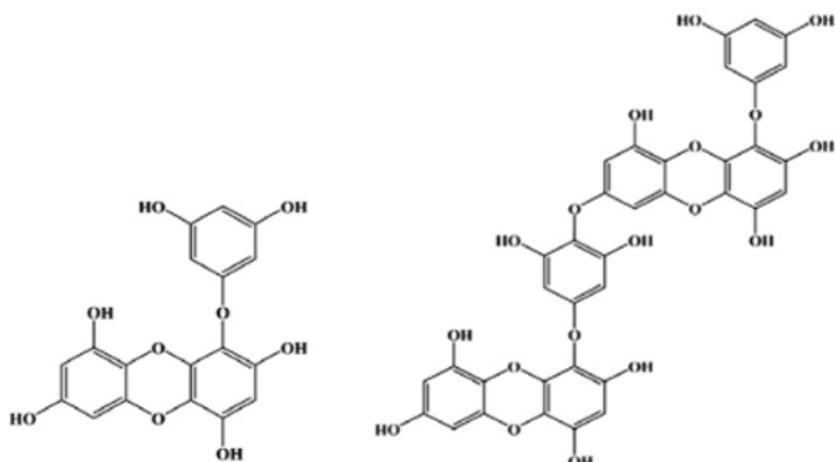
Se estudió el efecto protector de florotaninos, incluyendo: floroglucinol (**53**), trifloroetol A (**54**), eckol (**55**), dieckol (**56**), eckstolonol (**57**) y, aislados del alga marrón *Ecklonia cava*, contra la toxicidad por estrés oxidativo inducida por 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) en embriones de pez cebra. El ensayo consistió en exponer a los embriones al compuesto AAPH, entre los cuales, a un grupo, se le agregó adicionalmente uno de los florotaninos. La comparación de los efectos producidos por los distintos grupos se realizó hasta el día dos después de la fertilización, 2dpf. Todos los florotaninos evitaron la formación de EROS intracelular, la peroxidación de lípidos y redujeron la muerte celular de los embriones del pez cebra *Danio rerio*, comparados con el grupo control (AAPH). Se observó que dichos florotaninos fueron capaces de proteger a los embriones de los cambios morfológicos observados en presencia de AAPH, como edema pericardial, edema de saco vitelino y crecimiento tardío. De esta manera, se demostró que estos compuestos poseen una destacada actividad antioxidante. Los investigadores consideraron que dichas moléculas tienen potencial como agentes antioxidantes para tratar o prevenir diferentes enfermedades⁵⁴.



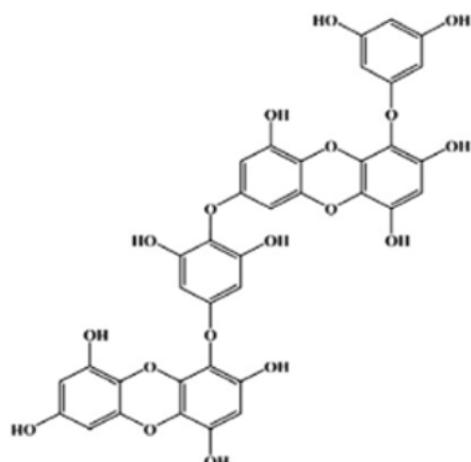
53



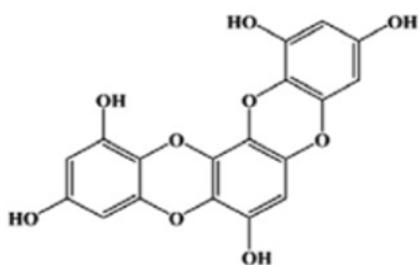
54



55



56



57

3. JUSTIFICACIÓN

Numerosos investigadores han estudiado la composición química de organismos marinos en busca de nuevos compuestos, cuya actividad biológica permita utilizarlos como fármacos. El estudio de las algas y sus componentes ha permitido el descubrimiento de un gran número de moléculas orgánicas; algunas de las cuales han demostrado ser biológicamente activas en distintos ensayos *in vivo* e *in vitro*. El estudio de dichos organismos ha permitido conocer que la concentración de sus metabolitos en una determinada especie puede variar dependiendo a la locación geográfica. En la presente investigación se estudió la especie *Gymnogongrus tenuis*, proveniente de costas venezolanas, y se analizaron los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico. Se consideró importante realizar un estudio exploratorio preliminar del efecto tóxico del extracto metanólico de la especie, utilizando el modelo de pez cebra *Danio rerio*, evaluando los efectos que pudieran observarse, sobre la viabilidad, alteraciones funcionales y morfológicas. Este proyecto se realizó en conjunto con el Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales Marinos de la Facultad de Ciencias y la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Generales

-Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el alga *Gymnogongrus tenuis*.

-Evaluar la toxicidad aguda del extracto metanólico del alga *Gymnogongrus tenuis* en el modelo del pez cebra *Danio rerio*.

4.2 Objetivos Específicos

-Obtener el extracto metanólico del alga *Gymnogongrus tenuis* por métodos convencionales de extracción.

-Aislar y purificar los metabolitos mayoritarios obtenidos de las distintas fracciones de alga *Gymnogongrus tenuis* utilizando técnicas cromatografías.

-Elucidar las estructuras moleculares de los metabolitos obtenidos, utilizando técnicas espectroscópicas, espectrometría de masas y por comparación con la data encontrada en la literatura.

-Realizar estudios preliminares de la toxicidad aguda del extracto metanólico del alga *Gymnogongrus tenuis* en el modelo del pez cebra *Danio rerio*, evaluando cambios conductuales, en la morfología, ritmo cardíaco, entre otras variaciones relevantes.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Materiales, equipos y reactivos

5.1.1 Soportes cromatográficos

- Para cromatografía capa fina fase normal, se empleó placas de sílica gel Alugram ® de dimensiones 20x20 cm, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄.
- Para cromatografía capa fina fase reversa, se utilizaron placas RP₁₈ soportadas en aluminio, de longitud 20x20 cm.
- En cromatografía en columna fase normal, se utilizó sílica gel 60, con las siguientes especificaciones: 0,063-0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM.
- En las separaciones cromatográficas fase reversa, se utilizaron columnas Sep-Pak® Vac 35cc y 12cc C₁₈.
- Para las separaciones por exclusión molecular se usó como soporte Sephadex™ LH-20 GE Helthcare.

5.1.2 Reactivos y solventes

Todos los solventes utilizados en la realización de este trabajo son de grado técnico, previamente destilados.

Solventes:

- Hexano (Hex)
- Diclorometano (CH₂Cl₂)
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Metanol (MeOH)
- Acetonitrilo (ACN)

- Agua destilada (H₂O)
- Agua deuterada (D₂O) grado PA Aldrich
- Cloroformo deuterado (CDCl₃) grado PA Aldrich

Reveladores y Soluciones reactivas:

- Revelador de *p*-anisaldehído en Etanol-H₂SO₄⁵⁵.
- Reactivo Dragendorff: Nitrato de bismuto (Bi(NO₃)₃), agua, ácido acético glacial (CH₃COOH) y yoduro de potasio (KI). Se utiliza para detectar alcaloides, compuestos heterocíclicos con nitrógeno, aminas cuaternarias⁵⁵.
 - Reactivo Ninhidrina (NIH): Ninhidrina-Etanol. Se utiliza, principalmente, para detectar aminoácidos⁵⁵.
 - Reactivo de timol en Etanol-H₂SO₄. Se utiliza, principalmente, para detectar azúcares⁵⁵.
 - Revelador de Yodo (I₂).
 - Solución calceína 0,1%⁵⁷.

El revelado de una placa consiste en rociar el reactivo escogido sobre la placa cromatográfica ya desarrollada. En el caso del *p*-anisaldehído, el timol y la ninhidrina es necesarios calentar para observar la coloración producto de la reacción. En el reactivo Dragendorff, la coloración se observa inmediatamente después del rociado. El revelado con yodo se realiza en una cámara, donde la placa se impregna con yodo y la coloración se forma como producto de la reacción.

5.1.3 Equipos

- Rotavaporador marca BÜCHI R-111 con un baño de agua BÜCHI 461.
- Rotavaporador marca BÜCHI RE-121 con baño de aceite BÜCHI 471 adaptado con agua.
- Bomba precisión 25 l/m (0,88 CFM) 0,1 Micronn modelo D25.

- Lámpara ultravioleta UV-Vis marca MINERALIGHT® LAMP, Modelo UVSL-58, con dos longitudes de onda disponibles: 254 y 366nm.
- Balanza analítica OHAUS.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN ^1H) frecuencia de 270 MHz y de Carbono 13 (RMN ^{13}C) frecuencia de 67,5 MHz, marca JEOL, modelo eclipse.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN ^1H) frecuencia de 300 MHz y de Carbono 13 (RMN ^{13}C) frecuencia de 75 MHz, marca Bruker.
- Equipo CG-EM, Cromatógrafo de gases Agilent 6890Nm equipado con una columna DB-5 acoplado a un Espectrofotómetro de masas de la misma marca system 5975 Inert.
- Equipo CG-EM, Cromatógrafo de gases Varian Modelo CP 3800 acoplado a un espectrómetro de masa marca Varian Saturn modelo.
- Microscopio estereoscópico OLYMPUS IX71 de fluorescencia.

5.2 Obtención del alga *Gymnogongrus tenuis*

El alga *Gymnogongrus tenuis* fue recolectada en junio de 2016 en Playa Los Corales, La Guaira, Estado Vargas, Venezuela. Dicha alga se obtuvo de manera manual de las rocas que se encontraban en la costa. La muestra fue identificada por la Dra. Beatriz Vera, taxónomo del Instituto de Biología Experimental en el Centro de Botánica Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

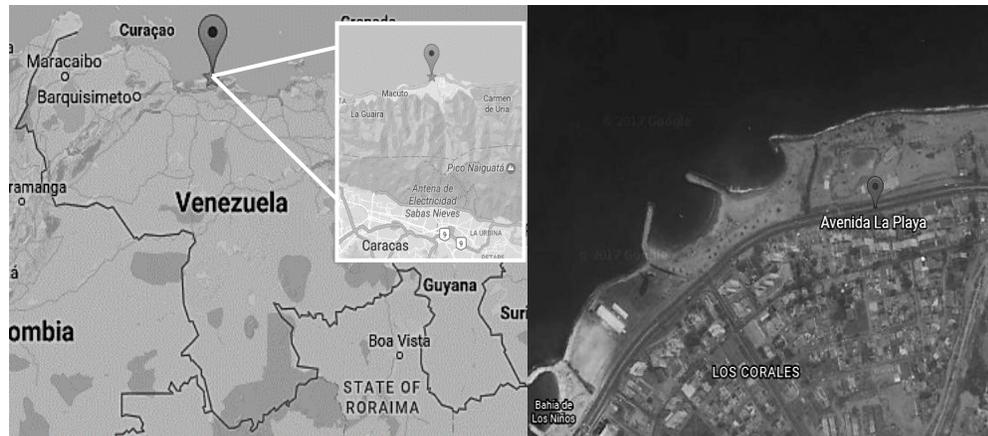


Figura 5. Zona de recolección del alga *Gymnogongrus tenuis*.

El alga recolectada fue transportada en una cava con hielo hasta su refrigeración en el Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos, en la Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. El alga se limpió de manera manual utilizando un cepillo de cerdas suaves para así eliminar la arena y otros residuos; esta se dejó secar por tres días a temperatura ambiente en sombra.

5.3 Aislamiento e identificación de los metabolitos

La muestra una vez seca se pesó y se pulverizó; los 222,0 g de alga fueron macerados en aproximadamente 800 mL de metanol por 72 h, para luego ser decantado y filtrado. La solución remanente fue destilada a presión reducida, a una temperatura que no sobrepasó los 45 °C. Todo este proceso se repitió 4 veces para así obtener el extracto metanólico más sales, con una coloración verde intensa y una masa de 31,43 g. Para separar las sales del extracto, se disolvió el mismo en la mínima cantidad de MeOH y luego se filtró al vacío; obteniendo así 16,24 g de extracto metanólico. El procedimiento experimental realizado para el análisis del alga se muestra en la Figura 6.

El extracto metanólico seco obtenido fue disuelto en 120 mL de una mezcla 1:1 MeOH-H₂O, para después hacer particiones sucesivas con los siguientes solventes: 185 mL de hexano, 240 mL de CH₂Cl₂ y 170 mL de AcOEt; cada partición se realizó tres veces, los volúmenes reportados son la suma de los volúmenes utilizados por cada partición. La fracción de Hexano, de color verde rojizo, la fracción de CH₂Cl₂, de color verde, y la fracción de AcOEt, de color amarillo, fueron secados utilizando sulfato de magnesio, se destilaron a presión reducida y se obtuvo la masa de cada fracción y el rendimiento en función del material seco de *G. tenuis*, lo cual se reporta en la Tabla 1.

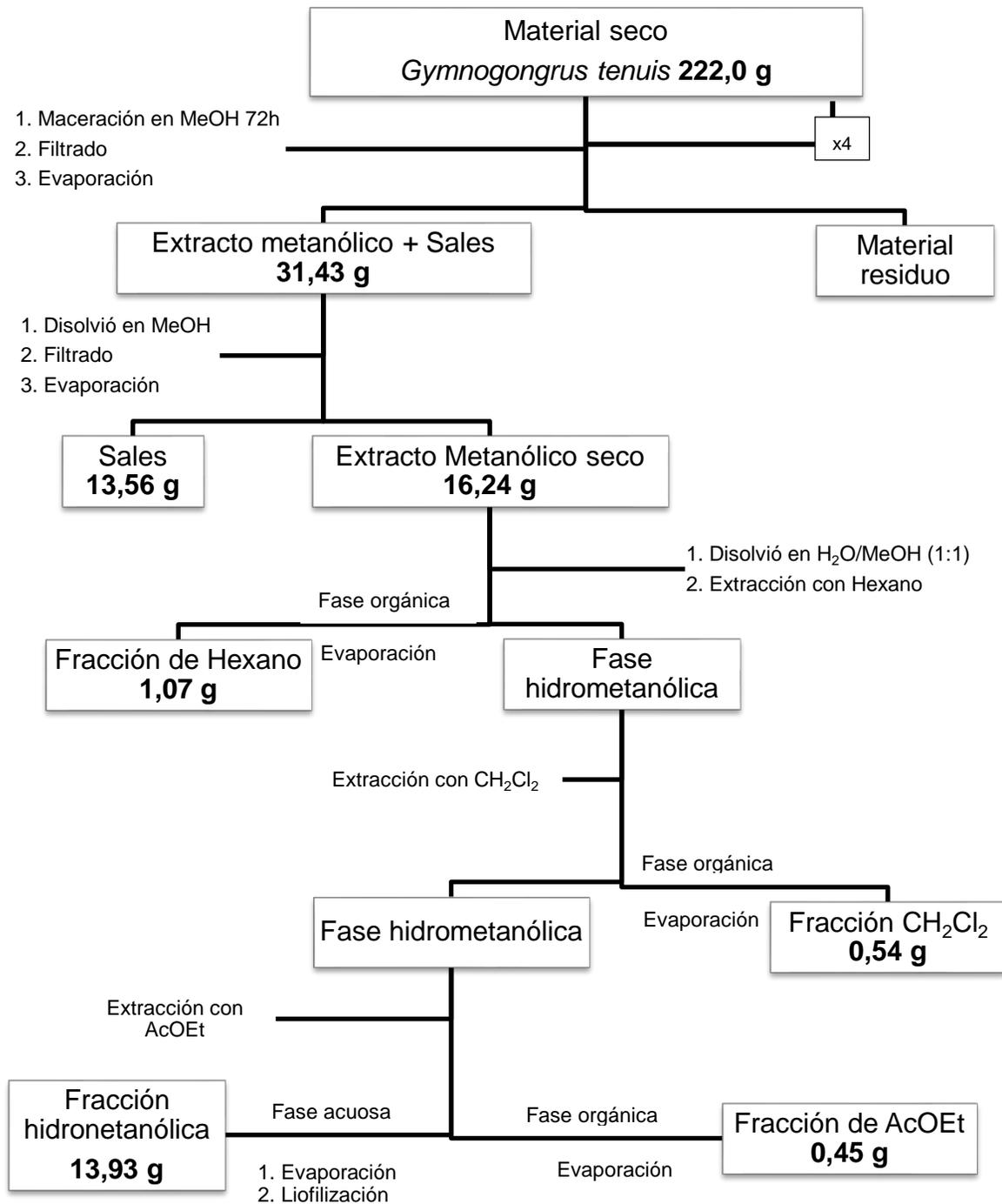


Figura 6. Procedimiento experimental para aislamiento de compuestos mayoritarios.

Tabla 1. Masa de las fracciones obtenidos del alga *Gymnogongrus tenuis*.

Fracciones	Masa \pm 0,03 (g)	Rendimiento (%) Biomasa	Rendimiento (%) Ext MeOH
Hexano	1,07	0,48	6,59
CH ₂ Cl ₂	0,54	0,24	3,33
AcOEt	0,45	0,20	2,77
Hidrometanólico	13,93	6,27	85,78
Total	15,99	7,20	98,46

Una vez obtenido todas las fracciones, se procedió a realizar la separación y purificación de los metabolitos mayoritarios presentes en cada uno de ellos, utilizando técnicas cromatográficas. El procedimiento experimental realizado en cada fracción se describe a continuación:

5.3.1 Fracción de Hexano

Se utilizó cromatografía en capa fina (CCF) para estudiar de forma preliminar la fracción de hexano. Se observó presencia de clorofila, como era de esperarse por la coloración de la fracción, visible bajo lámpara UV y presencia de colas y manchas que se solapaban, donde se podía distinguir claramente varias manchas azules, especialmente una azul índigo predominante, con *p*-anisaldehído.

Se separó la clorofila de la fracción utilizando una mezcla masa/masa 2:1 carbón activado-Celita. La fracción de hexano, 1 g, se disolvió en el menor volumen de CH₂Cl₂ y fue eluída con dicho solvente, obteniendo así un líquido de color ámbar. Se utilizó CCF para evaluar el final de la separación; una vez terminada la elución con CH₂Cl₂, se procedió a agregar 50 mL de MeOH para eluir todo el material que pudiera haber quedado en la columna que no fuera clorofila. Las dos fracciones obtenidas, CH₂Cl₂ y

MeOH, fueron destiladas a presión reducida, obteniendo así las masas y el rendimiento que se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Masa de las fracciones obtenidas de la columna Carbón activado-Celita de la fracción de Hexano.

Fracciones	Masa \pm 0,3 (mg)	Rendimiento (%)
GtHF _C	303,0	28,32
GtHF _M	80,4	7,51
Masa total	383,4	35,83

Utilizando CCF se analizaron las fracciones obtenidas; en la fracción de MeOH (GtHF_M) se obtuvieron manchas solapadas con presencia de colas, que no se pudieron separar bajo ninguna condición cromatográfica. La fracción de CH₂Cl₂ (GtHF_C) presentó una mancha color azul índigo con *p*-anisaldehído, en conjunto con otras manchas de colores entre azul y violeta. Para la separación de los compuestos mayoritarios, se realizó una cromatografía en columna (CC) fase normal.

Para la CC se utilizaron 15 g de sílica-gel, que se empacaron con 100 mL de mezcla 8:2 hexano-AcOEt. Se sembraron 303 mg de GtHF_C disueltos en el menor volumen de hexano. La columna se eluyó utilizando hexano, acetato de etilo, metanol y mezclas de los mismos en distintas proporciones, en un gradiente de polaridad ascendente. Se colectaron 268 fracciones, las cuales se unieron de acuerdo a sus factores de retención y el color revelado con *p*-anisaldehído en CCF. En la Tabla 3 se muestran las distintas fases móviles utilizadas en la separación cromatográfica y la masa de las fracciones unidas.

Tabla 3. Masa de las fracciones obtenidas de la CC fase normal de GtHFC.

Sistema de solventes	Volumen de Fase Móvil \pm (1 mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas \pm 0,3 (mg)
8:2 Hex-AcOEt	200	1-4	GtHF _C A	63,8
		5-7	GtHF _C B	59,5
		8-13	GtHF _C C	20,6
		14-43	GtHF _C D	38,8
7:3 Hex-AcOEt	200	44-69	GtHF _C E	10,9
6:4 Hex-AcOEt	200	70-89	GtHF _C F	6,0
1:1 Hex-AcOEt	250	90-113	GtHF _C G	9,7
7:3 AcOEt-Hex	210	114-139	GtHF _C H	8,4
AcOEt	400	140-241	GtHF _C I	37,0
9:1 AcOEt-MeOH	200	242-268	GtHF _C J	34,2

En la fracción GtHF_CB se obtuvo un sólido cristalino blanco-transparente, con un sólido marrón. Al agregar metanol a la fracción, se observó que el sólido marrón era soluble y el sólido cristalino era parcialmente soluble; es por ello que se decidió separar ambos sólidos con metanol frío. De esta manera se purificó el sólido cristalino, obteniendo 10 mg, el cual por CCF da una mancha de color azul índigo con *p*-anisaldehído. Este sólido, **Compuesto I**, se disolvió en cloroformo deuterado, y se analizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Al realizar las CCF de las fracciones GtHF_CD, GtHF_CE, GtHF_CF y GtHF_CG, se identificó un compuesto que revelaba azul con *p*-anisaldehído presente en las cuatro fracciones; por ello se decidió unir dichas fracciones (GtHF_CD-G) y realizar una CC fase

normal para aislar ese compuesto. Dicha columna se empacó con 10 g de sílica-gel y la mezcla de solventes 9:1 Hex-AcOEt, sembrando 63,7 mg de la mezcla de las fracciones y eluyendo con diferentes proporciones de mezcla hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron 10 mg del **Compuesto II** para ser caracterizado. Este fue disuelto en cloroformo deuterado y se analizó por cromatografía de gases acoplado a masas y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

5.3.2 Fracción de Diclorometano

Al igual que con la fracción de hexano, la CCF permitió observar la presencia de una variedad de manchas solapadas, con colas y una alta presencia de clorofila. Por ello, se aplicó el mismo procedimiento experimental de eliminación de la clorofila utilizado para la fracción de hexano. Se obtuvo, nuevamente, una fracción de CH_2Cl_2 y una de MeOH, las cuales fueron destiladas a presión reducida, obteniendo así las masas y el rendimiento que se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Masa de las fracciones obtenidas de la columna Carbón activado-Celita de la fracción de Diclorometano.

Fracciones	Masa $\pm 0,3$ (mg)	Rendimiento (%)
GtDF _C	89,1	16,5
GtDF _M	34,1	6,3
Masa total	123,2	22,8

Se analizaron ambas fracciones obtenidas mediante CCF fase normal, y se observó que la fracción de metanol estaba contenida en la fracción de diclorometano, es decir, las manchas presentes en GtDF_M se encontraban también presentes en GtDF_C, por lo cual se unieron dichas fracciones en una sola que se denominó GtD. A

esta fracción se le realizó una CC fase normal, buscando la separación de algunos de los compuestos observados en CCF. Se sembraron 90,2 mg de GtD disuelto en diclorometano, en una columna empacada con 10 g de sílica-gel y 50 mL de hexano. Se obtuvieron 161 fracciones, las cuales fueron eluidas con un sistema de mezcla de solventes hexano-AcOEt de polaridad ascendente; éstas se unieron de acuerdo a sus factores de retención y el color revelado con *p*-anisaldehído en CCF. En la Tabla 5, se muestran las fases móviles que se usaron en la CC fase normal y las masas de las fracciones unidas.

Tabla 5. Masa de las fracciones obtenidas de la CC fase normal de GtD.

Sistema de solventes	Volumen de Fase Móvil ± (1 mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas 0,3 (mg) ±
9:1 Hex-AcOEt	50	1-6	GtDa	8,4
		7-12	GtDb	4,9
		13-15	GtDc	2,2
8:2 Hex-AcOEt	50	16-18	GtDd	2,8
		19-25	GtDe	3,5
		26-32	GtDf	6,0
		33-38	GtDg	4,9
7:3 Hex-AcOEt	50	39-41	GtDh	6,3
		42-51	GtDi	5,7
		52-59	GtDj	14,9
6:4 Hex-AcOEt	50	60-70	GtDk	6,6
1:1 Hex-AcOEt	50	71-100	GtDl	11,1
6:4 AcOEt-Hex	50	101-161	GtDm	7,9
7:3 AcOEt-Hex	50			
8:2 AcOEt-Hex	50			

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por CCF y debido a la poca cantidad de masa y a la poca separación que había entre las manchas de cada fracción, se decidió no seguir analizando, ni intentar aislar ningún compuesto, ya que esto no se podía realizar con las técnicas y equipos que se encuentran en el laboratorio.

5.3.3 Fracción de Acetato de Etilo

Al estudiar la fracción de acetato de etilo, se buscó un solvente en donde fuera soluble; al utilizar MeOH se obtuvo un líquido amarillo con un sólido blanco finamente dividido. Se decidió separar el líquido del sólido centrifugando la mezcla y luego trasvasando el líquido a un vial, Figura 7.

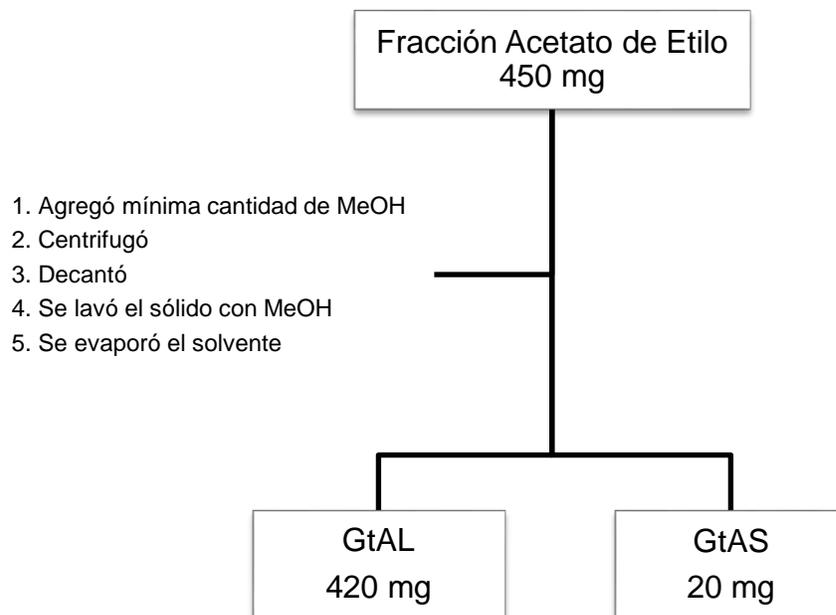


Figura 7. Procedimiento experimental para obtención de la fracción GtAL.

La fracción separada en el vial, GtAL, se analizó por CCF fase normal y fase reversa, utilizando distintas mezclas de fases móviles; además, se utilizaron distintos reveladores como: Cámara de Yodo, Dragendorff, Ninhidrina, *p*-anisaldehído y timol, para observar que tipo de compuestos que se encontraban en la mezcla. Se observaron, en este estudio preliminar, varias manchas y colas con *p*-anisaldehído, un punto azul claro con revelador de timol, y un punto con un Rf mayor que revelaba rojo con timol, azul con *p*-anisaldehído y morado con ninhidrina. Debido a las separaciones observadas en cromatografía capa fina fase normal y fase reversa, se propuso realizar una columna de separación por exclusión molecular Sephadex LH-20, utilizando, aproximadamente, la mitad de la fracción. De esta columna se obtuvieron 79 subfracciones, las cuales se analizaron por CCF fase normal utilizando tres reveladores, *p*-anisaldehído, timol y ninhidrina, y se agruparon en fracciones, como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Masa de las fracciones obtenidas de la sephadex LH-20 de GtAL.

Fase de elución	Subfracciones	Fracciones	Masas ± 0,3 (mg)
MeOH	1-11	GtAL α	6,5
	12-19	GtAL β	55,8
	20-27	GtAL γ	29,0
	28-79	GtAL δ	20,4

Todas las fracciones obtenidas fueron analizadas por CCF fase reversa y fase normal, la fracción GtAL α poseía una mezcla compleja de manchas con *p*-anisaldehído y poca masa, por lo cual se decidió no continuar su análisis; lo mismo se decidió con GtAL δ que poseía una mezcla compleja de manchas y colas con *p*-anisaldehído. En GtAL β se observaron manchas azules y colas con *p*-anisaldehído, donde se identificó una donde podía ser posible su separación, es por ello que, considerando la cantidad

de masa presente, se decidió hacer una columna fase reversa RP₁₈, de la cual se obtuvieron 14 fracciones, como se expresa en la Tabla 7.

Tabla 7. Masa de las fracciones de la CC fase reversa RP18 de GtAL β .

Sistema de solventes	Volumen de Fase Móvil \pm (1 mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas \pm 0,3 (mg)
1:1 MeOH-H ₂ O	15	1-4	GtAL β 1	28,1
		5	GtAL β 2	0,5
		6	GtAL β 3	0,4
		7	GtAL β 4	0,4
MeOH	20	8-10	GtAL β 5	4,2
		11-14	GtAL β 6	0,6

La fracción GtAL β 1 mostró con CCF fase normal y fase reversa una mezcla compleja de manchas con *p*-anisaldehído. No se pudo aislar ningún compuesto de GtAL β .

Los dos compuestos que revelaron con timol se encontraron en la fracción GtAL γ , por lo cual se propuso una columna fase reversa RP₁₈, en la cual se obtuvieron 20 subfracciones que se agruparon como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Masa de las fracciones de la CC fase reversa RP18 de GtAL γ .

Sistema de solventes	Volumen de Fase Móvil \pm (1 mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas \pm 0,3 (mg)
H ₂ O	10	1-4	GtAL γ 1	1,3

8:2 H₂O-MeOH	5	5	GtALy2	4,8
6:4 H₂O-MeOH	5	6	GtALy3	6,6
		7	GtALy4	0,3
6:4 MeOH-H₂O	5	8-10	GtALy5	0,7
8:2 MeOH-H₂O	5	11-14	GtALy6	0,2
MeOH	10			

El compuesto que reveló con timol, *p*-anisaldehído y ninhidrina, se encontró en GtALy1 de forma pura, y en GtALy2 contaminado. Debido a la poca masa que se obtuvo, se decidió buscar condiciones en CCF fase reversa para poder aislar este compuesto de la mitad de la fracción GtAL guardada. Se realizó una columna fase reversa RP₁₈, sembrando 180 mg de la fracción, obteniendo 20 fracciones, como se puede observar en la Tabla 9.

Tabla 9. Masa de las fracciones de la CC fase reversa RP18 de GtAL.

Sistema de solventes	Volumen de Fase Móvil ± (1 mL)	Subfracciones	Fracciones	Masas ± 0,3 (mg)
H₂O	15	1-12	GtALΩ	48
1:1 H₂O-MeOH	5	13-15	GtALΨ	---
MeOH	10	16-20	GtALX	---

El compuesto se logró aislar de GtAL y se analizó espectroscópicamente, la data espectral obtenida no permitió la identificación de dicho compuesto.

5.3.4 Fracción Hidrometanólica

Esta fracción se analizó de igual manera por cromatografía capa fina fase reversa. Para ello, se tomó una pequeña parte de este sólido de color caramelo, olor dulce, consistencia gomosa y altamente higroscópico, y se disolvió en agua destilada. Las placas realizadas se revelaron con *p*-anisaldehído, timol y ninhidrina, obteniendo un sólo punto azul claro con timol.

A este compuesto se le llamo **Compuesto III** y se analizó espectroscópicamente.

5.4 Modelo de Pez cebra

5.4.1 Obtención del pez cebra adulto

Los peces cebras adultos que se utilizaron en este estudio fueron obtenidos de una casa comercial. Una vez trasladados al laboratorio, fue necesario un proceso de adaptación previo a su incorporación al acuario; para esto se introdujo el medio de transporte, empaque de plástico cerrado, dentro del acuario por 5 minutos, para así equilibrar la temperatura del agua dentro del empaque con el agua del acuario. Posteriormente, se procedió a abrir el empaque para promover el intercambio gaseoso con el ambiente. Inmediatamente se agregó agua del acuario dentro del medio de transporte de los peces y se dejó reposar por 10 minutos; este proceso debió realizarse dos veces más, manteniendo en observación el comportamiento de los peces, debido a que estuvieron sujetos a un cambio de temperatura, pH y nutrientes. Una vez transcurridos 30 minutos, los peces fueron liberados en el acuario con la ayuda de una malla. El acuario del laboratorio, donde se mantienen los peces, es de vidrio de 120 cm de largo, 30 cm de alto y 50 cm de profundidad; posee un filtro interno de carbón activado y un aireador para la oxigenación del agua. Los peces fueron alimentados tres veces al día, con alimento en hojuelas para peces (Kantal® S.A.).

5.4.2 Obtención de los huevos y las larvas del pez cebra

Para obtener los huevos y las larvas, se utilizaron ejemplares adultos del pez cebra, posterior a los 20 días del período de acondicionamiento. Mediante un ciclo de luz-oscuridad de 16 y 8 horas, respectivamente, se indujo la puesta de los huevos; esto se realizó con una lámpara de 11 vatios FLC (lámpara fluorescente compacta) y manteniendo una temperatura entre los 21 y 25 °C. Los peces cebra hembras liberan

los huevos en el agua, los cuales fueron fecundados por los peces cebra machos; los huevos caen por gravedad al fondo del acuario, donde se encuentra una malla que evita que sean consumidos por los peces adultos. Una vez extraídos los huevos, estos fueron lavados y colocados en cápsulas de Petri e incubados a una temperatura de 28 °C, hasta que alcanzaron los 5 días post-fecundación.

5.4.3 Estudios preliminares de la toxicidad aguda del extracto metanólico del alga *G. tenuis*.

Para la evaluación de toxicidad aguda, se tomó 1 g del extracto metanólico crudo, sin sales, y se disolvió en una solución acuosa de DMSO al 0,1%; obteniendo así una solución madre de concentración 100 µg/mL. Se realizó el ensayo evaluando el efecto del extracto metanólico del alga *G. tenuis* a diferentes concentraciones 100, 75, 50 y 25 µg/mL, con la incorporación de dos controles, agua destilada y solución DMSO al 0,1%. Para esto se utilizó una placa de 12 pozos, de 2 mL de capacidad. Se agregaron las soluciones de diferentes concentraciones y se colocaron 3 larvas en cada pozo. Se realizaron observaciones a la hora y a las 24 horas, analizando las larvas bajo el microscopio estereoscópico, realizando un registro de cambios morfológicos y/o conductuales, al igual que la presencia de larvas muertas.

Una vez analizados los resultados obtenidos en el ensayo, y en consulta con los especialistas del Laboratorio de Microscopía del Instituto Anatómico “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina; se propuso un estudio adicional complementario no conclusivo, que consistió en el tratamiento de las larvas con calceína, el cual es un marcador fluorescente que permite detectar presencia de calcio. Para ello, se agregó una pequeña cantidad de una solución acuosa de calceína al 0,1% en cada uno de los pozos. La placa se colocó en oscuridad y se dejó reaccionar durante 1 hora.

Transcurrido el tiempo, se observaron las larvas bajo el microscopio estereoscópico a una longitud de onda de 495 nm.

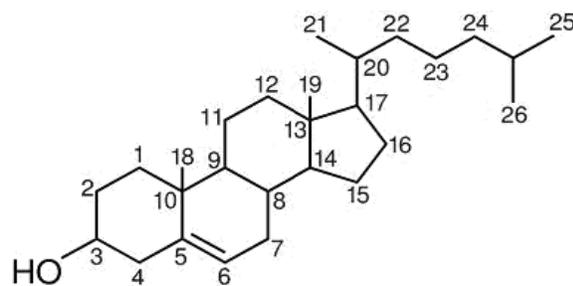
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Elucidación de los compuestos aislados

Los compuestos aislados de las fracciones de hexano e hidrometanólica, del extracto metanólico del alga *Gymnogongrus tenuis*, fueron caracterizados e identificados utilizando técnicas como: RMN de ^1H y ^{13}C , y DEPT 135 y espectrómetro de masas. Los resultados espectroscópicos obtenidos fueron, comparados con la data experimental reportada en la literatura.

En el estudio y aislamiento de los metabolitos secundarios del alga *Gymnogongrus tenuis* se obtuvieron cuatro compuestos. De la fracción de hexano, se aislaron tres compuestos, dos del tipo esteroidal y un ácido graso, y en la fracción hidrometanólica se identificó un compuesto del tipo heterósido^{xviii}.

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



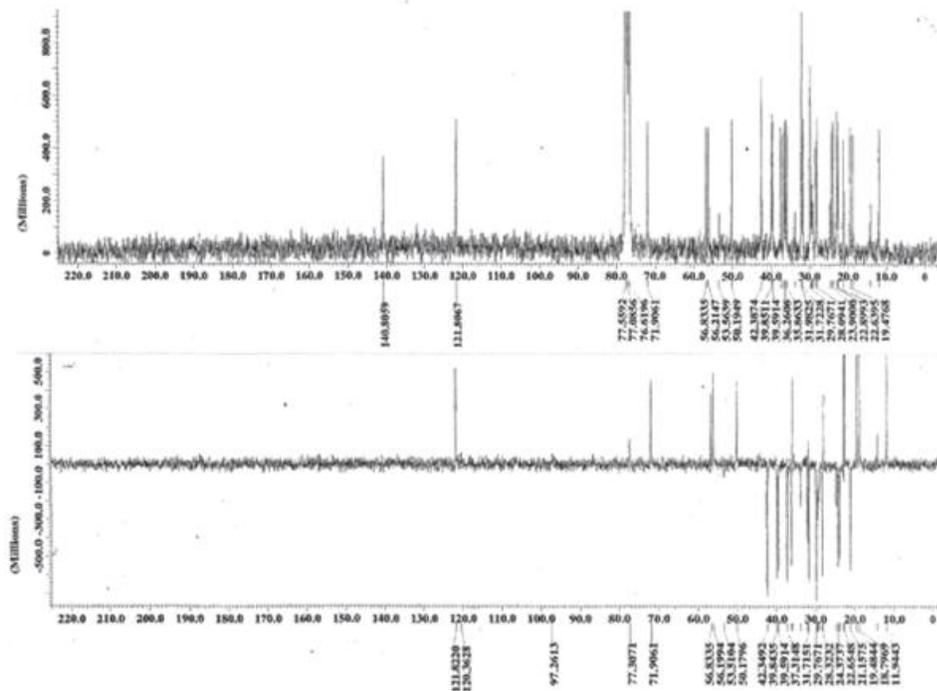
Colesterol

El **Compuesto I** fue aislado de la fracción de hexano, como un sólido blanco translucido que cristaliza en forma de agujas, y que es parcialmente soluble en MeOH.

^{xviii} Heterósido: se refiere a un glicósido que al hidrolizarse produce un no-carbohidrato y un monosacárido.

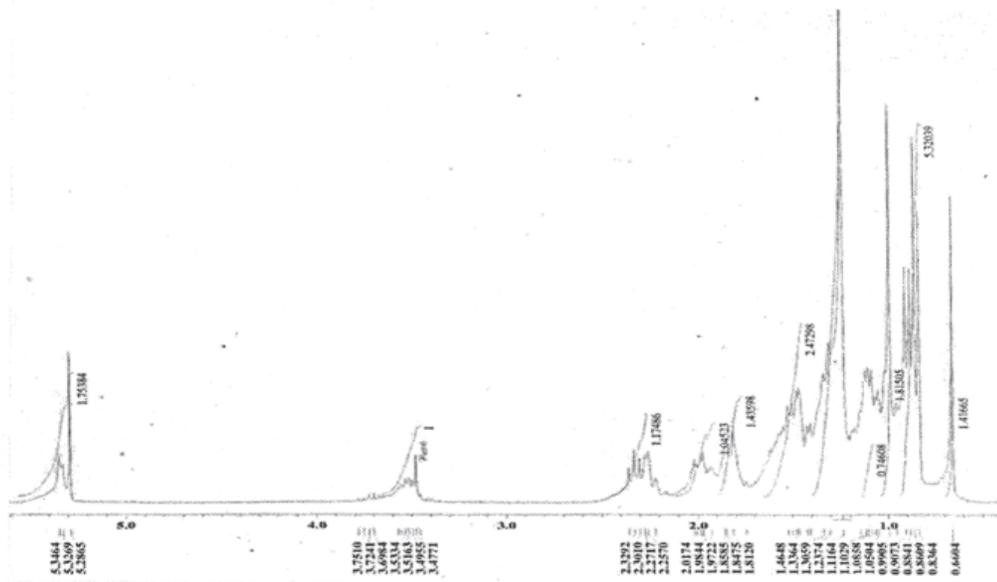
Este al ser revelado con *p*-anisaldehído en CCF, reacciona dando una coloración azul-índigo. Estos resultados indicaron la posible presencia de un estero. Se analizaron los espectros RMN de ^{13}C , DEPT-135 y ^1H , además se realizó espectrometría de masas (EM).

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 1) realizado en CDCl_3 , se observaron 27 señales, entre las cuales se destacan los picos a (140,8 y 121,8) ppm, los cuales indican presencia de un doble enlace, que corresponden al enlace entre los carbonos C5 y C6 de la molécula de colesterol; y la señal a 71,9 ppm que se encuentra en el rango característico de carbonos enlazados a oxígeno, como es el C3 del colesterol. El DEPT- 135 (Espectro 1) permitió observar el número de carbonos secundarios (11) y cuaternarios (3), los cuales corresponden a lo esperado para la molécula.



Espectro 1. RMN ^{13}C y DEPT 135 del Compuesto I.

En el espectro RMN ^1H (Espectro 2) realizado en CDCl_3 , se observa una señal a 5,32 ppm característico de un protón olefínico, lo que corrobora en la molécula la presencia de un doble enlace; dicho protón sería correspondiente al C6. Además, se observa una señal ancha a 3,49 ppm, zona donde aparecen los protones enlazados a oxígenos; esto, junto con la información del ^{13}C , indica que hay un grupo hidroxilo en la molécula. A 0,66 ppm y a 0,99 ppm se observan dos singletes que integran para tres protones cada uno, los cuales serían pertenecientes a los carbonos C18 y C19. Una señal de doblete que integra para seis protones a 0,85 ppm, con una constante de acoplamiento J de 6,6 Hz, indica presencia de metilos, C26 y C25. La señal de doblete a 0,90 ppm, integra también para tres protones, indicado presencia del metilo, C21. Los desplazamientos y asignaciones se encuentran reportados en la tabla 10 y 11, junto con los valores de la data experimental reportada para la molécula⁵⁷.



Espectro 2. RMN ^1H , Compuesto I.

Tabla 10. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Compuesto I.

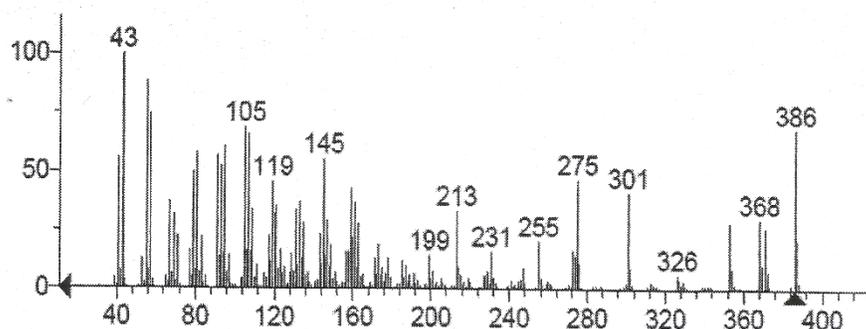
C	δC (ppm) Exp.	δC reportado(ppm)⁵⁷	Asignación
1	37,3	37,3	-CH ₂
2	31,7	31,7	-CH ₂
3	71,9	71,7	-CH-OH
4	42,4	42,4	-CH ₂
5	140,8	141,0	-C=C
6	121,8	121,8	-C=C
7	31,9	32,0	-CH ₂
8	31,8	31,7	-CH
9	50,2	50,1	-CH
10	36,6	36,5	-C-
11	21,2	21,1	-CH ₂
12	39,9	39,7	-CH ₂
13	42,4	45,5	-C-
14	56,8	56,6	-CH
15	24,4	24,3	-CH ₂
16	28,1	28,3	-CH ₂
17	56,2	56,2	-CH
18	11,9	11,8	-CH ₃
19	19,5	19,5	-CH ₃
20	35,8	35,9	-CH
21	18,8	18,7	-CH ₃
22	36,3	36,2	-CH ₂
23	23,9	23,7	-CH ₂
24	39,6	39,7	-CH ₂
25	28,1	28	-CH
26	22,6	22,8	-CH ₃
27	22,9	22,8	-CH ₃

Tabla 11. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Compuesto I.

H	δH (ppm) [mult., J (Hz)]	δH reportado(ppm) ⁵⁷	Asignación
1	1,31 (<i>m</i>)	1,30	-CH ₂
2	1,85 (<i>m</i>)	1,82	-CH ₂
3	3,51 (<i>m</i>)	3,52	-CH-OH
4	2,27 (<i>m</i>)	2,27	-CH ₂
6	5,32 (<i>m</i>)	5,35	-CH=C
7-17	1,40 - 1,74 (<i>m</i>)	1,52 - 1,98	-CH ₂
18	0,66 (<i>s</i>)	0,68	-CH ₃
19	0,99 (<i>s</i>)	1,01	-CH ₃
20	1,33 (<i>m</i>)	1,30	-CH
21	0,90 (<i>d</i>) 6,3	0,91	-CH ₃
22-25	1,11 (<i>m</i>)	1,11	-CH ₂
26-27	0,85 (<i>d</i>) 6,6	0,85	-CH ₃

Los espectros de RMN permiten confirmar que el **Compuesto I** es la molécula de Colesterol.

Se realizó, además, un espectro de masas (Espectro 3), en el cual se observó un ion molecular (m/z) de 386 $[\text{M}]^+$. La data experimental obtenida, comparada con la información en la literatura, permitió identificar que la fórmula molecular del **Compuesto I** es $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$, correspondiente al colesterol.



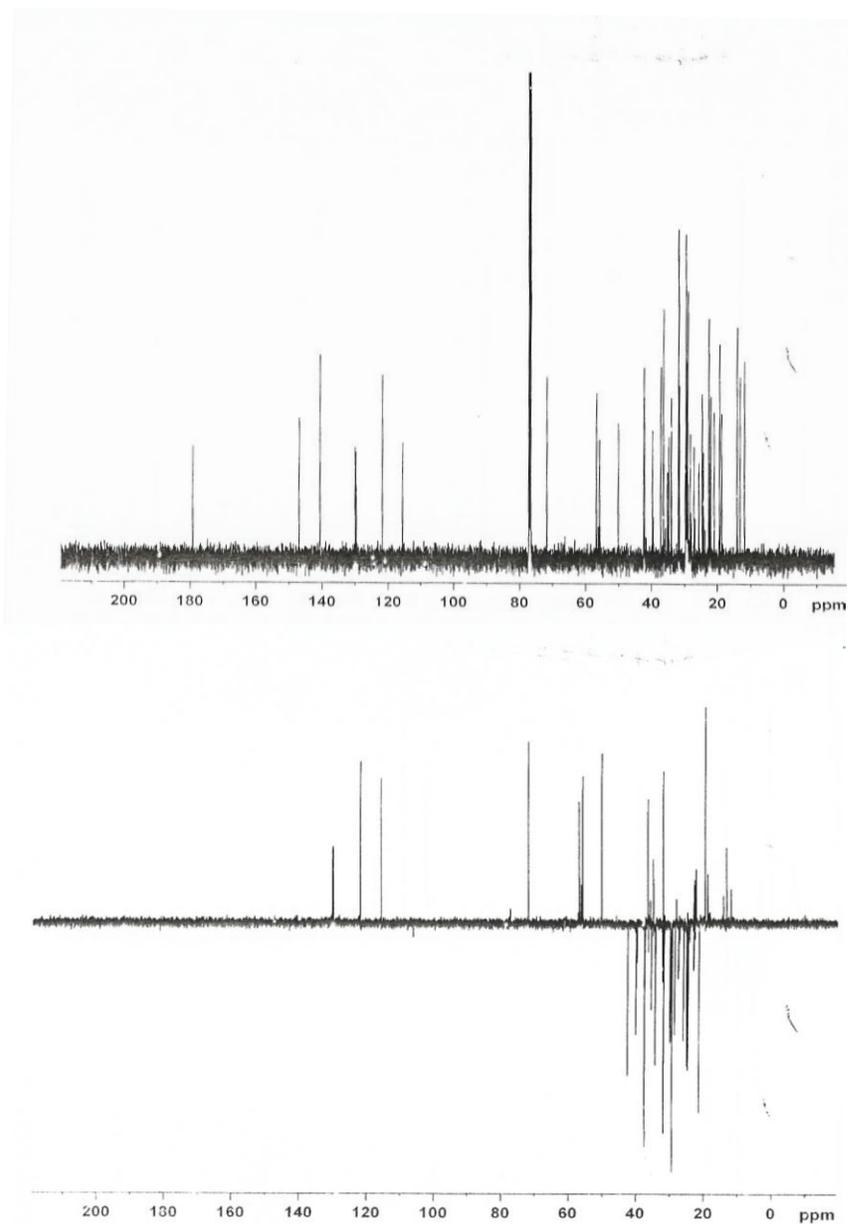
Espectro 3. Espectro de masas del Compuesto I.

6.1.2 Compuesto II: Mezcla de Fucosterol (*24E-etilidene-Colest-5-en-3-ol*), Ácido palmítico (ácido hexadecanóico) y Colesterol

Continuando con el análisis de la fracción de hexano, se obtuvieron 10 mg de un sólido amarillo claro, el cual al revelar con *p*-anisaldehído en CCF muestra una mancha blanca, que al calentar desaparece. De igual manera, una vez calentada la placa, se pudieron observar unas manchas azules. La separación de los compuestos que constituyen la mezcla compleja fue imposible de hacerse a través de las técnicas usadas en el laboratorio. La mancha blanca presente al rociar la placa con *p*-anisaldehído es característica de presencia del ácido palmítico. Las coloraciones azules obtenidas al calentar y el hecho de que estos compuestos provienen de la fracción de hexano, indican que los compuestos observados son esteroides. La evaluación por CCF de la muestra con un patrón de una mezcla compleja identificada como fucosterol, colesterol y ácido palmítico, hace sospechar de la presencia de estos esteroides y este ácido graso.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) realizado en CDCl_3 , a campo alto entre los (40 – 20) ppm se observan varias señales características de grupos metilos y a 71,8 ppm se observa una señal que indica presencia de un carbono oxigenado. Las 6 señales a campo bajo, entre los 115 y los 150 ppm son características de carbonos

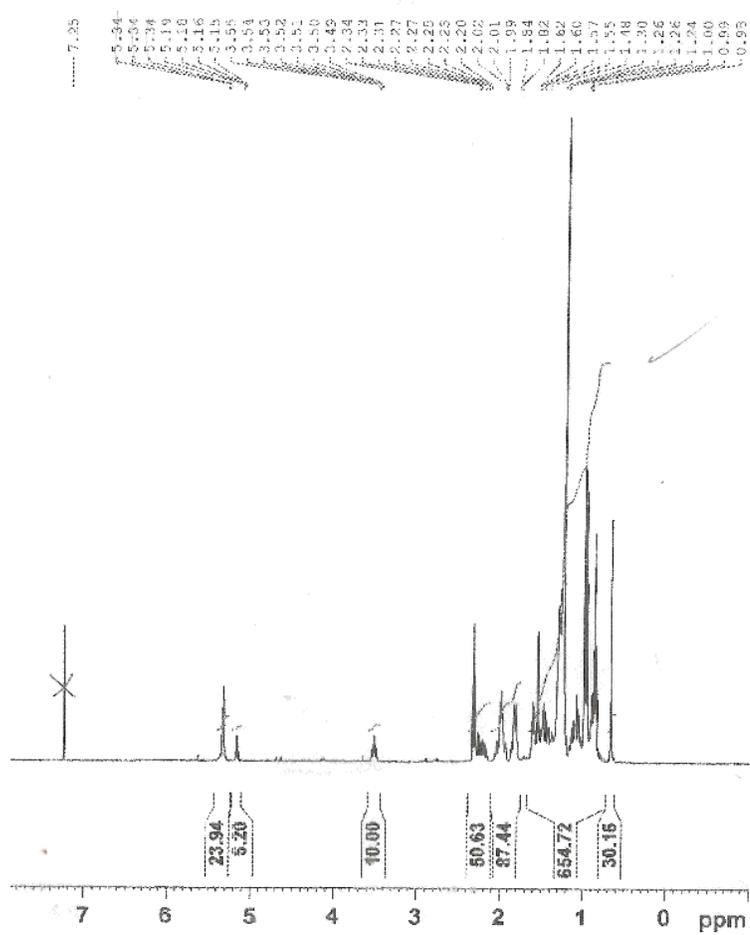
olefínicos. Esta información es característica de moléculas esteroideas, lo cual afirma que en la mezcla se encuentra una mezcla de esteroides. También, se observó a campo bajo, una señal con un desplazamiento de 179,3 ppm, el cual es característico de un carbono carbonílico, que correspondería con el carbono carbonílico del ácido graso.



Espectro 4. RMN ^{13}C y DEPT 135 del Compuesto II.

Las señales observadas a campo alto en el espectro de protones, realizado en CDCl_3 (Espectro 5), son característicos de protones pertenecientes a grupos metilos. La señal multiplete a 3,52 ppm confirma presencia de un grupo hidroxilo; de igual manera, la señal a 5,34 ppm, con una constante de acoplamiento J de 5,4 Hz, y el cuarteto a

5,17 ppm, confirman presencia de dobles enlaces. A 2,27 ppm se observa un desplazamiento característico de protones α al carbonilo.



Espectro 5. RMN ^1H , Compuesto II.

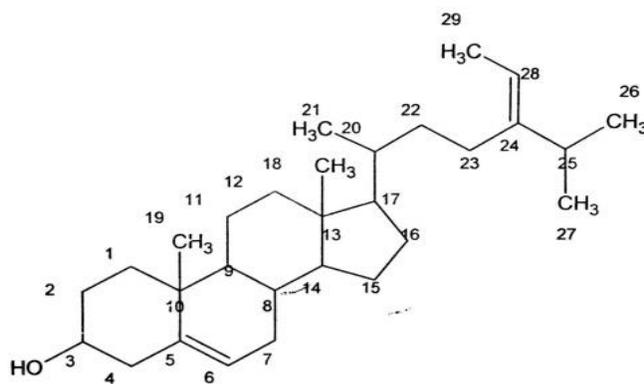
La comparación de la data espectral obtenida, con la data reportada en la literatura para el Fucosterol, Ácido Palmítico y Colesterol (previamente descrito), permitió confirmar que el **Compuesto II** es una mezcla compleja de dichos compuestos. Esta información se puede observar en las tablas 10-15.

Tabla 12. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Fucosterol.

C	δC (ppm) Exp.	δC reportado(ppm)⁵⁸	Asignación
1	37,2	37,3	-CH ₂
2	31,9	31,9	-CH ₂
3	71,8	71,8	-CH
4	42,3	42,3	-CH ₂
5	140,7	140,8	-C=C-
6	121,7	121,7	-C=C-H
7	31,5	31,6	-CH ₂
8	36,4	36,4	-CH
9	50,1	50,08	-CH
10	36,5	36,9	-C-
11	21,1	21,06	-CH ₂
12	39,7	39,7	-CH ₂
13	42,2	42,3	-CH
14	56,7	56,6	-CH
15	24,3	24,3	-CH ₂
16	28,2	28,2	-CH ₂
17	55,7	55,8	-CH
18	11,8	11,8	-CH ₃
19	19,4	19,4	-CH ₃
20	34,8	34,8	-CH
21	18,7	18,7	-CH ₃
22	35,2	35,2	-CH ₂
23	25,7	25,6	-CH ₂
24	146,7	147,0	-C=C-
25	31,9	31,9	-CH
26	22,1	22,1	-CH ₃
27	22,2	22,2	-CH ₃
28	115,5	115,5	-C=C-H
29	13,2	13,2	-CH ₃

Tabla 13. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Fucosterol.

H	δH (ppm) [mult., J (Hz)] Exp.	δH reportado(ppm) ⁵⁸	Asignación
3	3,52 (<i>m</i>)	3,52 (<i>m</i>)	-CH-OH
6	5,34 5,4	5,35 5,5	-CH=C
18	0,67 (<i>s</i>)	0,69 (<i>s</i>)	-CH ₃
19	0,98 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)	-CH ₃
21	0,99 (<i>d</i>) 6,5	0,99 (<i>d</i>) 6,6	-CH ₃
26-27	0,97 (<i>d</i>) 6,85	0,97 (<i>d</i>) 6,8	-CH ₃
28	5,17 (<i>q</i>)	5,17 (<i>q</i>)	-CH=C
29	1,56 (<i>d</i>)	1,58 (<i>d</i>)	-CH ₃



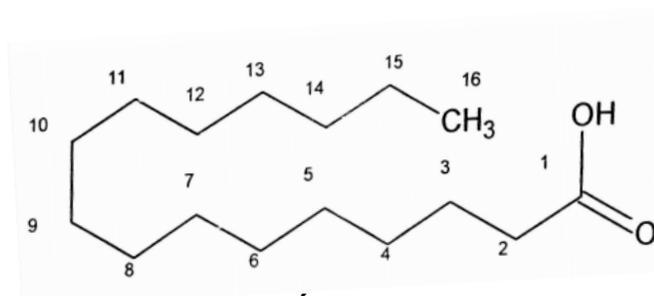
Fucosterol

Tabla 14. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Ácido Palmítico.

C	δC (ppm) Exp.	δC reportado(ppm) ⁵⁹	Asignación
1	179,3	180,7	-C=O
2	34,0	34,2	-CH ₂
3	24,4	24,7	-CH ₂
4	29,2	29,2	-CH ₂
5	29,5	29,5	-CH ₂
6-11	29,8	29,8	-CH ₂
12	29,6	29,6	-CH ₂
13	29,3	29,3	-CH ₂
14	31,9	32,0	-CH ₂
15	22,7	22,8	-CH ₂
16	13,2	13,1	-CH ₃

Tabla 15. Desplazamientos químicos del RMN ^1H del Ácido Palmítico.

H	δH (ppm) [mult., J (Hz)] Exp.	δH reportado(ppm) ⁵⁹	Asignación
2	2,27	2,26 (<i>t</i>)	-CH-OH
3	1,61	1,58 (<i>m</i>)	-CH=C
4-15	1,25	1,23-1,29	-CH ₃
16	0,87 (<i>t</i>)	0,88 (<i>t</i>)	-CH ₃



Ácido Palmítico

El **Compuesto II** fue identificado como una mezcla de tres compuestos (Esquema 6), al ser analizado por CG/EM. Uno con un tiempo de retención de 6,75 min, con un ion molecular de 256 m/z, que corresponde a una fórmula molecular de $C_{16}H_{32}O_2$, Ácido Palmítico (Espectro 7). Un segundo compuesto con un tiempo de retención de 14,37 min, ion molecular de 386 m/z que corresponde a una fórmula molecular de $C_{27}H_{46}O$, Colesterol (Espectro 8). Un último compuesto con tiempo de retención 17,78 min, ion molecular 413 m/z correspondiente a $C_{29}H_{48}O$, identificado como Fucosterol (Espectro 9).

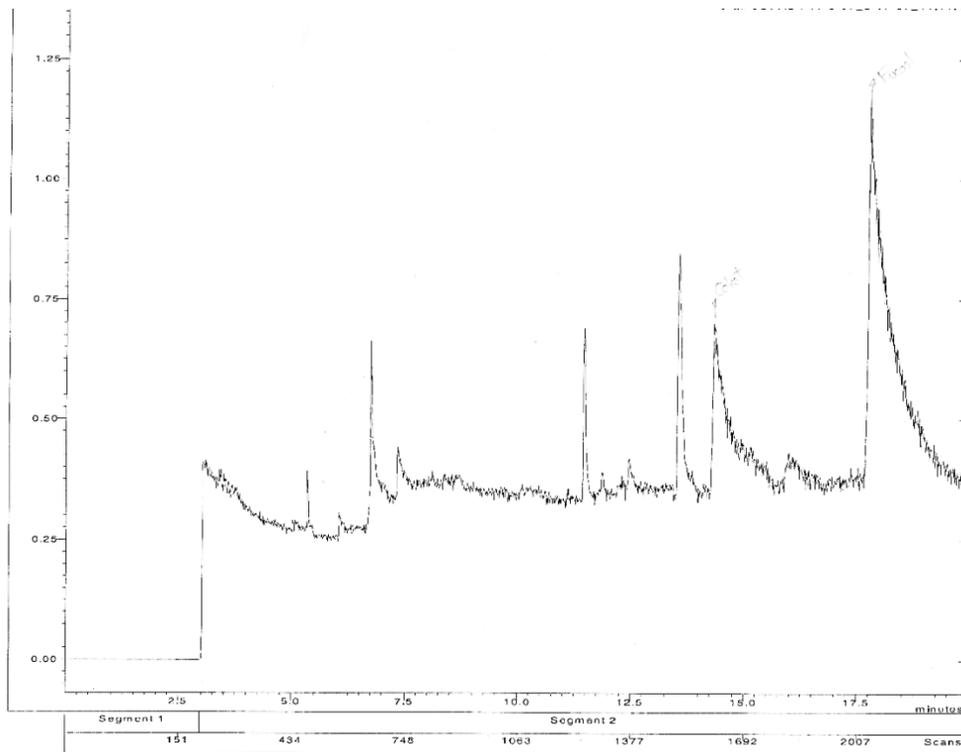
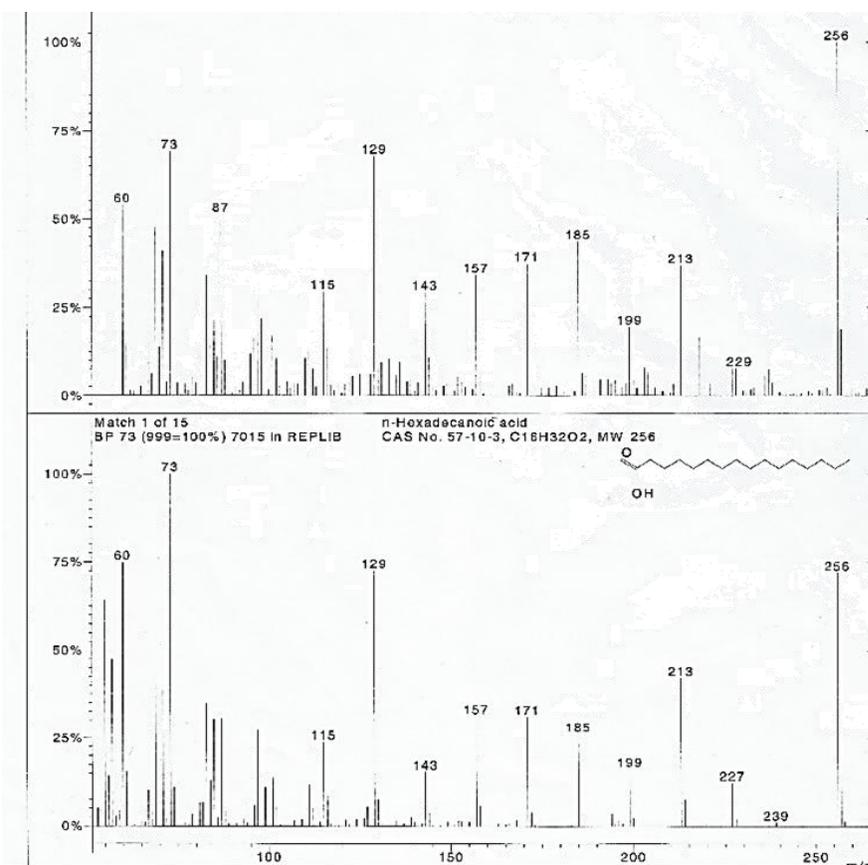
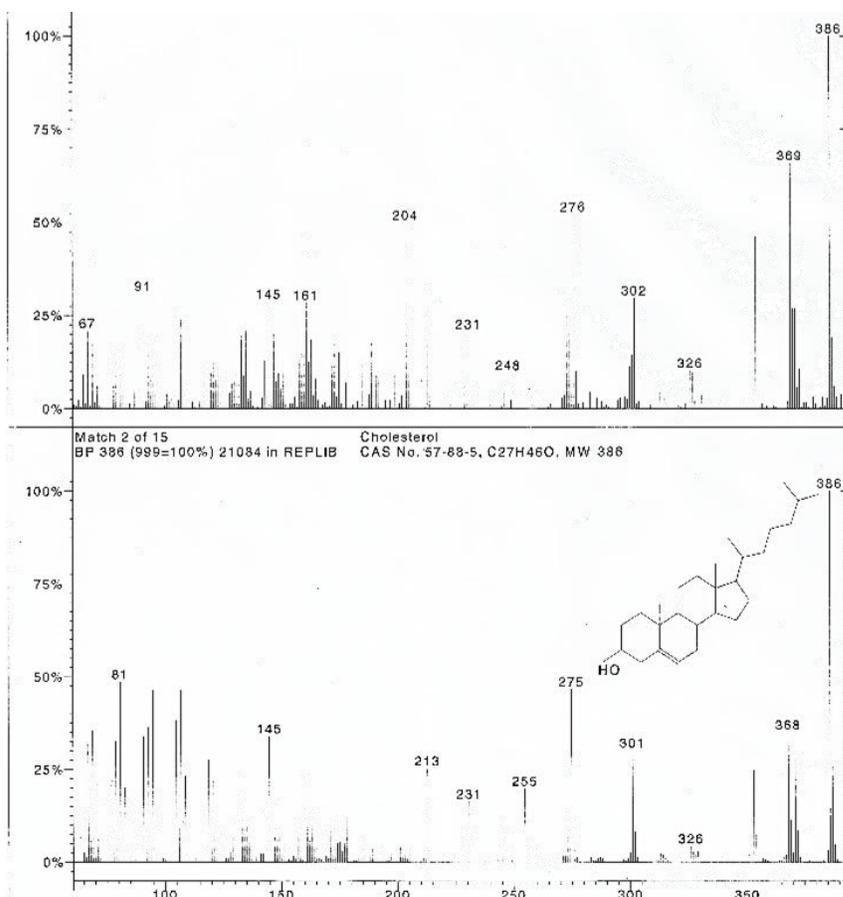


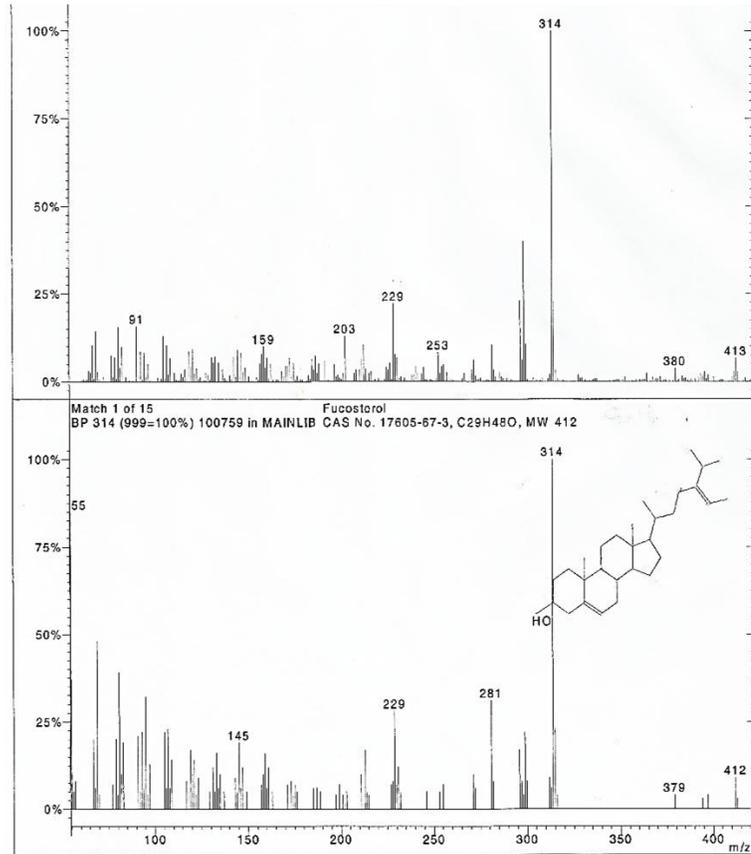
Figura 8. Cromatograma del Compuesto II.



Espectro 6. Espectro de masas del Ácido Palmítico.



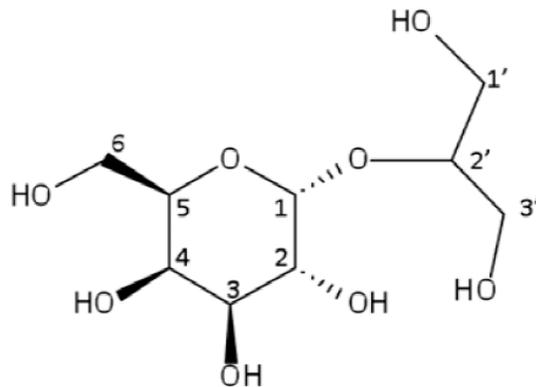
Espectro 7. Espectro de masas del Colesterol.



Espectro 8. Espectro de masas del Fucosterol.

Los compuestos esteroidales son comunes en las algas rojas, siendo el colesterol uno de los esteroides mayoritarios²¹. El colesterol ha sido reportado para algas del género *Gymnogongrus*⁴⁵, más no se encontró en la literatura reportado para *G. tenuis*. El colesterol se logró obtener puro en el Compuesto I, y se obtuvo como una mezcla en el Compuesto II. El fucosterol y el ácido palmítico, tampoco se encontraron reportados para la especie. La literatura indica que estos compuestos poseen actividades biológicas interesantes; el fucosterol posee actividad anticancerígena, antidiabética, antioxidante, antihistamínica, anticolinérgica, hepatoprotectora, reductor del colesterol en sangre, entre otras actividades importantes⁶⁰.

6.1.3 Compuesto III: Floridósido (α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerol)

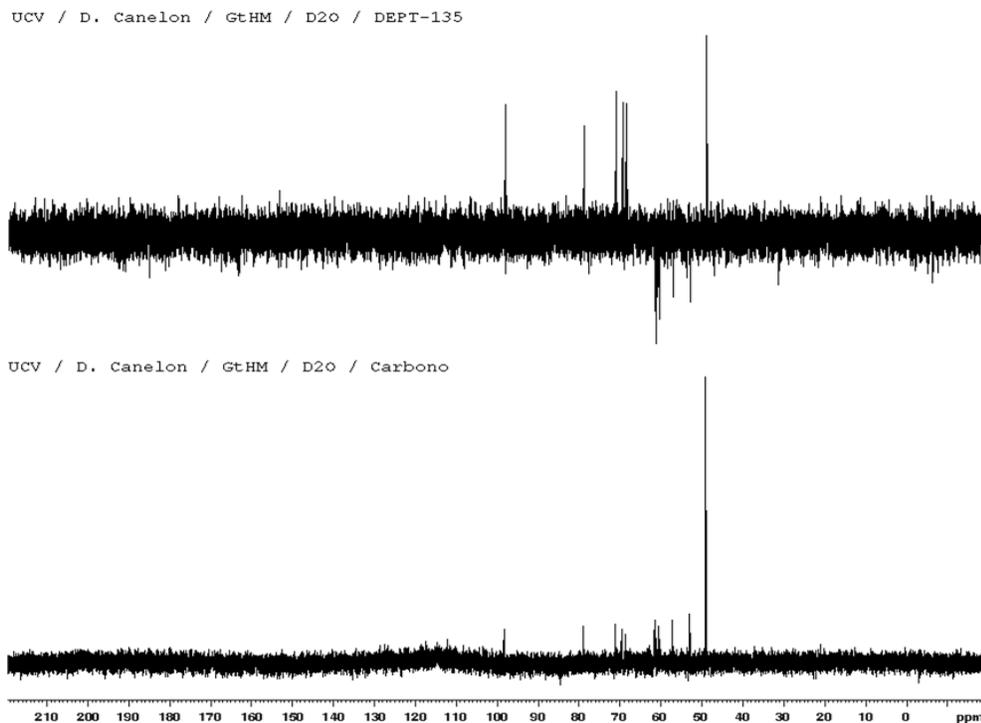


Floridósido

La fracción hidrometanólica consistió totalmente de un sólido de color arena, altamente higroscópico, soluble en agua, y que revela únicamente con timol formando una mancha azul pálido poco intensa en CCF reversa. Estos ensayos indican la presencia de un glúcido. Esta molécula representa el 85,8% del extracto metanólico sin sales y el 6,3% del material seco del alga *G. tenuis*.

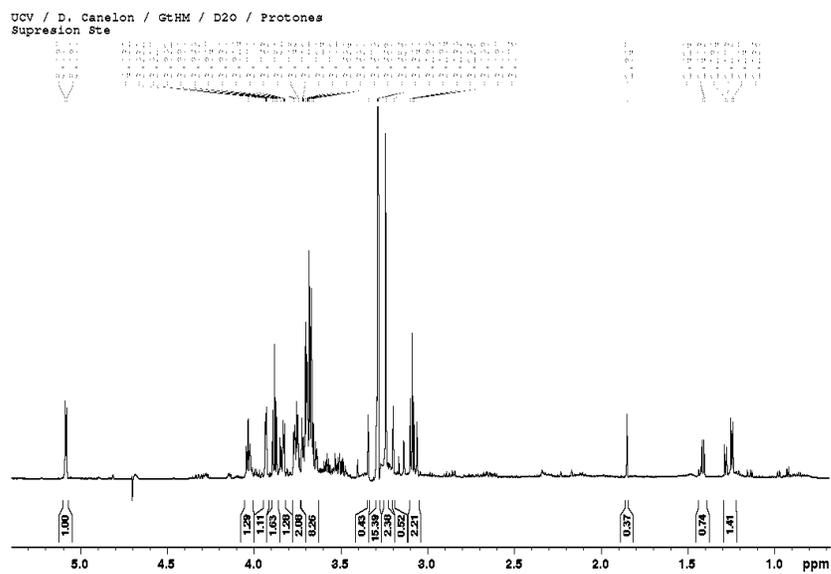
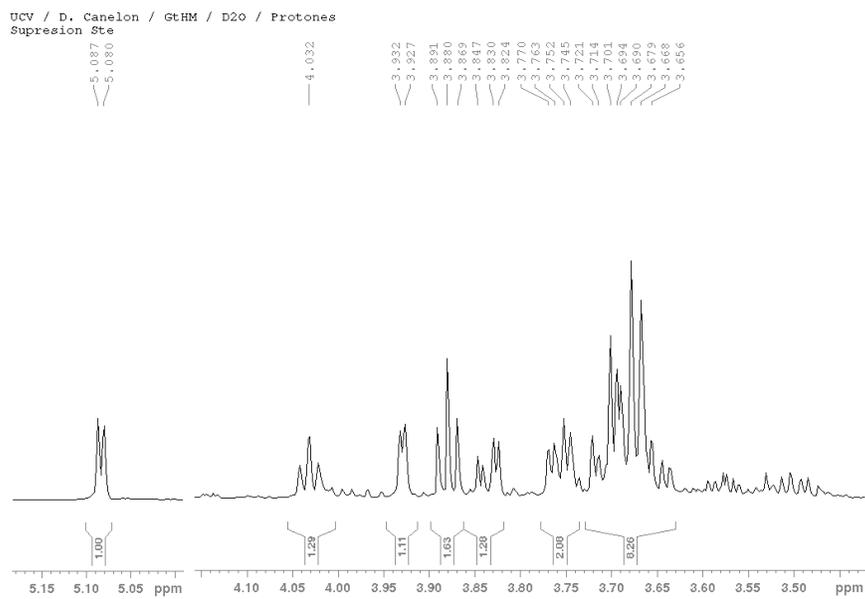
En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 10) realizado en D_2O se observaron 9 señales, en las cuales se destaca la señal a 98,1 ppm que indica presencia de un carbono anomérico, C1. Los glúcidos suelen encontrarse como estructuras cíclicas, en las que el grupo carbonilo ha formado un enlace covalente con el oxígeno de un grupo hidroxilo perteneciente a la misma cadena. La formación de estas estructuras cíclicas, produce un átomo asimétrico adicional, carbono hemiacetal o hemicetal; el cual se denomina carbono anomérico⁶¹. En la zona característica de carbohidratos, entre 60 y 80 ppm, se encuentran la gran mayoría de las señales restantes; se destaca la señal a 78,76 ppm que, de acuerdo a la literatura, corresponde al C2' perteneciente al residuo

de glicerol y el cual es característico de este compuesto⁶². La señal a 61,2 ppm y 60,4 ppm corresponden a los metilenos del residuo de glicerol.

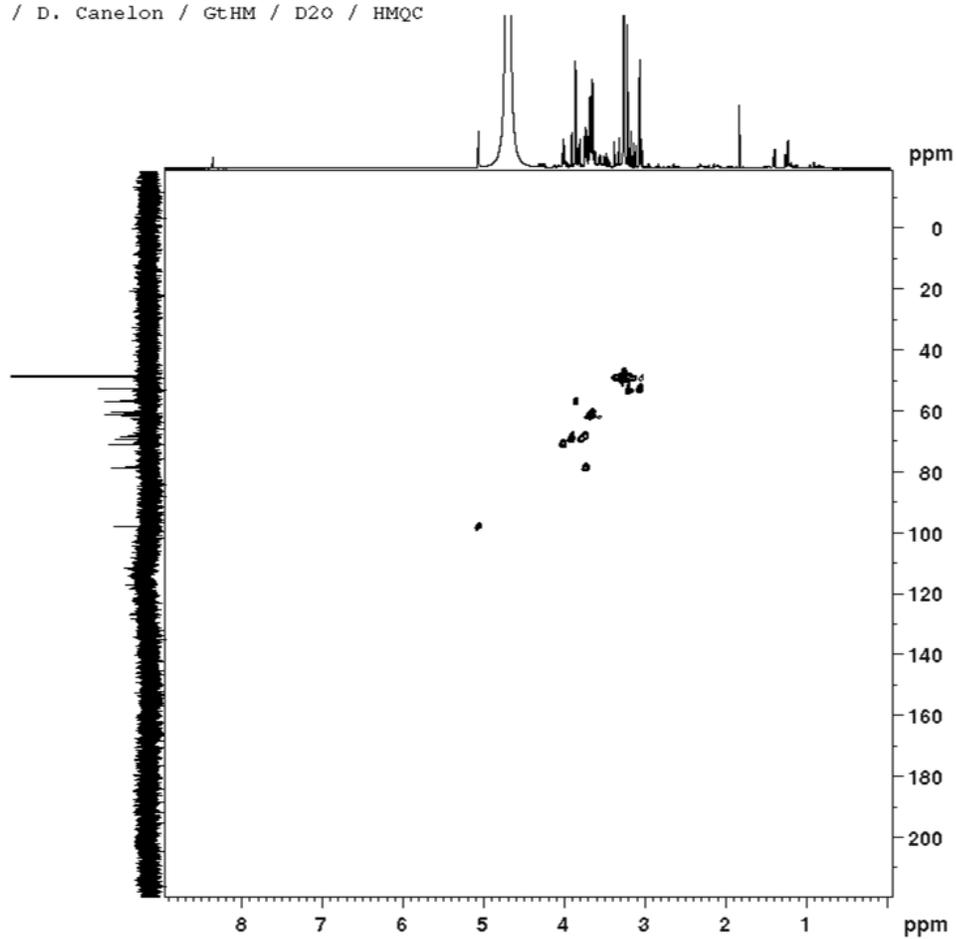


Espectro 9. RMN ^{13}C y DEPT 135 del Compuesto III.

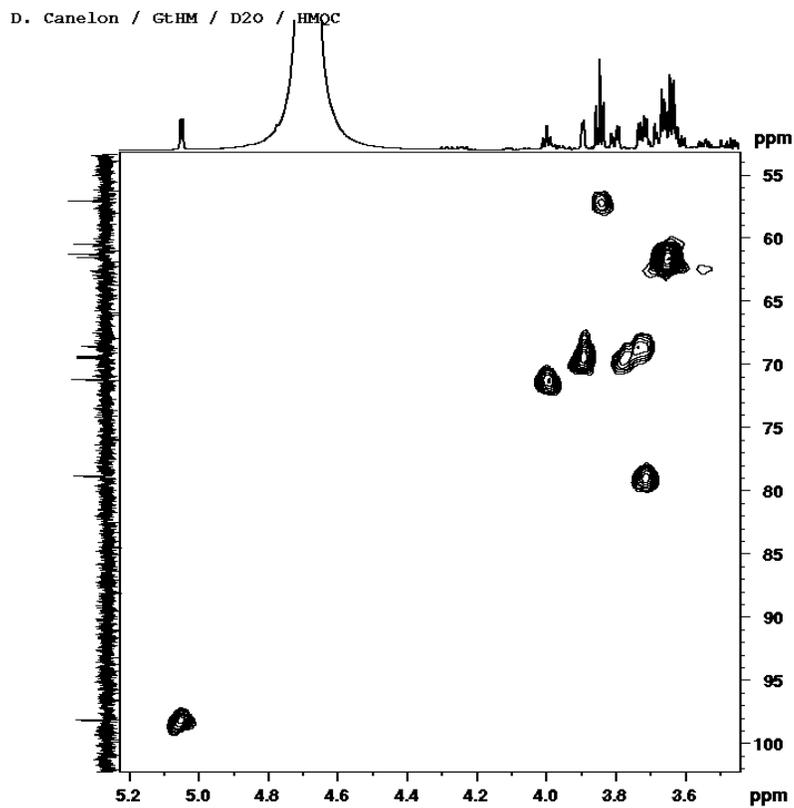
Con respecto a las señales en el espectro RMN ^1H , realizado en D_2O (Espectro 11), se observa una señal con multiplicidad doblete en 5,08 ppm perteneciente al protón del carbono anomérico. Como se observaba en el espectro de carbonos, también se encuentran varias señales en la zona característica de protones enlazados a oxígenos. Los espectros HMQC y HMBC permitieron confirmar la presencia de la molécula floridósido y asignar los protones a cada carbono. Los desplazamientos obtenidos y las asignaciones se reportan en las tablas 18 y 19, junto con la data experimental reportada en la literatura para la molécula.

Espectro 10. RMN ^1H , Compuesto III.Espectro 11. RMN ^1H Ampliación, Compuesto III.

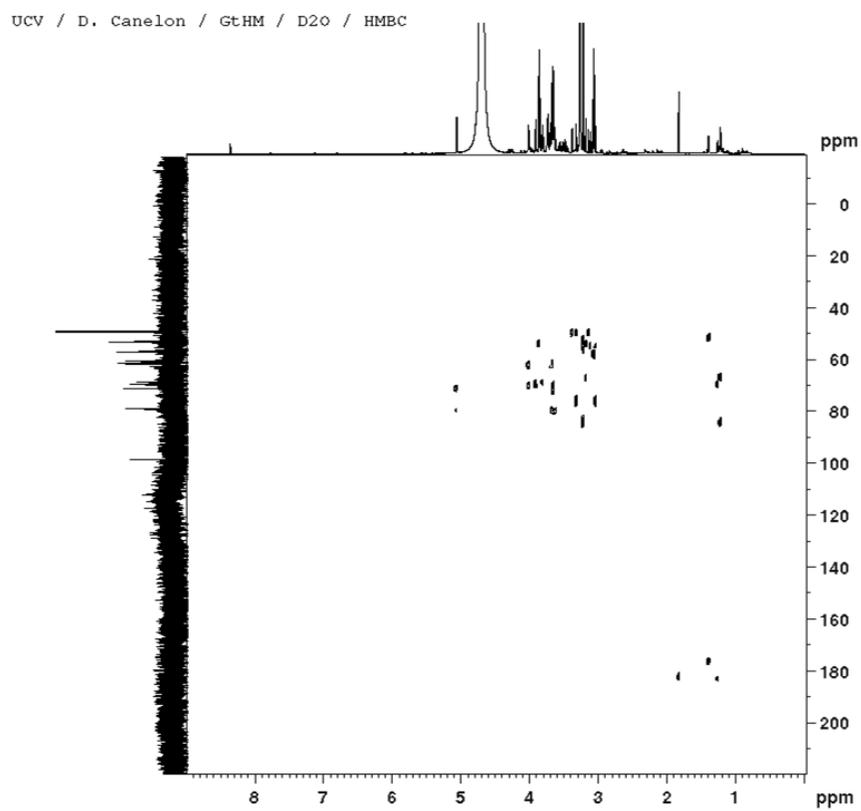
UCV / D. Canelon / GtHM / D2O / HMQC



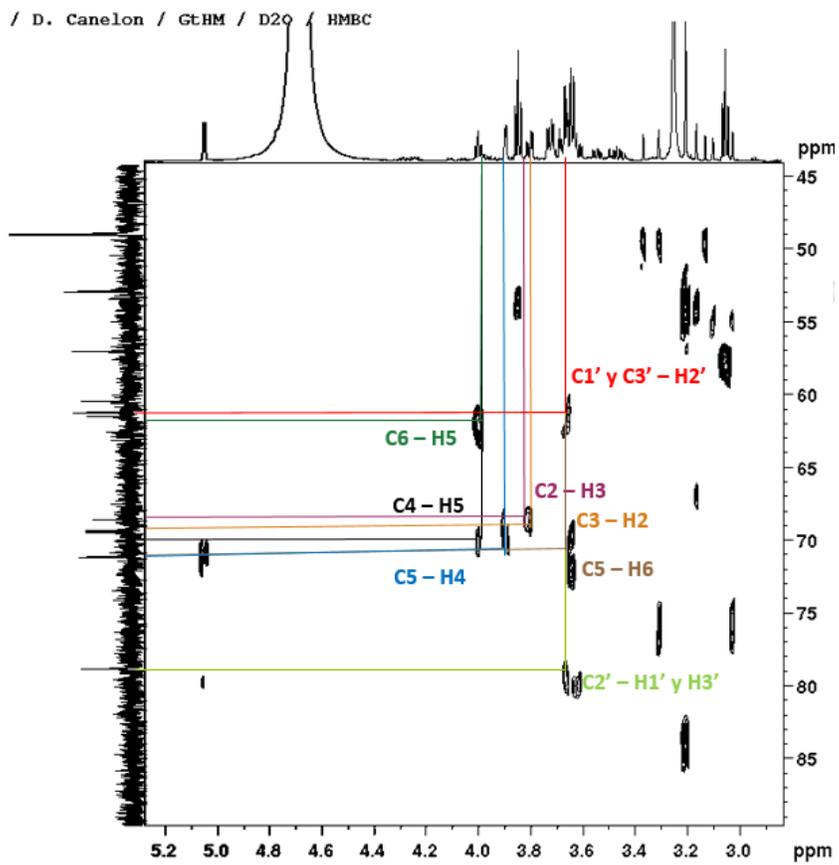
Espectro 12. RMN HMQC, Compuesto III.



Espectro 13. RMN HMQC, Ampliación, Compuesto III.



Espectro 14. RMN HMBC, Compuesto III.



Espectro 15. RMN HMBC, Ampliación, Compuesto III.

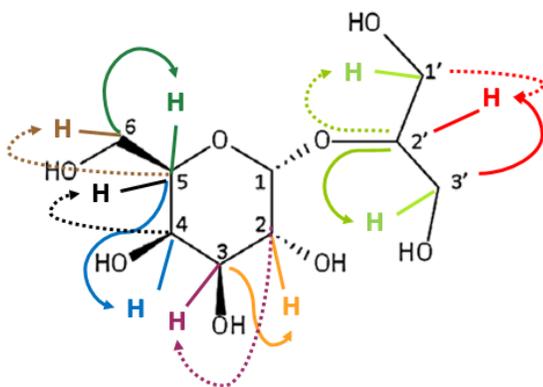


Figura 9. Correlaciones a dos enlaces, Floridósido

Tabla 16. Desplazamientos químicos del RMN ^{13}C del Compuesto III.

C	δC (ppm) Exp.	δC reportado(ppm)⁶²	Asignación
1	98,1	98,9	Anomérico
2	68,5	69,3	-CH-OH
3	69,4	70,2	-CH-OH
4	69,3	70,1	-CH-OH
5	71,1	71,9	-CH-
6	61,4	62,3	-CH ₂ -OH
1'	61,2	61,9	-CH ₂ -OH
2'	78,8	79,6	-CH-O-
3'	60,4	61,3	-CH ₂ -OH

Tabla 17. Desplazamientos químicos del RMN ¹H del Compuesto III.

H	δH (ppm) [mult., J (Hz)] Exp.	δH reportado(ppm) ⁶³	Asignación
1	5,08 (d) 4,2	5,14 (d) 4,0	Anomérico
2	3,75 (m) 6,6	3,82 (m) 6,5	-CH-OH
5	4,03 (t)	4,09 (t) 6,0	-CH-
2'	3,71 (m)	3,81 (m)	-CH-O-

El heterósido floridósido, es considerado como el principal producto fotosintético y de reserva en todos los órdenes de Rhodophyta, con función en la aclimatación osmótica de las especies que lo biosintetizan. Ha sido reportado en más de 50 especies de algas de este orden. El porcentaje de floridósido en función del peso del material seco, se encuentra entre los 1,5 y 8 % en la mayoría de las especies reportadas. En esta investigación se reporta que el floridósido se obtuvo en un 6,3 % en función de la biomasa^{62,64-66}. Esta molécula se encontró en la literatura reportada para solo una especie del género *Gymnogongrus*, *Gymnogongrus flabelliformis*⁶⁷, por lo tanto se identifica esta molécula por primera vez en la especie *Gymnogongrus tenuis*, objeto de esta investigación.

La actividad biológica del floridósido ha sido ampliamente estudiada principalmente en investigaciones *in vitro*. Se resalta su investigación como potente activador de la vía clásica del sistema de complemento, el cual es un componente fundamental de la respuesta inmune; además, tiene potencial terapéutico para el tratamiento del cáncer⁶⁸. Se reporta que posee potencial para ser desarrollado como agente activo para el tratamiento de neuro-inflamaciones⁶⁹; y tiene una buena capacidad antioxidante⁷⁰. En una investigación realizada en el 2015, se obtuvo que el

floridósido promovió la diferenciación osteogénica en células madre mesenquimatosas^{xix} de médula ósea de murino^{xx71}.

^{xix} Células madre mesenquimatosas: son células madre multipotenciales primitivas, con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células.

^{xx} Murinos: son una subfamilia de roedores miomorfos, que incluye a los comúnmente llamados ratones y ratas.

6.2 Ensayo de toxicidad aguda, modelo larvario *Danio rerio*.

Las larvas en la solución más concentrada (100 µg/mL) fueron estudiadas durante 1 hora, realizando un registro de cambios morfológicos, conductuales (Tabla 20) o de frecuencia cardíaca, latidos/min (Figura 8); en este último parámetro no se observó alteración significativa.

Tabla 18. Cambios observables en larvas expuestas a solución (100 µg/mL) en 60 min.

Tiempo (min)	Observaciones	
0	Morfología de la larva	Sin alteración
	Respuesta a estímulo	Sin alteración
	Motricidad	Aleteo acelerado. Movimiento espasmódico de cola
10	Morfología de la larva	Sin alteración
	Respuesta a estímulo	Sin alteración
	Motricidad	Movimiento errático. Aleteo acelerado.
20	Morfología de la larva	Retracción en los ojos
	Respuesta a estímulo	Disminución del potencial de respuesta mecánico
	Motricidad	Aleteo constante. Movimiento errático. Disminuye el movimiento espasmódico de cola
30	Morfología de la larva	Retracción en los ojos. Ensanchamiento del área bucal, alteración de la región cefálica.
	Respuesta a estímulo	Reacción lenta e irregular
	Motricidad	Movimiento errático. Aleteo espasmódico.
40	Morfología de la larva	Ensanchamiento y distorsión del área bucal. Alteración de la región cefálica
	Respuesta a estímulo	Respuesta lenta
	Motricidad	Movimiento errático. Aleteo excesivo. Movimiento espasmódico de cola
	Morfología de la larva	Ensanchamiento y distorsión del área bucal.

50	Alteración de la región cefálica	
	Respuesta a estímulo	Respuesta lenta
	Motricidad	Movimiento errático
60	Morfología de la larva	Ensanchamiento y distorsión del área bucal. Alteración de la región cefálica
	Respuesta a estímulo	Respuesta lenta
	Motricidad	Movimiento errático

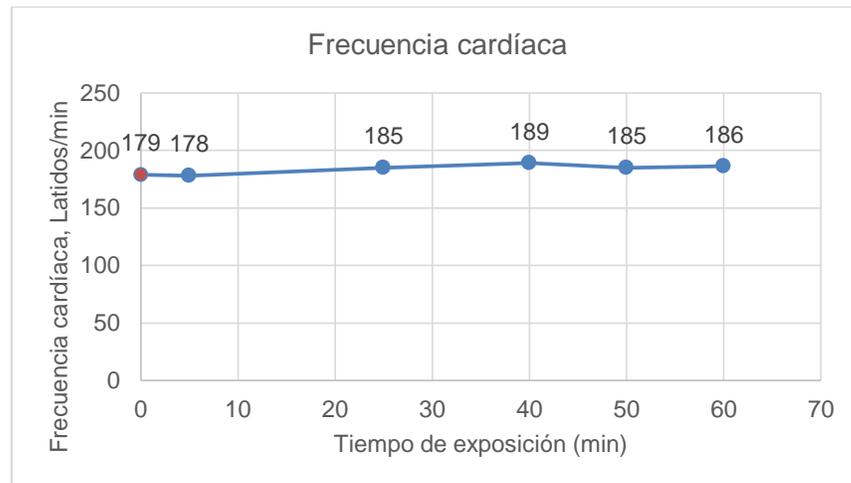


Figura 10. Frecuencia cardíaca, Latidos por minuto de larvas expuestas a solución (100 µg/mL) en 60 min.

En el proceso de evaluación efectuado a las distintas concentraciones y tiempos (1h y 24h) no hubo mortalidad. Sin embargo, se observaron efectos entre los cuales se destacan: alteración motora, deformación de la boca y alteración de la región cefálica. La Figura 9, muestra las larvas pez cebra *Danio rerio* 5dpf, expuestas a soluciones de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *G. tenius*. Donde se muestra A: Larva control en solución DMSO 0,1%, B: Larva expuesta a 25 µg/mL, C: Larva expuesta a 50 µg/mL, y D: Larva expuesta a 75 µg/mL.

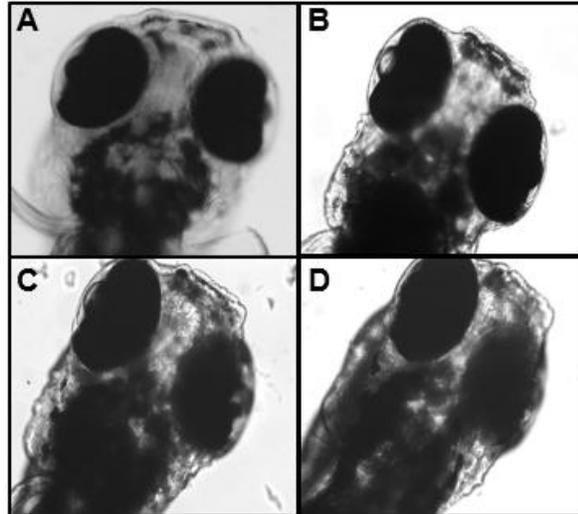


Figura 11. Larvas de pez cebra *Danio rerio* 5dpf expuestas a soluciones de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *G. tenuis*

Se puede observar, en la Figura 10, que las larvas expuestas al extracto presentaron una deformación craneal que se caracterizó por un alargamiento del eje vertical (a) y un acortamiento del eje transversal (c) de la región cráneo facial. Los resultados indican que el efecto fue dependiente de la dosis, se requieren experimentos adicionales para corroborar esta afirmación.

Al hacer el análisis de las imágenes de las larvas observadas a través del microscopio, se consideró que la deformación morfológica podía ser resultado de una alteración a nivel óseo. Es por esta razón que se propuso la realización de un experimento adicional, que consistió en la evaluación de la densidad de calcio de las estructuras óseas de la larva, utilizando calceína como marcador. Se obtuvo que hubo una disminución en la densidad ósea en estructuras como el notocordio (Figura 10). El notocordio es el principal órgano esquelético de la larva, es una estructura embrionaria de transición que se transformará en la médula espinal del pez adulto. Es común en todos los miembros del phylum Chordata, y constituye el mayor elemento esquelético

para pequeños cordados. Entre las distintas funciones de dicha estructura, se puede destacar su función en la formación de células somitas, las cuales son las que darán origen a los músculos⁷².

La sección A' y B' muestran la densidad ósea de la estructura del notocordio (encerrado en un recuadro).

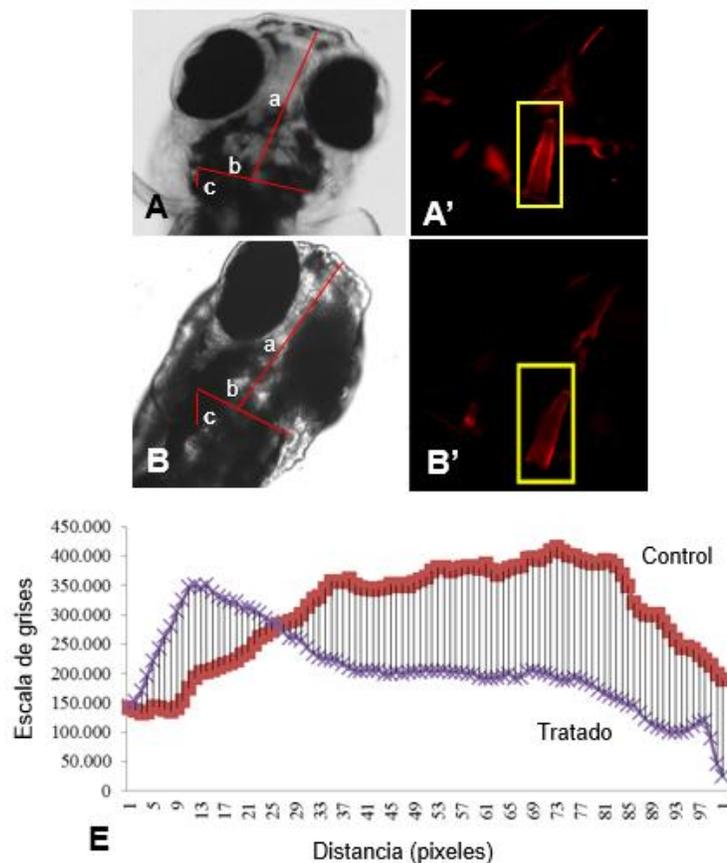
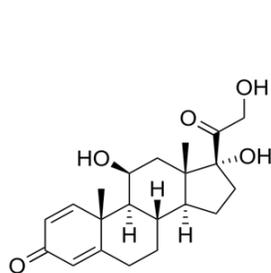


Figura 12. Densidad ósea de larvas *Danio rerio* 5dpf tratadas con extracto metanólico de *G. tenuis* y expuestas a calceína, y un osteo-grama que representa la densidad ósea en larvas controles y tratadas con el extracto metanólico de la especie.

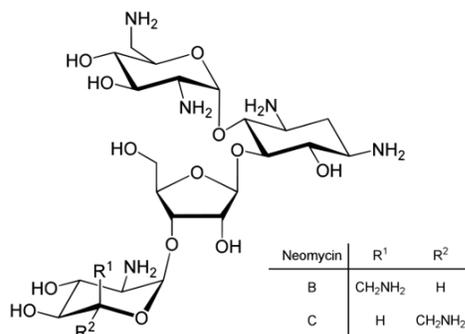
En la Figura 10E se muestra, de una forma semi-cuantitativa la alteración producida por el extracto a nivel del notocordio de la región cefálica. El programa ImageJ, permite realizar un histograma de color sobre una zona escogida de la imagen,

lo que se traduce en una curva que representa el número de píxeles por área. Dado que la intensidad de luz en la zona observada, en este caso el notocordio, representa la cantidad de calcio presente en esta estructura; el área debajo de la curva corresponde a la densidad de calcio. Del gráfico se obtiene que se produjo un 80,2% de disminución de luminosidad, lo que es consistente con una pérdida de calcio.

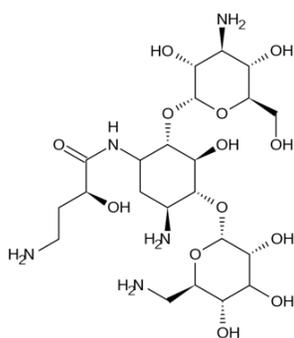
Este tipo de cambios morfológicos observados se pudieron encontrar en la investigación realizada por Barret, R., y colaboradores, los cuales en la búsqueda de un modelo *in vivo* de osteoporosis, indujeron la pérdida de densidad ósea de larvas de entre 4 y 6 dpf al exponerlas a concentraciones del glucocorticoide, prednisolona (58)⁷³. También se reportaron en un estudio realizado por Alvarez, M., y colaboradores, que encontraron una alteración en los elementos óseos del esqueleto cráneo facial de las larvas tratadas con los aminoglicósidos: Netilmicina (59), Amikacina (60) y Gentamicina (61)⁷⁴. El análisis neurotóxico del fipronil (62) en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio* indica: una degeneración del notocordio, acortamiento del axis del cuerpo cefálico, erráticos movimientos de cola y contracciones no coordinadas de músculo a lo largo del axis del cuerpo en respuesta a un estímulo táctil⁷⁵.



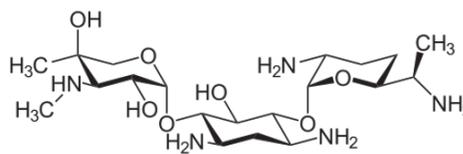
58



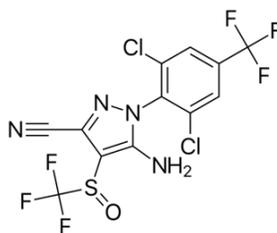
59



60



61



62

En resumen, los efectos tóxicos predominantes obtenidos en esta investigación consistieron en una alteración de la región cefálica y en la locomoción de la larva, además de una disminución de la densidad de calcio en estructuras como el notocordio. La alteración a nivel de notocordio explicaría la deformación de la región cefálica y en la movilidad de la larva. Considerando que el 85,8 % del extracto metanólico correspondió al compuesto floridósido, se podría atribuir a esta molécula las alteraciones apreciadas.

Como se mencionó anteriormente, el floridósido posee distintas actividades biológicas. Su potencial como fármaco contra el cáncer, significaría que este compuesto es citotóxico en células con un alto índice de replicación, como son las células cancerígenas y las células en desarrollo⁶⁸. El notocordio está conformado por células en proceso de diferenciación, por lo cual, podría postularse que el floridósido tiene un efecto citotóxico en las células del notocordio. La comprobación de este efecto requiere de la realización de estudios histológicos con coloraciones especiales para evidenciar si la pérdida de calcio observada es debido a muerte celular.

La investigación realizada en células madre mesenquimatosas de médula ósea de murinos, en la cual el floridósido promueve la diferenciación osteogénica, corrobora que esta molécula tiene un efecto sobre un sistema óseo en desarrollo. Además, se reporta que el floridósido promovió la deposición de calcio en las células, lo cual es contrario a lo obtenido en este proyecto; sin embargo, las concentraciones utilizadas por los investigadores estuvieron en el rango de (0,1 – 10) μM de floridósido, menores a las concentraciones utilizadas en este proyecto⁷¹. Esto parece indicar que lo observado puede ser producto de un efecto tóxico causado por la alta concentración del floridósido. Podría postularse que, en vez de causar apoptosis, el floridósido podría estar inhibiendo la deposición de calcio.

También se puede proponer que, considerando que la molécula de floridósido es altamente polar y posee una función en la aclimatación osmótica del alga, al estar dentro del organismo genera una descompensación electrolítica, promoviendo la salida del calcio de la matriz intracelular e incluso extracelular. El floridósido podría estar activando un proceso de desmineralización en la célula. Inclusive, el floridósido podría estar interaccionando con el precursor de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), el cual es una fase amorfa y desordenada de calcio fosfatado, altamente reactivo; promoviendo de igual manera la salida de calcio⁷⁶. Para corroborar cualquiera de estas postulaciones es necesaria la realización de más pruebas.

En la literatura no se encontró la evaluación de dicha molécula en el modelo de pez cebra *Danio rerio*, por lo cual es necesario realizar ensayos de toxicidad en dicho modelo para establecer si la molécula es la que produce el efecto tóxico observado. Sin embargo, no se ha reportado alguno de estos efectos apreciados para el colesterol, el fucosterol o el ácido palmítico.

El objetivo de este análisis fue estudiar de forma preliminar la toxicidad del extracto metanólico del alga *G. tenuis* utilizando el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*; las alteraciones morfológicas observadas indican presencia de toxicidad. Se considera necesario continuar la investigación sobre el extracto, o más específicamente sobre la molécula, para poder determinar qué produce el efecto tóxico observado y bajo que mecanismo ocurre o se produce dicho efecto.

7. CONCLUSIONES

Los procedimientos establecidos en la metodología permitieron aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el alga *Gymnogongrus tenuis*, utilizando para ello métodos de extracción, técnicas cromatografías y de elucidación de estructuras, se obtuvo:

- Del estudio fitoquímico del extracto metanólico del alga *Gymnogongrus tenuis* se obtuvieron cuatro fracciones: la fracción de hexano que constituyó el 0,48% del material seco, la fracción de diclorometano con 0,24%, la fracción de acetato de etilo con el 0,20% y la fracción hidrometanólica con el 6,27%.
- De la fracción de hexano se identificaron tres compuestos: dos esteroides, el colesterol y el fucosterol, y un ácido graso, el ácido palmítico. El colesterol se aisló en el Compuesto I y se obtuvo como mezcla en el Compuesto II, junto con el fucosterol y el ácido palmítico.
- La fracción hidrometanólica consistió de un sólo compuesto, un heterósido identificado como el floridósido. El cuál es el metabolito mayoritario del extracto metanólico del alga *G. tenuis*, 85,8%.

En el estudio preliminar de toxicidad aguda del extracto metanólico del alga *G. tenuis* en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*, se obtuvo:

- El extracto metanólico del alga *G. tenuis* no produjo letalidad a concentraciones en el rango entre (100 – 25) µg/mL.
- El extracto metanólico a concentraciones de 100, 75, 50 y 25 µg/mL presenta un efecto tóxico en el modelo larvario de pez cebra *Danio rerio*;

observándose una deformación en la región cráneo facial y una alteración en la locomoción.

- Las alteraciones apreciadas fueron producto de la disminución de la densidad ósea en un 80,2%.

8. RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación de los metabolitos secundarios del alga *G. tenuis*, aislando e identificando un mayor número de ellos, a partir de una mayor cantidad de biomasa.
- Aislar e identificar los metabolitos presentes en la fracción de diclorometano, partiendo de una mayor cantidad de alga, debido a que se observaron compuestos de interés que no pudieron ser analizados en este trabajo de investigación.
- Evaluar el efecto tóxico del compuesto floridósido en el modelo de pez cebra *Danio rerio*.
- Analizar, mediante otros procedimientos, el efecto que ocurre a nivel óseo en las larvas de pez cebra *Danio rerio* expuestas al floridósido.
- Realizar el estudio de toxicidad aguda del compuesto floridósido en el pez cebra *Danio rerio* adulto.

Bibliografía

- [1] García, D. Secretos de las profundidades - Los nuevos medicamentos vienen del mar. *Revista de la OMPI*. 2009. 18-19.
- [2] Bhakuni, D.S., Rawat, D.S. Bioactive Marine natural Products. Nueva Dehli: Anamaya Publishers; 2005. v-viii, 1-9, 64-65.
- [3] Carvalho, L.G., Pereira, L. Review of Marine Algae as Source of Bioactive Metabolites: a Marine Biotechnology Approach. In: Pereira, L., Neto, J.M., editors. Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assesment, and Biotechnology. Florida: Taylor & Francis Group; 2015. 197.
- [4] Barsanti, L., Gualtieri, P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Florida: Taylor & Francis Group; 2006. 2-3, 1-27.
- [5] Gallardo, T. Marine Algae: General Aspects (Biology, Systematics, Field and Laboratory Techniques). En: Pereira, L., Neto, J.M., editors. Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assesment, and Biotechnology. Florida: Taylor & Francis Group; 2015. 1-8.
- [6] Guiry, M.D. & Guiry, G.M. *AlgaeBase* [database on the Internet]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2016 – [consultado 13 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.algaebase.org>.
- [7] Bedoux, G., Bourgougnon, N. Bioactivity of Secondary Metabolites from Macroalgae. En: Sahoo, D., Seckbach, J., editors. The Alae World: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. New York: Springer Science+Business Media Dordrecht; 2015. 391.
- [8] García, A., Pérez-Urria, E. Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal. 2009; 2 (3), 119-145.

- [9] Craigie, J. S.; Gruening, D. E. Bromophenols from red algae. *Science*. 1967; 157, 1058
- [10] Irie, T., Suzuki, M., Masamune, T. Laurencin, a constituent of *Laurencia glandulifera* Kützing. *Tetrahedron*. 1968; 24, 4193-4205.
- [11] Irie, T., Izawa, M., Kurosawa, E. Laureatin and Isolaureatin, constituents of *Laurencia nipponica* Yamada. *Tetrahedron*. 1970; 26, 851-870.
- [12] Burkholder, P. The ecology of marine antibiotics and coral reefs. En: Jones, O., Endean, R., editors. *Biology and Geology of Coral Reefs*. New York: Academic Press, INC; 1973. 139-144.
- [13] Güven, K., Percot, A., Sezik, E. Alkaloids in Marine Algae. *Mar Drugs*. 2010; 8, 269-284.
- [14] Percot, A., Yalçın, A., Aysel, V., Erdugan, H., Dural, B., Güven, K. β -Phenylethylamine content in marine algae around Turkish coasts. *Bot. Mar*. 2009; 52, 87-90.
- [15] Barroso, N., Rodriguez, M. Action of β -Phenylethylamine and related amines on nigrostriatal dopamine neurotransmission. *Eur. J. Pharmacol*. 1996; 297, 195-203.
- [16] Su, J., Zhu, Y., Zeng, L., Xu, X. A new bisindole from algae *Caulerpa serrulata*. *J. Nat. Prod*. 1997; 60, 1043-1044.
- [17] Ji, N., Li, X., Cui, C., Wang, B. Terpenes and polybromoindoles from the marine red algae *Laurencia decumbens* (Rhodomelaceae). *Helv. Chim. Acta*. 2007; 90, 1731-1736.
- [18] Takemoto, T.; Daigo, D.; Takagi, N. J. Hypotensive constituents of marine algae. I. A new basic amino acid 'Laminine' and other basic constituents isolated from *Laminaria angustata*. *Pharm. Soc*. 1964; 84, 1176.
- [19] Girard, J. ; Marion, C.; Liutkus, M.; Boucard, M.; Rechencq, E.; Vidal, J.; Rossi, J. Hypotensive constituents of marine algae; 1. Pharmacological studies of laminine. *Planta Med*. 1988; 54, 193.

- [20] Heilbron, I. M.; Parry, E. G.; Phipers, R. F. The algae: The relationship between certain algal constituents. *Biochem. J.* 1935; 29, 1375.
- [21] Patterson, G. The distribution of sterols in algae. *Lipids.* 1971; 6, 120-126.
- [22] Gibbons, G., Goad, L., Goodwin, T. The sterols of some marine red algae. *Phytochemistry.* 1967; 6, 677-683.
- [23] Gaysinski, M., Ortalo-Magné, A., Thomas, O., Culioli, G. Extraction, Purification, and NMR Analysis of Terpenes from Brown Algae. In: Dagmar, B., Stengel and Solène Connan, editors. *Natural Products from Marine Algae: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* New York: Springer Science+Business Media; 2015. 207-210.
- [24] Mihopoulos, N., Vagias, C., Mikros, E., Scoullou, M., Roussins, V. Prevezols A and B: new brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.* 2001; 42, 3749-3752.
- [25] Anderson, R., Bolton, J. Reproductive morphology and life histories of Southern African *Gymnogongrus* species (Rhodophyta, Phylloporaceae). *Br. phycol. J.* 1990; 25, 381-390.
- [26] Taylor, W. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. Michigan: The University of Michigan Press; 1960. 470-471.
- [27] Lobban, C., Wynne, M. The biology of seaweeds. Los Angeles: Blackwell Scientific; 1981. 27 y 165.
- [28] Gómez, S., Carballo-Barrera, Y., García, M., Gil, N. *Ficoflora P. N. Archipiélago los roques* [base de datos en internet]. World-wide web publicación electrónica, UCV-FIBV-UPEL. 2016 – [consultado 20 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela/pnalr/pnalr/>
- [29] Cervigón, F., Cirpiani, R., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A.J., Márquez, R., Poutiers, J.M., Robaina, G., Rodríguez, B. Guía de campo de las especies

comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de sur américa. Roma, FAO, 1992.

[30] Gómez, S., Carballo-Barrera, Y., García, M., Gil, N. *Catálogo digital de la ficoflora de Venezuela* [base de datos en internet]. World-wide web publicación electrónica, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 2017 – [consultado 20 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela/>

[31] Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., Maestri, D. *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*. Córdoba: Encuentro Grupo Editor; 2008. 49-51.

[32] Skoog, D., Holler, F., Crouch, S. *Principios de análisis instrumental*. 6a ed. USA: Cengage Learning Editores; 2008. 762,763,848.

[33] Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., Engel, R. *A small scale approach to organic laboratory techniques*. 3a ed. California: Brooks/Cole, Cengage Learning editors; 2005. 777-781, 801-802.

[34] Eaton, D.L., Klaassen, C.D. *Principle of Toxicology*. In: Kaassen, C.D., editor. *Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. USA: McGraw Hill; 2001. 24-45.

[35] Grunenthal [homepage on the internet]. Madrid: Grünenthal Pharma, S.A.; [actualizada 2011 Jun 10; consultada 2016 Mar 10]. Disponible en: http://www.grunenthal.es/gtr-web/Grunenthal_Pharma_S.A./I-D/De_la_Investigacion_al_Medicamento/Ensayos:preclnicos/es_ES/197600209.jsp.

[36] Tang, C., Prueksaritanont, T. Use of in vivo animal models to assess pharmacokinetic drug-drug interactions. *Pharm Res*. 2010; 27: 1772-1787.

[37] Hansen, J. In vivo models of developmental toxicology. In: Harris, C., Hansen, J., editors. *Developmental Toxicology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 889. Springer Science+Business Media, LCC; 2012. 8.

- [38] Bad'urová, M. Modulation of Mitochondrial Dynamics In Parkinson's Disease [Diploma Work]. Praga: Charles University. Departamento de Química Farmacéutica y Control de Drogas; 2015.
- [39] Alderton, W., Berghmans, S. Zebrafish a versatile in vivo model for drug safety assessment. *Drug discovery World Fall*. 2006. 49-50.
- [40] Rubinstein, A. Zebrafish assays for drug toxicity screening. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2006; 2, 231-240.
- [41] Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, P., de Witte, P., Esguerra, C., Crawford, A. Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS ONE*, 2012; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043850>
- [42] Anggadiredja, J., Andyani, R., Hayati, Muawanah. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol.* 1997; 9: 477-479.
- [43] Topcu, G., Aydogmus, Z., Imre, S., Gören, A., Pezzuto, J., Clement, J., Kingston, D. Brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *J. Nat. Prod.* 2003; 66: 1505-1508.
- [44] Mao, S., Liu, D., Yu, X., Lai, X. A new polyacetylenic fatty acid and other secondary metabolites from the Chinese green alga *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae) and their chemotaxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 2011; 39: 253-257.
- [45] Chardon-Loriaux, I., Morisaki, M., Ikekawa, N. Sterols in Red Seaweed. *Phytochemistry*. 1976; 15: 723-725.
- [46] Arao, T., Yamada, M. Positional distribution of fatty acids in galactolipids of algae. *Phytochemistry*. 1989; 28 (3): 805-810.
- [47] Talarico, L., Zibetti, R., Faria, P., Scolaro, L., Duarte, M., Nosedá, M., Pujol, C., Damonte, E. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red

- seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2004; 34: 63-71.
- [48] Estevez, J., Ciancia, M., Cerezo, A. DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. *Carbohydr. Res.* 2001; 331: 27-41.
- [49] Pujol, C., Estevez, J., Carluci, M., Ciancia, M., Cerezo, A., Damonte, E. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 2002; 13: 83-89.
- [50] Pérez, M., Canelón, D., Compagnone, R., Matulewicz, M., Cerezo, A., Ciancia, M. Carrageenan and agaran structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. *Carbohydr. Polym.* 2016; 136: 1370-1378.
- [51] Purdie, E., Samsudin, S., Eddy, F., Codd, G. Effects of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 2009; 95: 279-284.
- [52] Cha, S., Ko, S., Kim, D., Jeon, Y. Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: Those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish. *J. Dermatol.* 2011; 38: 354-363.
- [53] Seung-Hong, L., Chang-Ik, K., Youngheun, J., Yoonhwa, J., Misook, K., Jin-Soo, K., You-Jin, J. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model. *Carbohydr Polym.* 2013; 92: 84-89.
- [54] Kang, M., Cha, S., Wijesinghe, W., Kang, S., Lee, S., Kim, E., Song, C., Jeon, Y. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. *Food Chem.* 2013; 138: 950-955.
- [55] Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. Plant drug analysis. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 1984. 299-303.

- [56] Du, S., Frenkel, V., Kindschi, G., Zohar, Y. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. *Dev Biol.* 2001; 238 (2): 239-246.
- [57] Wishart, D., Knox, A., Guo, R., Eisner, N., Young, B., Gautam, D., Hau, N., Psychogios, E., Dong, S., Bouatra, R., Mandal, I., Sinelnikov, J., Xia, L., Jia, J. A., Cruz, E., Lim, C., Sobsey, S., Shrivastava, P., Huang, P. Liu, L., Fang, J., Peng, R., Fradette, D., Cheng, D., Tzur, M., Clements, A., Lewis, A., Zuniga, M., Dawe, Y., Xiong, D., Clive, R., Greiner, A., Nazyrova, R., Shaykhutdinov, L., Li, H. J. HMDB: A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 603-610.
- [58] Gedara, S., Andel-Hasim, O., El-Sharkawy, S., Salama, O., Shier, T., Halim, A. Cytotoxic Hydroazulene Diterpenes from Brown Algae *Dictyota dichotoma*. *Z Naturforsch C.* 2003; 52, 17-22.
- [59] Pouchert, C. J. "The Aldrich library of NMR spectra. Volume 2". Aldrich Chemical Companies. 1983.
- [60] Qudeer, A., Ran, J., Hyun, A., Jae, S. Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *J Sci Food Agric.* 2016; 96: 1856-1866.
- [61] Nelson, D., Cox, M. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: W.H. Freeman and Company; 2005. 242.
- [62] Karsten, U., Barrow, K., King, R. Floridoside, L-isofloridoside, and D-isofloridoside in the Red alga *Porphyra columbina*. *Plant Physiol.* 1993; 103: 485-491.
- [63] Simon-Colin, C., Kervarec, N., Pichon, R., Deslandes, E. Complete ^1H and ^{13}C spectral assignment of floridoside. *Carbohydr Res.* 2002; 337 (3): 279-280.
- [64] Barrow, K., Karsten, U., King, R., West, J. Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae: Ceramiales)- a chemosystematic study. *Phycologia.* 1995; 34 (4): 279-283.

- [65] Craigie, J., McLachlan, J., Tocher, R. Some neutral constituents of the Rhodophyceae with special reference to the occurrence of the floridosides. *Can J Bot.* 1968; 46 (5): 605-611.
- [66] Kirst, G. Low MW carbohydrates and ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. *Phytochemistry.* 1980; 19: 1107-1110.
- [67] Chen, J., Song, D., Luo, Q., Mou, T., Yang, R., Chen, H., He, S., Yan, X. Determination of Floridoside and Isofloridoside in Red Algae by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal Lett.* 2014; 47: 2307-2316.
- [68] Courtois, A., Simon-Colin, C., Boisset, C., Berthou, C., Deslandes, E., Guézennec, J., Bordron, A. Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway. *Mar. Drugs.* 2008; 6: 407-417.
- [69] MinJeong, K., Yong-Xin L., Pradeep, D., BoMi, R., Se-Kwon, K. Floridoside suppresses pro-inflammatory responses by blocking MAPK signaling in activated microglia. *BMB Rep.* 2013; 46 (8): 398-403.
- [70] Yong-Xin, L., Yong, L., Sang-Hoon, L., Zhong-Ji, Q., Se-Kwon, K. Inhibitors of oxidation and Matrix Metalloproteinases, floridoside, and D-isofloridoside from marine red alga *Laurencia undulata*. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 578-586.
- [71] BoMi, R., Yong-Xin, L., Kyong-Hwa, K., Se-Kwon, K., Dong, K. Floridoside from *Laurencia undulata* promotes osteogenic differentiation in murine bone marrow mesenchymal cells. *J Funct Foods.* 2015; 19: 505-511.
- [72] Stemple, D. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development.* 2005; 132 (11): 2503-2512.
- [73] Barret, R., Chapell, C., Quick, M., Fleming, A. A rapid, high content, *in vivo* model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biotechnol. J.* 2006; 1: 651-655.

- [74] Álvarez, M., Rivas, J., Perdomo, L., Navarro, E., Arias, M., Hernández, C. Toxicidad de los Aminoglicósidos (AGs) sobre el tejido óseo craneofacial de larvas de pez cebra *Danio rerio*. *Retel*. 2016; 47. www.sertox.com.ar/retel
- [75] Stehr, C., Linbo, T., Incardona, J., Scholz, N. The Developmental Neurotoxicity of Fipronil: Notochord Degeneration and Locomotor Defects in Zebrafish Embryos and Larvae. *Toxicol Sci*. 2006; 92 (1): 270-278.
- [76] Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., Weiner, S. Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105 (11): 12748-12753.