

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



“ESTUDIO FICOQUÍMICO DE LAS ALGAS

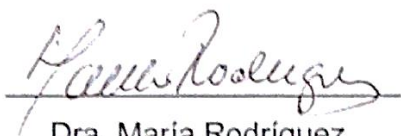
***Penicillus capitatus* Lamarck, *Penicillus lamourouxii* Decaisne y**

***Penicillus pyriformis* A. Gepp & E.S. Gepp”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por el Br. Juan
Alejandro González M. para
optar al título de Licenciado
en Química mención Básica.

Caracas, Mayo 2016

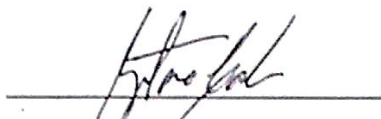
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "**Estudio ficoquímico de las algas *Penicillus capitatus* Lamarck, *Penicillus lamourouxii* Decaisne y *Penicillus pyriformis* A. Gepp & E.S. Gepp**". Presentado por el Br. Juan Alejandro González Marin, C.I: 20.098.257 certificamos que este trabajo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química mención Básica.



Dra. María Rodríguez
(Director)



Dra. Dilsia J. Canelón
(Director)



Dr. Gustavo Cabrera
(Jurado)



Dra. Beatriz Vera
(Jurado)

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1. Metabolitos secundarios en algas marinas	3
I.1.1 Ácidos grasos.....	4
I.1.2. Compuestos terpénicos.....	5
I.1.3. Compuestos fenólicos	6
I.1.4. Heterociclos con Nitrógeno	8
I.1.5. Polisacáridos	9
I.2. Phylum Chlorophyta	10
I.3. Metabolitos secundarios en la familia Udoteaceae	11
I.4. El género <i>Penicillus</i>	13
I.4.1. Distribución geográfica del género <i>Penicillus</i>	14
I.5. <i>Penicillus capitatus</i> Lamarck.....	15
I.6. <i>Penicillus pyriformis</i> A. Gepp & E.S. Gepp	16
I.7. <i>Penicillus lamourouxii</i> Decaisne	17
I.8. Compuestos citados para el género <i>Penicillus</i>	20
I.9. Quimiotaxonomía.....	23
I.10. Justificación	27
I.11. Objetivos	
I.11.1. Objetivo General	28
I.11.2. Objetivos Específicos	28
II.- PARTE EXPERIMENTAL.....	29
II.1. Materiales, reactivos y equipos.....	29
II.1.1 Equipos	29
II.1.2. Soportes cromatográficos:	30
II.1.3. Solventes y reactivos:	30
II.2. Área de recolección de las algas pertenecientes al género <i>Penicillus</i>	31
II.3. Procedimiento experimental.	32
II.3.1 Obtención de los extractos del alga <i>Penicillus capitatus</i>	34
II.3.2 Obtención de los extractos del alga <i>Penicillus lamourouxii</i>	35

II.3.3 Obtención de los extractos del alga <i>Penicillus pyriformis</i>	36
II.4 Extracto de Hexano	37
II.4.1 Extracto Hexano (JGPCH)	37
II.4.2 Extracto Hexano (JGPLH).....	40
II.4.3 Extracto Hexano (JGPPH)	43
II.5 Extracto de CH ₂ Cl ₂	47
II.5.1 Extracto CH ₂ Cl ₂ (JGPCD).....	47
II.5.2 Extracto CH ₂ Cl ₂ (JGPLD).....	51
II.5.3 Extracto CH ₂ Cl ₂ (JGPPD).....	55
II.6 Extracto de AcOEt	59
II.7 Extracto Hidro-metanólico.....	59
II.7.1 Extracto Hidro-metanólico (JGPCM)	60
II.7.2 Extracto Hidro-metanólico (JGPLM).....	60
II.7.3 Extracto Hidro-metanólico (JGPPM)	61
III.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	64
III.1 Elucidación de compuesto I: 1,2-dipalmitil-glicerol	65
III.2 Elucidación de compuesto II: 1,3-dipalmitil-2-sulfoquinovosil-glicerol.....	71
III.3 Elucidación de compuesto III: 2-estearoil-1-oleil-glicerol	78
III.4 Elucidación de compuesto IV: 1-estearoil-glicerol	86
III.5 Elucidación del compuesto V: 1-oleil-glicerol.....	93
III.6 Elucidación del compuesto VI: 1-palmitil-glicerol	100
III. 7 Elucidación del compuesto VIII: Ácido palmítico.....	106
III.8 Elucidación del compuesto XV del alga <i>P. pyriformis</i> (JGPPM): N-metiletilcarbamato.....	111
III.9 Análisis quimiotaxonómico.....	120
III.10 Elucidación de los compuestos VII, IX, X, XI, XII, XIII y XIV.	121
IV. CONCLUSIONES	122
V. RECOMENDACIONES	123
VI. - BIBLIOGRAFÍA.....	124
VII. -GLOSARIO DE TÉRMINOS	132

LIS TA DE ABREVIATURAS (ACRONIMOS) Y SIMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etilo
AcCN	Acetonitrilo
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CH₂Cl₂	Diclorometano
CHCl₃	Cloroformo
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de gases
δ	Desplazamiento químico en ppm
dd	doblete de doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización)
DMSO	Dimetilsulfoxido
EM	Espectrometría de masas
Exp	Experimental
g	Gramos
Hx	Hexano

Hz	Hertz
H₂O	Agua
IC₅₀	Inhibición concentración 50 (Concentración de sustancia que provoca 50% de inhibición enzimática)
Int	Integra
IR	Espectrometría de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
L	Litro
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligramo
mL	Mililitro
m	Multiplete
Mult	Multiplicidad
NIST	National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estandares y Tecnología)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
ppm	Partes por millón
R_f	Frente de resolución

RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
Rep	Reportado
s	Singlete
t	Triplete
uma	Unidad de Masa Atómica
UV	Espectrometría Ultravioleta

RESUMEN

Se realizó el estudio ficoquímico de las algas verdes *Penicillus capitatus* Lamarck, *Penicillus lamourouxii* Decaisne y *Penicillus pyriformis* A. Gepp & E.S. Gepp y se realizó la comparación de los metabolitos secundarios aislados, para estas especies.

Las técnicas de separación utilizadas fueron la cromatografía en capa fina y cromatografía en columna. Para la identificación de los metabolitos se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojo. A partir del extracto de hexano se lograron aislar, purificar e identificar 6 compuestos: cinco del tipo glicolípidos de cadenas de 16 y 18 átomos de carbono, saturados e insaturados considerados como marcadores quimiotaxonómicos para el género y uno de ellos tipo sulfoquinovosil diacil glicerol, solo presente en la especie *P. capitatus*, considerado como marcador quimiotaxonómico la ésta especie. Del extracto de diclorometano logró aislar, purificar e identificar 1 compuesto: ácido palmítico, presente en las especies del género *Penicillus* estudiadas, considerado como marcador quimiotaxonómico para las especies del género *Penicillus* estudiadas y además se logró aislar 7 compuestos que se encuentran en proceso de identificación. Del extracto hidro-metanólico se lograr aislar 1 compuesto propuesto: de tipo N-metiletilcarbamato.

Palabras Clave: ficoquímica, quimiotaxonomía, metabolitos secundarios, glicolípidos, ácido graso, marcador quimiotaxonómico, *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii*, *Penicillus pyriformis*, macroalgas marinas, algas verdes, chlorophyta, udoteaceae.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Padre por la bendición de tu infinito amor, tu chispa en mi interior me ha guiado en todo momento, hacia la luz, generando en mí la curiosidad de conocer el universo y sus misterios.

Doy gracias a mis padres, Marlene de González y Juan González por su amor y apoyo incondicional, los valores y respeto que me han enseñado, me han permitido alcanzar grandes logros durante mis distintas etapas de formación, sus bendiciones, sus consejos, sus cuidados, siempre preocupados por mi bienestar, también doy gracias a mis hermanos Gregory y Ricardito, por ser piezas fundamentales en mi vida, gracias a ustedes por tanto amor, gracias.

A las causalidades de la providencia, me llevaron a cumplir uno de mis más preciados sueños, pertenecer a la mejor casa de estudios del país, la ilustre Universidad Central de Venezuela, ha sido un camino increíble, dando los primeros pasos como futuro científico y ciudadano del mundo.

Gracias a los extraordinarios Profesores de la Escuela de Química, han dejado en mí, grandes aprendizajes y conocimientos, gracias a Víctor Sojo, Mauro Martínez, Vincent Piscitelli, Marisol Ortega, Carlos Landaeta, Luis Gómez, Gustavo Cabrera, María Rodríguez, y aquellos tantos otros Profesores que potenciaron en mí el amor a la química, en especial la orgánica.

He conocido increíbles personas durante mi paso por la universidad, formando fuertes lazos de amistad que perdurarán por años, gracias a ellos, he aprendido muchísimo de ustedes, compartiendo sueños, pasiones, tristezas, logros, noches de estudios, celebraciones, gracias Jefferson, Jeniree, David, Salvador, Rodrigo, Irene

Kiara, Giordana, Mary, Tony, Victor, Genesis, Daniela, Zuleima y a otros tantos amigos fuera de ciencias Fatima, Sarai y a Sabrina.

Gracias a los Profesores Reinaldo Compagnone y Dilsia Canelón, por abrirme las puertas al increíble mundo de los Productos Naturales Marinos y permitirme desarrollar mi Trabajo Especial de Grado, en el Laboratorio 356 de la Escuela de Química. También le doy gracias a la Profesora Beatriz Vera por la identificación de las especies estudiadas en mi TEG y todo lo aprendido en el mundo de las algas marinas.

Gracias a FONACIT Proyecto N° 2012000830. A los análisis de RMN realizados por Ligia Llovera y María Nuñez en el IVIC. A las Profesoras Alirica Suarez y Katuska Chávez por los análisis de RMN en la Facultad de Farmacia, UCV. A la Profesora Beth Díaz por su grata recepción en el Laboratorio de Productos Naturales, mientras desarrollaba mi escrito del TEG junto a Jefferson, Jenirree y Janetsi en la Facultad de Farmacia, UCV.

Gracias a la Profesora Lola de Lima por los análisis de IR realizados en la Escuela de Química y al Profesor Luis Vilchez por los análisis de masas realizados en el ICT de la Facultad de Ciencias, UCV.

Gracias a todos, seguiré adelante buscando alcanzar nuevas etapas y logros que me permitan formarme y sentirme complacido en este plano material, llevando siempre amor y pasión en cada momento de mi vida, gracias.

I.- INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han formado parte del desarrollo humano desde sus inicios. El conocimiento adquirido durante generaciones sobre las propiedades que poseen plantas y animales, ha permitido conocer los efectos que estos generan sobre el organismo humano. Estos efectos pueden ser antibacterianos, fungicidas, antiinflamatorios, antitumorales, entre otros.^[1]

Actualmente, existe un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevos compuestos químicos, capaces de ofrecer beneficios sobre la salud humana, industria cosmética, industria alimenticia, agricultura e industria energética (biocombustible). Muchos trabajos de investigación en laboratorios, a nivel mundial, están enfocados en los productos naturales provenientes de plantas, animales y especies origen marino. Estos últimos tienen un creciente interés por su potencial, debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios descubiertos.^[1]

Para el año 2012 se han registrado cerca de 1241 productos naturales representando aproximadamente el 20% de los compuestos químicos obtenidos del ambiente marino.^[1] Entre ellos se ha dedicado el estudio de organismos marinos como: esponjas, corales, cnidarios, briozoos, moluscos, tunicados, equinodermos y particularmente en algas. Las algas son organismos fotosintéticos acuáticos, caracterizados por poseer un cuerpo simple con diversas formas y niveles de organización, con estructuras reproductivas desnudas y derivadas a partir de una sola célula, con variados ciclos de vida. Estos organismos, no poseen tejidos conductores (xilema y floema), por lo que su cuerpo está constituido por un talo. En algunas algas se presentan estructuras simples como los rizoides equivalentes a la raíz, un estipe y el cuerpo del alga el cual puede ser laminar, filamentosa o en forma de cinta.^[2]

Tradicionalmente un conjunto de características se han utilizado para distinguir los principales grupos de algas. Entre estos se encuentran: los diversos pigmentos fotosintéticos, la naturaleza de la pared celular, los productos de reserva o almacenamiento y la constitución genética.^{[2], [3]} Las algas pertenecen al reino protista, el cual incluye todos aquellos organismos eucariotas y se agrupan en 10 a 11 *Phyla*, característicos (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las algas (Según Curtis 2008 y Barsanti 2014)^{[2], [4]}

Reino	<i>Phylum</i>
Procariota	<i>Cyanobacteria</i>
	<i>Chloroxybacterias</i>
Eucariota	<i>Glaucophyta</i>
	<i>Rodophyta</i>
	<i>Heterokontophyta</i>
	<i>Haptophyta</i>
	<i>Cryptophyta</i>
	<i>Dinophyla</i>
	<i>Euglenophyla</i>
	<i>Chlotatachniophyta</i>
	<i>Chlorophyta</i>

Las algas durante el proceso de fotosíntesis al tomar la luz del sol, generan como subproducto el oxígeno. Se estima que las algas son las responsables del 30 al 50 por ciento neto del oxígeno disponible en el planeta.^[5] Diversos estudios hacen referencia a el uso de las algas como combustible, por el aprovechamiento de los lípidos extraídos de estas, obteniendo una mayor atención para la investigación, desarrollo y comercialización de éstos. Los lípidos de algas pueden ser divididos en 2

grandes grupos: lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) y los lípidos neutros y no polares (mono, di y tri-acilglicéridos y carotenoides).^[6]

Algunas de estas sustancias han sido estudiadas intensamente como materia prima, no sólo como biocombustible, sino también a modo de aditivos alimentarios como es el caso de los triglicéridos. En este sentido, avances significativos se han hecho para generar mayor cantidad de biomasa celular y así aumentar los rendimientos de lípidos.^[6] Las algas también son usadas como alimento, para consumo humano, en el forraje para ganado, generación de vitaminas, extracción de carotenoides como colorantes naturales, polisacáridos como los agares y una gran variedad de metabolitos secundarios con actividades biológicas potenciales en la industria farmacéutica.^[6]

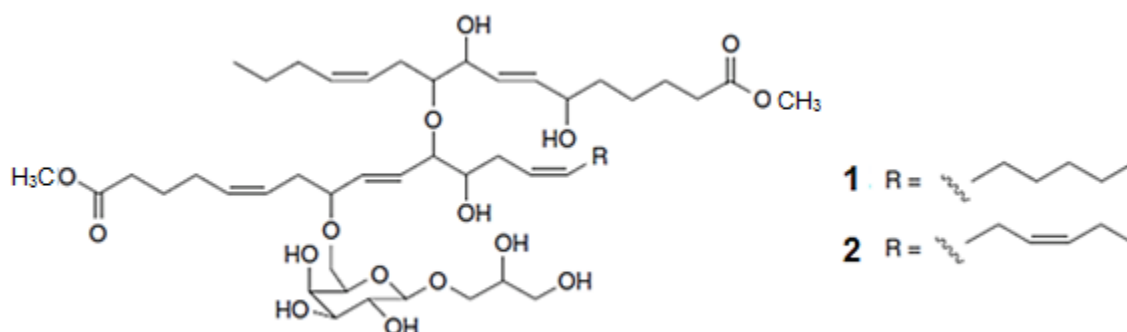
Entre las aplicaciones que ofrecen las algas de los Phyla más estudiados, destacan: las algas rojas del Phylum Rhodophyta por la importancia de sus geles y otros compuestos químicos secundarios; las algas pardas del Phylum *Heterokontophyta* son utilizados en nanotecnología debido a la escala de sus estructuras, mientras las algas verdes del Phylum Chlorophyta, han sido estudiadas en las últimas décadas por la presencia de compuestos químicos tales como: terpenos, compuestos fenólicos, polisacáridos y muchos otros cuya aplicaciones en el área farmacéutica vendría a incrementar la cantidad de nuevos productos en el mercado.^[3]

I.1. Metabolitos secundarios en algas marinas

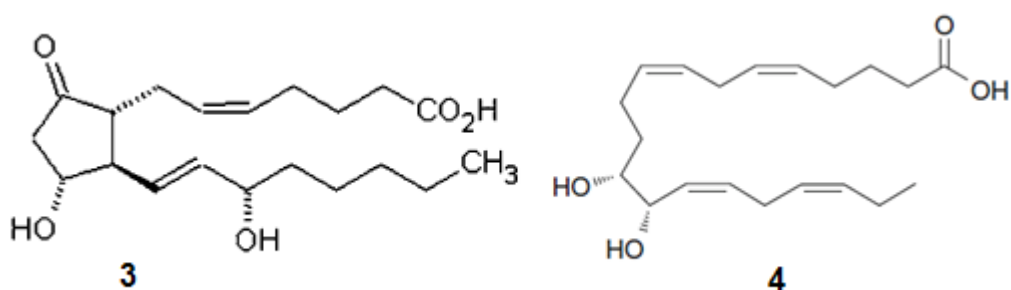
Los metabolitos secundarios aislados de algas verdes, rojas y pardas han generado una gran cantidad de estudios con importantes actividades biológicas. Entre estos se encuentran: compuestos esteroidales derivados de terpenos, ácidos grasos, alcaloides, flavonoides, compuestos aromáticos y péptidos.^[1]

I.1.1 Ácidos grasos

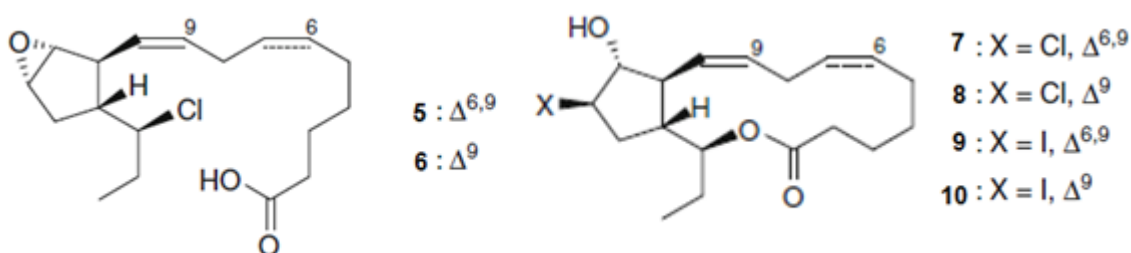
Los glicoglicerolípidos (1) y (2) fueron aislados del alga verde *Avrainvillea nigricans*, presentan actividad contra células de cáncer mamario en humanos en la línea celular MCF-7 con $IC_{50} = 3 \text{ nM}$.^[3]



La prostaglandina (3), aislado del alga roja *Gracilaria coronopifolia*, es tóxico al consumo humano.^[3] El ácido (12R, 13S) dihidroxieicosanpentanoico (4) aislado del alga roja *Gracilariopsis lemaneiformis* posee una interesante actividad biológica ya que altera a la hormona luteizante en cabras, alterando su ciclo menstrual.^[3]

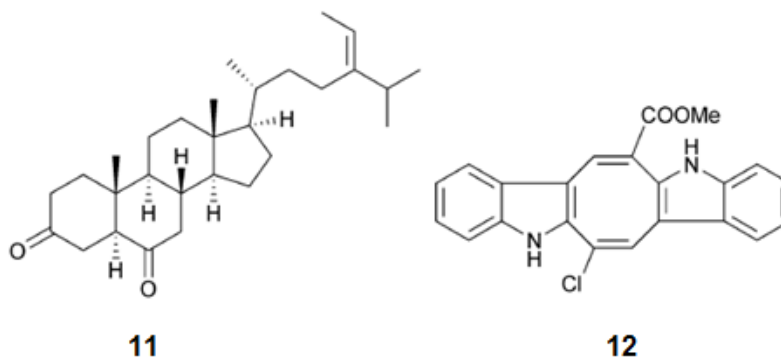


Los ácidos grasos (**5**) y (**6**), fueron aislados del alga parda *Egregia menziesii* donde se presume mediante biogénesis que proviene del ácido estearidónico. Las lactonas (**7-10**) derivadas de ácidos grasos fueron aisladas del alga parda *Eisenia bicyclis* presentan una débil actividad antibacteriana con halo de inhibición aproximada de 0,3 mm y de 0,4 mm contra las bacterias *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* respectivamente^[3]

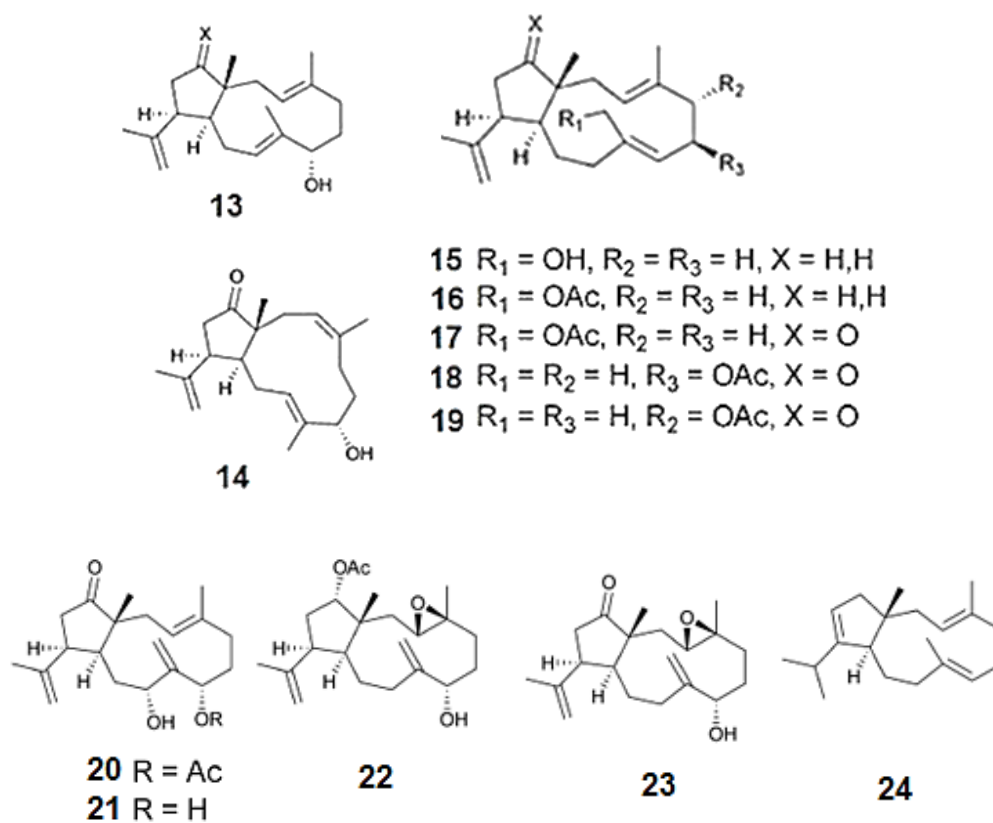


I.1.2. Compuestos terpénicos

El cetosteroide (**11**) fue aislado de la especie *Tydemania expeditionis*, un alga verde que posee una modesta actividad contra las células de cáncer de próstata. Se sabe que la biosíntesis de estos triterpenos, siguen la ruta de la formación del farnesilpirofosfato, por unión de unidades de isoterpenos cabeza-cola.^[1]



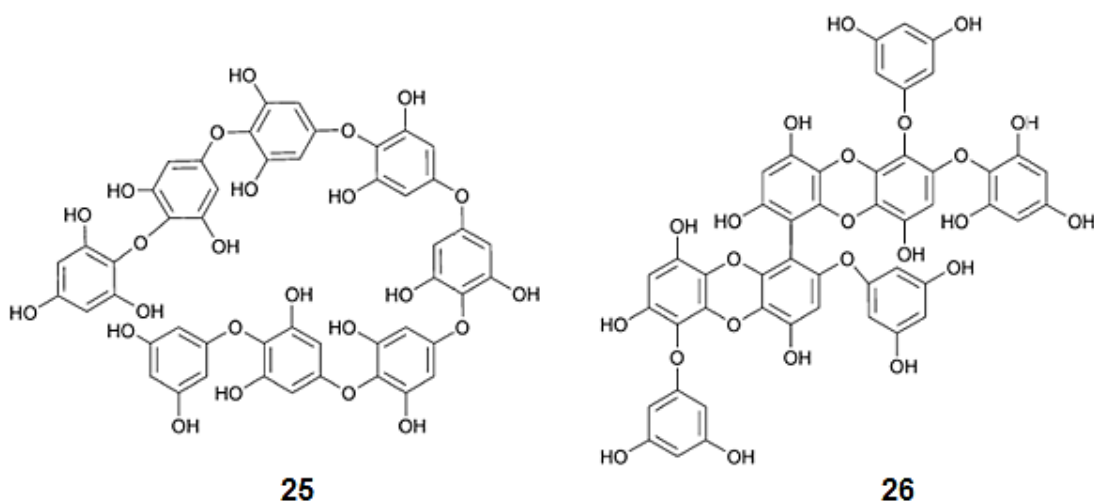
El cloro-bisindol (**12**) posee una débil actividad antifúngica y fue aislado del alga verde *Caulerpa racemosa*. Diversos diterpenoides (**13-24**) aislados del alga parda *Dilophus spiralis*, poseen actividad antibacteriana contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.^[1]



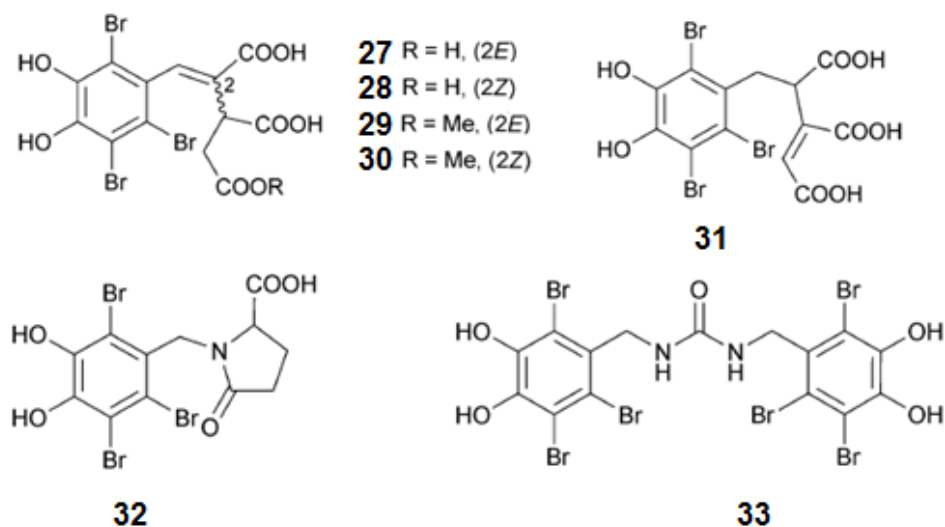
I.1.3. Compuestos fenólicos

Existen compuestos fenólicos sencillos que son capaces de formar moléculas de mediano peso molecular como el florotanino (**25**) conformado por 8 anillos aromáticos, aislado del alga parda *Ishige foliacea*, el cual es capaz de regular la cantidad de glucosa en sangre, siendo así, un potencial como antidiabético.^[1]

Mientras otro florotanino (**26**) aislado de otra alga parda *Ecklonia cava*, posee propiedades antioxidantes, debido a la alta deslocalización de electrones entre los anillos fenólicos. ^[1]

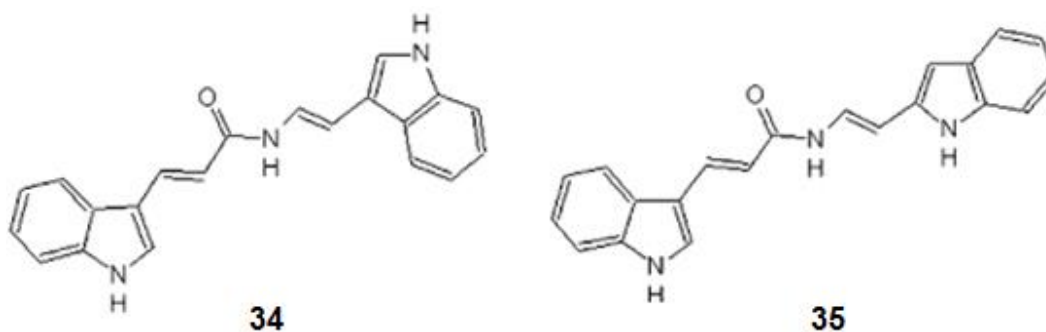


Por otro lado, bromo-fenoles son frecuentemente reportados en algas rojas, por ejemplo, de la especie *Symphyclocladia latiuscula* fueron aislados varios compuestos de este tipo (**27-33**), exhibiendo actividad antifúngica contra *Candida albicans* con $IC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$. ^[1]

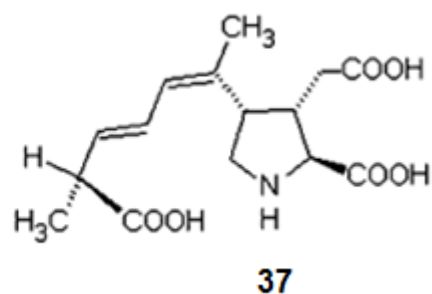
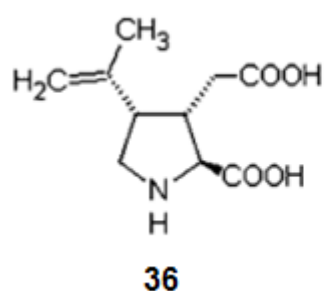


I.1.4. Heterociclos con Nitrógeno

El indol (**34**) aislado del alga roja *Chondria atropurpurea*, mostró actividad antiviral contra el virus del Herpes Simplex tipo II y citotoxicidad del cáncer nasofaríngeo y de colon. Además, el indol (**35**) un isómero estructural del indol (**34**) resultó ser citotóxico *in vitro* frente a propiedades antihelmínticas contra el parásito *Nippostrongylus brasiliensis*.^[7]

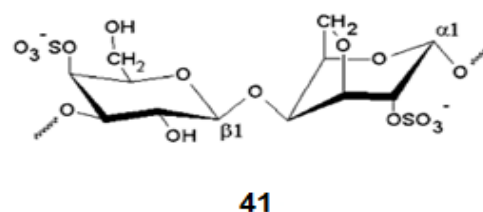
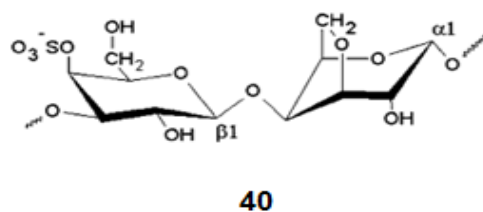
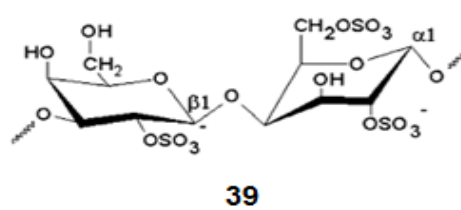
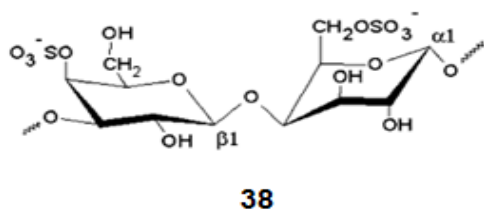


Otros heterociclos con nitrógeno, como los son el ácido α -kaínico (**36**) aislado del alga *Digenea simplex* y el ácido domóico (**37**), aislado del alga *Chondria armata*, son dicarboxilatos de pirrolidina que presentan actividad excitatoria y de excitotoxicidad y son utilizados como herramientas en la investigación de los trastornos neurofisiológicos como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la epilepsia.^[7]



I.1.5. Polisacáridos

Algunos polisacáridos sulfatados de algas rojas muestran actividades antivirales. Así, lo demuestran los polisacáridos identificados como μ -carragenano (**38**), λ -carragenano (**39**), κ -carragenano (**40**) y ι -carragenano (**41**) que fueron aislados de las algas rojas *Gigartina skottsbergii* y *Stenogramme interrupta*, los cuales presentan potente actividad antiviral *in vitro*.^[7]



El μ' -carragenano de *Gigartina skottsbergii* posee potente actividad antiviral contra diferentes cepas del virus del Herpes Simplex tipos I y II durante la etapa de adsorción del virus. Se ha demostrado igualmente, que bloquea el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y otras enfermedades de transmisión sexual *in vitro*. [7]

Las algas del Phylum Chlorophyta poseen gran relevancia biológica por su diversidad morfológica. Son importantes productores primarios y secundarios en ecosistemas terrestres y marinos. Además, las algas verdes, destacan como fuente de muchos productos químicos que podrían ser utilizados en la industria farmacéutica, como se describe a continuación. [4]

I.2. Phylum Chlorophyta

Las algas verdes han sido agrupadas en el Phylum Chlorophyta, de acuerdo a sus características morfológicas y anatómicas. Se asemejan a las plantas superiores en que tienen clorofila a y b, carotenoides, xantofilas y como material de reserva almidón (amilosa y amilopectina), (Figura 1). [8],[9],[10]

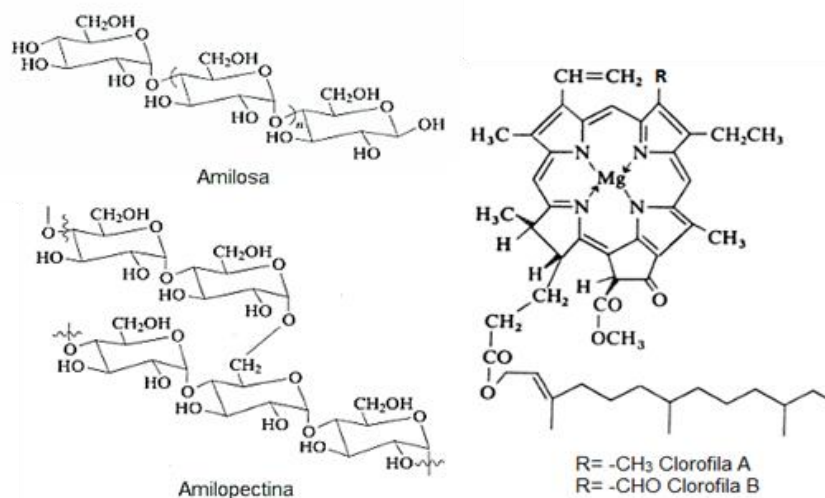


Figura 1: Tipos de clorofilas en algas verdes y como material de reserva, el almidón.

La mayoría son unicelulares o coloniales, dominan ambientes dulceacuícolas y también están presentes en ambientes marinos de aguas someras. En cuanto a la reproducción exhiben la mayor variedad de ciclos vitales y formas de reproducción que ningún otro Phylum. Este grupo es considerado como los predecesores de las plantas superiores. ^[2]

Una fracción importante de los productos naturales extraídos en algas verdes provienen del orden *Bryopsidales*, donde la gran mayoría de sus metabolitos secundarios son terpenoides (> 85%). Debido a que estos son metabolitos tóxicos utilizados en su defensa. ^{[1],[11]}

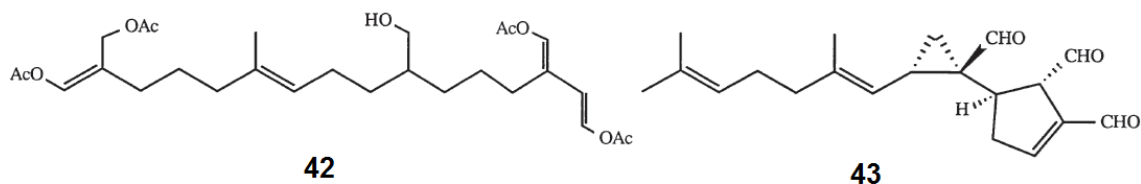
El Phylum Chlorophyta está representado por 150 familias, entre las cuales, la familia Udoteaceae ha sido estudiada por constituir elementos claves dentro de los mares y particularmente en los arrecifes coralinos, donde contribuyen con la estabilidad de los mismos. En este medio se desarrollan diversos grupos de vertebrados e invertebrados marinos que consumen estas algas. ^[12]

Como consecuencia, las algas han evolucionado respondiendo al estrés del medio que habitan, generando diversos metabolitos secundarios que representan un potencial prometedor de nuestros mares. Por lo tanto, ésteres, lactonas y ácidos carboxílicos, aislados de la familia Udoteaceae, pertenecientes a las algas verdes también exhiben importante actividad biológica. ^[12]

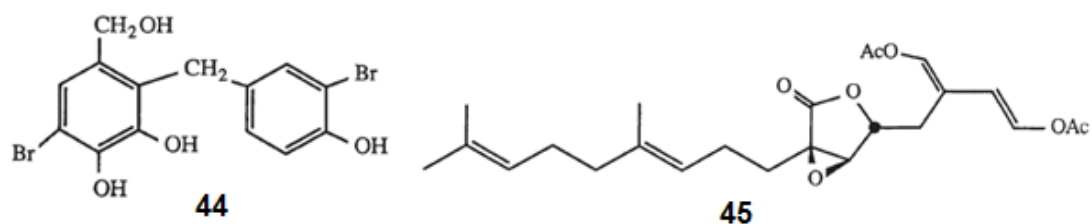
I.3. Metabolitos secundarios en la familia Udoteaceae

El diterpenoide (**42**), exhibió actividad antibacteriana, el mismo fue aislado del alga calcárea tropical del Pacífico *Tydemania expedition*. Otro interesante compuesto con importante actividad antibacteriana y antifúngica, es el halimedatrial (**43**), con un anillo ciclopropano y tres grupos aldehídos incorporados en su estructura, fue aislado

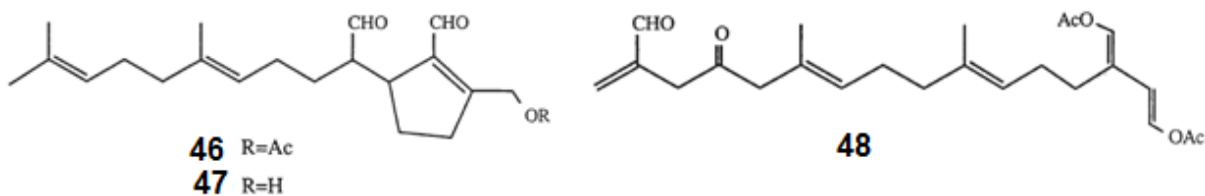
del género *Halimeda*. Se ha determinado química y biológicamente que las especies del género *Halimeda* son una de las más interesantes en la familia Udoteaceae.^[13]



El compuesto aromático bromado (**44**), aislado del alga *Avrainvillea longicaulis*, mostró actividad antibacteriana, por la inhibición del crecimiento de las bacterias *Bacillus subtilis* y *Vibrio* sp. Es posible que la formación de este metabolito provenga de la dimerización de un precursor del alcohol p-hidroxibencílico, seguido de la bromación por activación de los anillos aromáticos.^[13] La α , β -epoxilactona (**45**) aislada del alga *Udotea argentea*, posee moderada actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.^[13]



Los metabolitos (**46**) y (**47**) fueron aislados del alga *Udotea flabellum*, poseen importante actividad antibacteriana sobre *Vivrio harveyi*. Por otro lado, el aldehído (**48**) aislado del alga *Chlorodesmis fastigiata* exhibe actividad antifúngica contra *Chlorodesmis fastigiata*, *Lindra thallasiae* y actividad antibacteriana contra *V. harveyi*.^[13]



De igual manera las algas verdes del género *Penicillus*, muestran gran relevancia química y biológica. A continuación se describe su clasificación taxonómica, distribución geográfica, morfología de las especies estudiadas en esta investigación y los metabolitos aislados para éste género con importantes actividades biológicas.

I.4. El género *Penicillus*

El género *Penicillus*, perteneciente a la familia Udoteaceae del Phylum Chlorophyta, cuya clasificación taxonómica se muestra en la tabla 2 y fue descrito originalmente por Lamarck en 1813. Incluye un grupo de especies calcificadas, con un talo erecto, constituido por el agrupamiento de filamentos cenocíticos entrelazados que conforman un eje principal o estipe, el cual se ramifica en su extremo distal para originar un capítulo, con filamentos dicotómicos a tricotómicos libres, que presentan constricciones por debajo de sus bifurcaciones.

Este capítulo posee apariencia de brocha, por lo que se le ha conocido popularmente como “Brocha de Neptuno”. Estas algas presentan un estipe que sostiene al capítulo y en su base una porción filamentosa rizoidal que las adhiere firmemente al sustrato blando en el que se desarrollan, por lo general arenoso o areno-fangoso. ^[14]

Tabla 2. Clasificación taxonómica de las algas objeto de estudio (Según Wynne 2011) ^[14]

Imperio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Protista</i>
Phylum	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Ulvophyceae</i>
Orden	<i>Bryopsiales</i>
Familia	<i>Udoteaceae</i>

I.4.1. Distribución geográfica del género *Penicillus*

Este género está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y se halla en aguas relativamente poco profundas del Caribe, donde alcanza su mayor diversidad. El género también se desarrolla en el Mediterráneo y el Indo-Pacífico. De esta manera, se conocen 32 especies de *Penicillus* registrados hasta el presente, de los cuales 10 han sido aceptados taxonómicamente. Particularmente, en el Mar Caribe, se conocen cuatro especies: *Penicillus capitatus*, *Penicillus dumentosus*, *Penicillus lamourouxii* y *Penicillus pyriformis*. ^[12]

En Venezuela, el género *Penicillus* ha sido citado en el estado Falcón (Península de Paraganá, Parque Nacional Morrocoy) y en las Dependencias Federales (Parque Nacional archipiélago Los Roques, Isla La Tortuga e Isla de Aves), donde sólo se tenían registros de *Penicillus capitatus* y *Penicillus pyriformis*. Solo recientemente se obtuvieron nuevos registros de *Penicillus dumentosus* f. *expansus* y *Penicillus lamourouxii* para aguas venezolanas, por lo que aún hay que explorar nuestras costas para conocer mejor su distribución. ^{[15], [16]}

1.5. *Penicillium capitatus* Lamarck

Alga de 6 cm de alto, pedicelo de 4 cm de largo, más ancho en la zona apical y delgado en la zona basal, con una superficie rugosa y firme, penetrando ligeramente en el centro del capítulo, conformado por filamentos con terminaciones redondeadas en la región cortical. Capítulo esférico a ovalado, siendo densa la disposición de los filamentos dándole una forma casi globular con un ángulo mayor o igual a 45° , con filamentos de hasta 2 cm de largo, se ramifican dicotómicamente, son moderadamente calcificados y poco entrelazados, de 162 μm de diámetro; presentan de 4 a 5 constricciones y se observa que la mayoría de las terminaciones tienen dicotomías pequeñas. Algunos filamentos presentan ápices romos, pero la mayoría son redondeados. Los filamentos que forman la corteza del estipe presentan ramificaciones en número de 4 a 5, dispuestas en forma cerrada, con ápices redondeados a truncados. La masa rizoidal de 1 a 1,5 cm de diámetro, con la que se adhiere firmemente al sustrato (Figura 2). [16], [17]

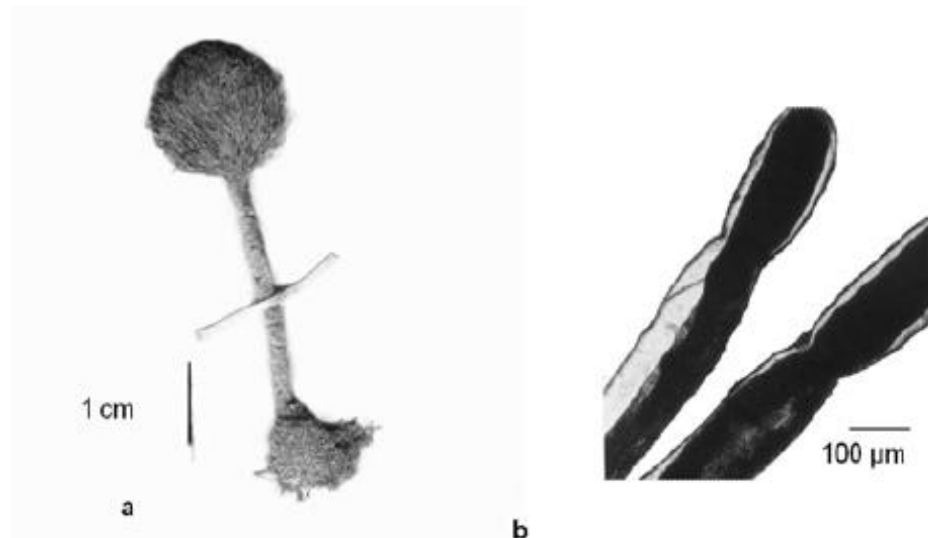


Figura 2: *Penicillium capitatus*: a) hábito; b) Detalle de los filamentos del capítulo. [16]

I.6. *Penicillus pyriformis* A. Gepp & E.S. Gepp

Algas de 2 a 5 cm de largo; pedicelo corto de 0,5 a 3 cm, de forma cilíndrica a comprimida de 5-7 mm de diámetro. Textura áspera, de aspecto esponjoso, penetrando fuertemente en el centro del capítulo, conformado por filamentos con terminaciones aguzadas en la región cortical. Capítulo de color verde-grisáceo de oval a piriforme, achatado en el tope, formando ángulos de 45° o menos. Filamentos del capítulo firme, enredado, fuertemente calcificados al punto de ser quebradizos de 155 mm de diámetro, con 2 a 4 constricciones. Los filamentos que conforman el capítulo están ramificados de 2 a 4 veces, con ápices delgados y redondeados en algunos puntos, (Figura 3).^{[16], [17], [18]}

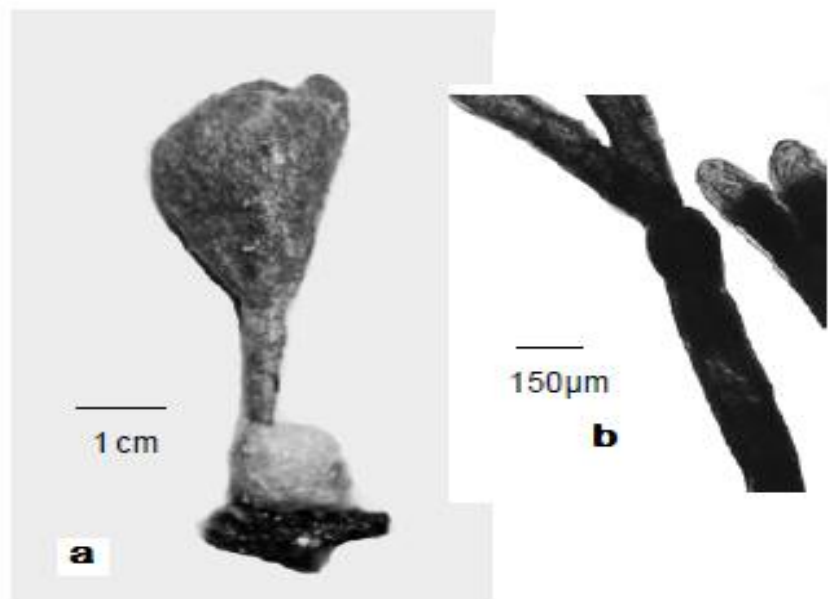


Figura 3: *Penicillus pyriformis*: a) Hábito, b) Filamentos del capítulo.^[16]

I.7. *Penicillus lamourouxii* Decaisne

Algas de 6 a 8 cm de longitud, bastante calcificadas; estipe de 3 a 4 cm, suave al tacto, algo flácido, frecuentemente hueco, subteretes a comprimidos. El estipe no penetra completamente el capítulo. Los filamentos del estipe son inflados por encima de las constricciones basales, ramificándose en un ángulo aproximado de 45° o mayor. Sus ápices son truncados. Capítulo suelto de 3 a 5 cm de longitud, de 3 a 4 cm de diámetro, algunas veces hasta 5 cm, de forma oval a redondeada. Los filamentos del capítulo presentan muchas constricciones y miden de 250-450 μm de diámetro. Se adhieren al sustrato por una masa rizoidal de 1 a 1,5 cm de diámetro (Figura 4).^{[16]. [18]}

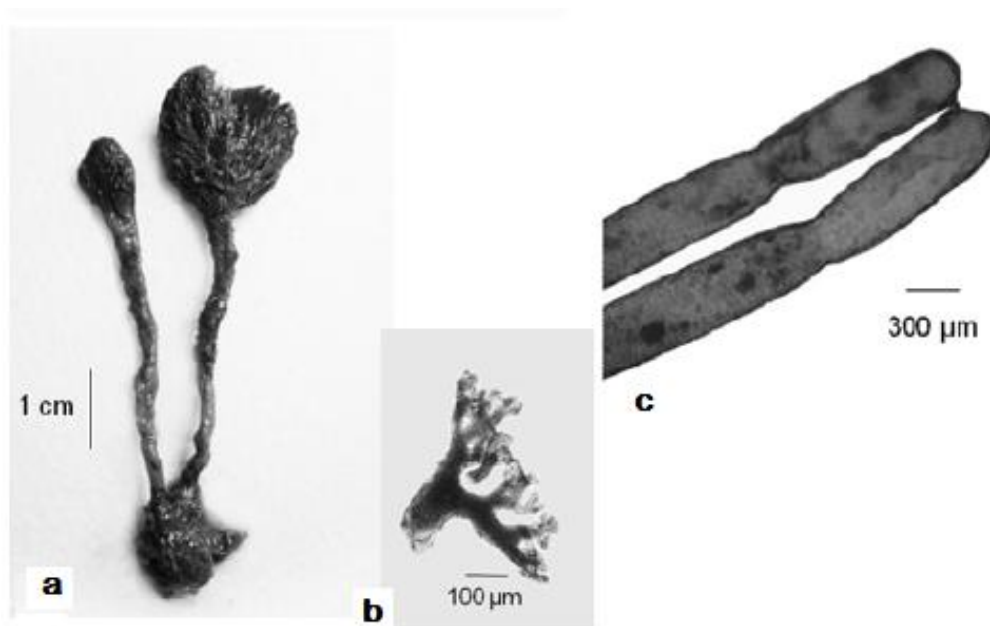


Figura 4: *Penicillus lamourouxii*: a) Hábito; b) Utrículo de los filamentos del estipe; c) Detalle de los filamentos del capítulo.^[16]

En la figuras 5 y 6, se muestran los detalles morfológicos de los utrículos internos del estipe y de los filamentos del capítulo para las especies del género *Penicillium* antes descritas. Además la tabla 3, se aprecia una comparación de las principales características que permiten distinguir entre las especies de *Penicillium* estudiadas.

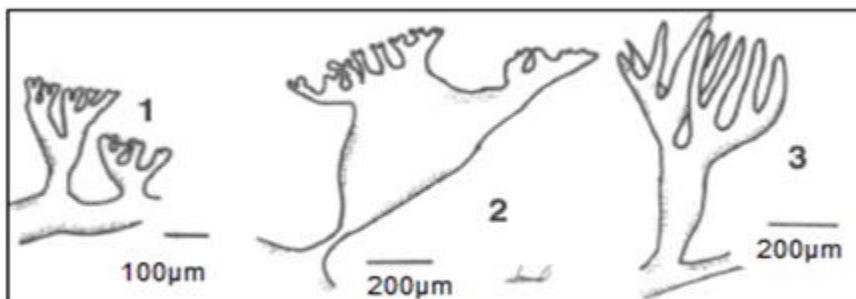


Figura 5: Formas del utrículo del estipe en el género *Penicillium*: 1) *P. capitatus*; 2) *P. lamourouxii*; 3) *P. pyriformis*.^[18]

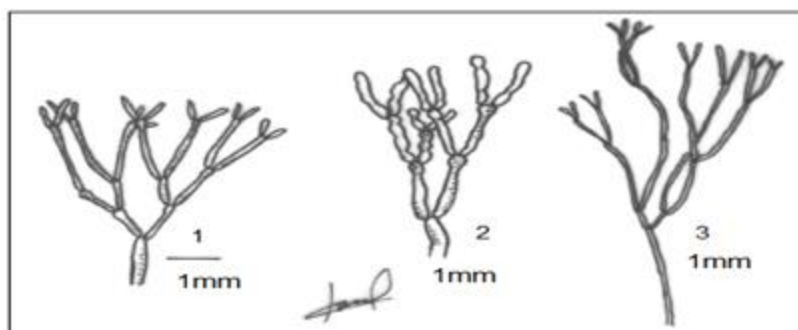


Figura 6: Filamentos del capitulum en el género *Penicillium*: 1) *P. capitatus*; 2) *P. lamourouxii*; 3) *P. pyriformis*.^[18]

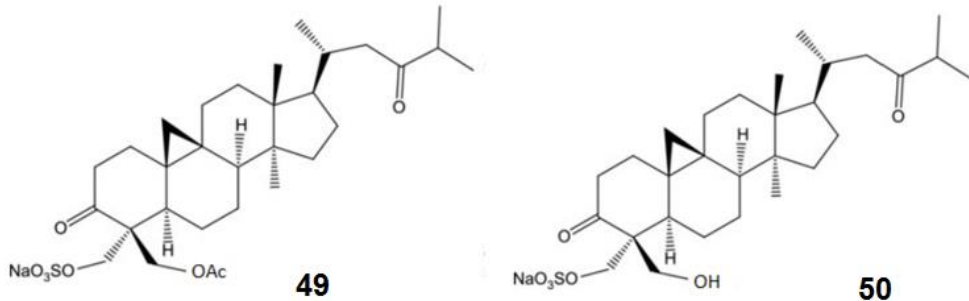
Tabla 3. Algunas características de las especies de *Penicillus* estudiadas en la costa Venezolana. ^[16]

Especie	Capítulo	Ramificación del capítulo	Filamentos del capítulo	Estipe	Utrículos del estipe	Base utricular
<i>Penicillus capitatus</i>	$\geq 45^\circ$	Ramificación dicitómica	Filamentos del mismo tamaño, no moniliformes	Sólido	Extremos truncados	No sacciforme
<i>Penicillus lamourouxii</i>	$\geq 45^\circ$	Ramificación dicitómica y subdicotómica	Filamentos del mismo tamaño, moniliformes	Hueco	Extremos truncados	Sacciforme
<i>Penicillus pyriformis</i>	$\leq 45^\circ$	Ramificación dicotómica y subdicotómica	Filamentos cortos y largos, no moniliformes	Sólido	Extremos aguzados	No sacciforme

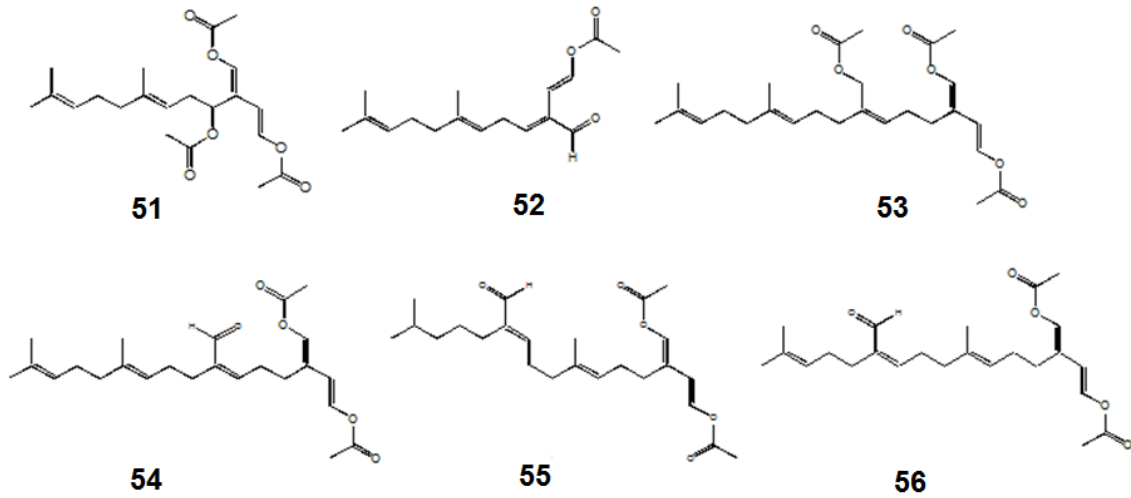
Como se realizará un estudio quimiotaxonómico entre las especies *P. capitatus*, *P. lamourouxii* y *P. pyriformis*, donde se buscará establecer una comparación entre los metabolitos aislados en dichas especies, resulta importante hacer una revisión bibliográfica de los metabolitos secundarios aislados para las especies de este género.

I.8. Compuestos citados para el género *Penicillus*

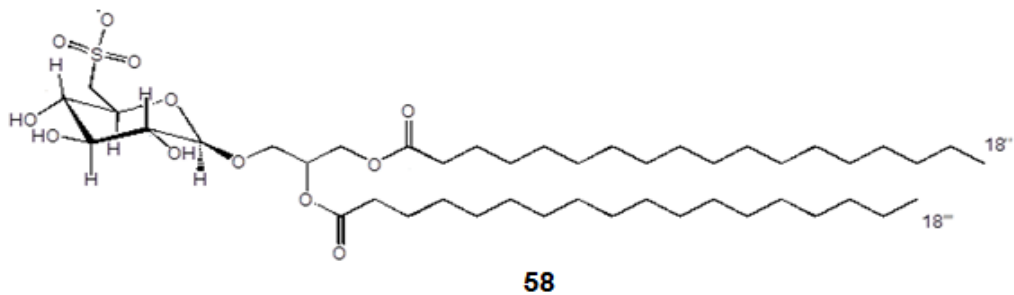
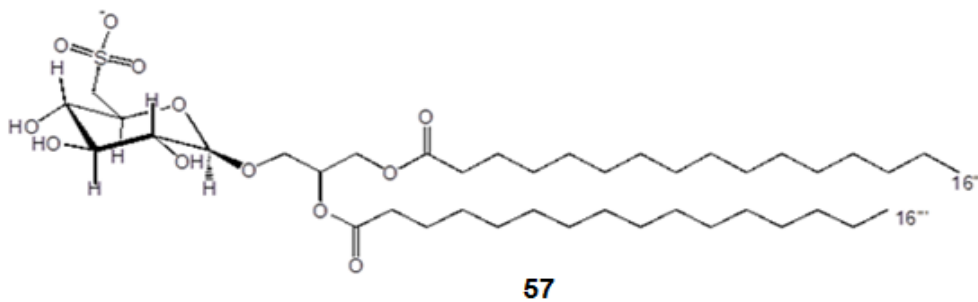
Las capisteronas (**49**) y (**50**) fueron aisladas del alga *Penicillus capitatus*, estos metabolitos secundarios poseen potente inhibición del patógeno *Lindra thallasiae*.^[19] Además, en otro estudio presentó que estos metabolitos poseen buena actividad como inhibidoras de excreción celular lo que hace más eficiente la acción antimicótica del fluconazol frente al hongo *Saccharomyces cerevisiae*.^[20]

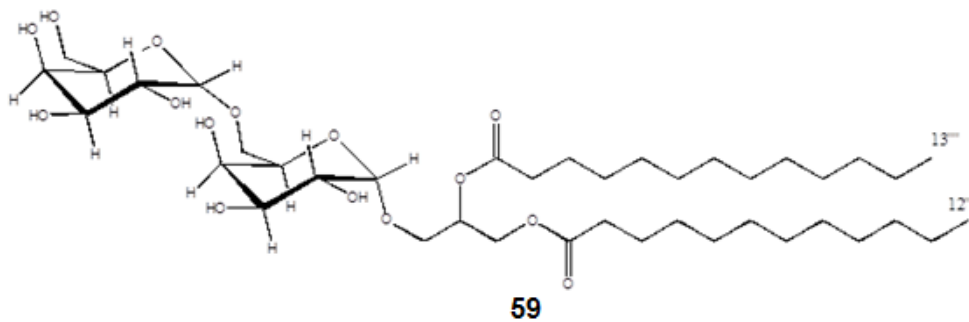


Las algas de la familia *Udoteaceae*, generan compuestos terpenoides y no terpenoides aromáticos biológicamente activos, siendo el primer reporte de metabolitos secundarios para el género *Penicillus*.^[21] El triacetato (**51**) y el aldehído (**52**) fueron aislados de la especie *Penicillus capitatus* y además, el diterpeno triacetato (**53**), el dihidroudoteal (**54**) aislados de la especie *Penicillus dumentosus*, presentan actividad contra diversos patógenos marinos, microorganismos terrestres y potenciales depredadores. Por otro lado, los diterpenoides (**55**) y (**56**) aislados de la especie *Penicillus dumentosus*, no presentaron actividad biológica.^[16]

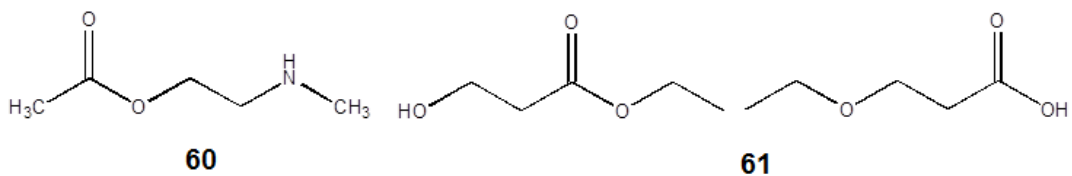


De igual forma, se aislaron los metabolitos tipo sulfoquinovosil diacilglicerol (con cadenas lipídicas saturadas de 16 y 18 átomos de carbono) del alga *Penicillus capitatus*, siendo así los compuestos (57) y (58) respectivamente, no reportados para algas verdes y un compuesto nuevo tipo digalactoglicerolípido (59). El compuesto tipo sulfoquinovosil diacilglicerol con dos cadenas saturadas de 18 átomos de carbono (58), presentó una mayor actividad antiinflamatoria con una concentración inhibitoria máxima media ($IC_{50} = 43,62 \mu\text{g/mL}$) debido a que inhibió la producción de óxido nítrico (NO) sin ser citotóxico.^[22]





Además, se lograron aislar 2 compuestos: uno de tipo amino éster (**60**) y el compuesto (**61**) del alga *Penicillus capitatus*, el cual se propuso 2 posibles estructuras, 3-hidroxi-propanoato de etilo y el ácido 3-etoxi-propanóico. Finalmente, no se pudo aseverar cual era la estructura exacta ^[22]



Polisacáridos sulfatados aislados de la especie *Penicillus capitatus* colectada en el Parque Nacional Morrocoy en Venezuela, mostró un actividad anticoagulante moderada, apreciados por las pruebas de coagulación generales. Asimismo, los resultados preliminares sugieren que uno de los posibles mecanismos implicados en la actividad anticoagulante es la inhibición directa de la trombina, contribuyendo así, en la búsqueda de nuevos tratamientos a pacientes que padecen enfermedades cardiovasculares. ^[23]

Así que, realizar una comparación quimiotaxonómica entre los metabolitos secundarios que puedan encontrarse en las especies *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii* y *Penicillus pyriformis* será una contribución significativa al estudio de las algas pertenecientes a este género.

I.9. Quimiotaxonomía

Los primeros desarrollos en química de productos naturales, botánicos y químicos pudieron hacer posible la caracterización y clasificación en base a sus compuestos químicos. El interés en la relación entre los constituyentes y la clasificación de organismos fotosintéticos, tales como plantas, macroalgas: como por ejemplo algas verdes, parecía no importar principalmente porque el número de productos naturales conocidos era pequeño y el conocimiento de su distribución era escaso. [24], [25]

El método de “taxonomía química” es simple en principio y está basado en la investigación de la distribución de compuestos químicos o grupos biosintéticamente relacionados. Distintos organismos como las algas verdes contienen diversas sustancias las cuales, aunque pertenecen a diferentes clases de compuestos químicos, parecen ser biosintéticamente análogos. Como algunas plantas probablemente contienen un sistema de enzimas similar y los compuestos que ellos producen podría indicar una relación entre estos organismos. [24], [26]

Cambios relativamente pequeños en estos organismos, causados por mutaciones pueden dar a lugar, grandes diferencias en la formación de metabolitos secundarios. Así compuestos idénticos son con frecuencia encontrados en muchas algas que no están relacionadas, desconcertando, con frecuencia a los químicos y el uso de características químicas en la clasificación de las algas. [24], [26]

Por lo tanto, es fácil concebir que durante la evolución, la producción de algunas sustancias o grupo de sustancias biosintéticamente relacionadas, se han desarrollado por distintas vías en algunas algas. Sin embargo, es altamente improbable que algas que no se encuentran relacionadas puedan tener enzimas que sintetizen el mismo espectro de compuestos químicamente no relacionados. [24], [27]

Estudios quimiotaxonómicos deberían, por lo tanto, incluir la investigación de patrones de compuestos de origen en algas y preferiblemente en partes individuales de las algas. Tales como es capitulo, estipe, rizoides, etc.

Los constituyentes químicos generalmente varían considerablemente de un órgano a otro. Investigaciones en conjunto son necesarias en función de obtener en realidad evidencia convincente de la relación o ausencia de algas. Es peligroso dibujar conclusiones taxonómicas para la presencia o ausencia de un compuesto en un alga. Siendo aconsejable que los órganos a comparar sean biológicamente homogéneos. ^{[24], [28]}

Por razones prácticas los químicos frecuentemente realizan extracciones a toda el alga. Esto reduce importancia a los estudios y es altamente deseable que dicho trabajo debiera ser complementado por la investigación de la localización de las sustancias aisladas. ^[20]

Todos los organismos vivos están sujetos a variaciones, diferentes ejemplares de la misma especie a veces difieren considerablemente. Esto debido a condiciones ambientales: como el suelo, factores estacionales o climáticos y fisiología del alga. Por lo tanto, se debe siempre examinar varios ejemplares de la misma especie, si es posible, los especímenes cultivados bajo diferentes condiciones. ^{[24], [27]}

El uso de marcadores taxonómicos durante mucho tiempo ha sido reconocido en la sistemática de algas. Uno de los ejemplos más conocidos es el uso de pigmentos tales como clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas como determinación de las diferentes divisiones en las algas. Sin embargo, para un compuesto orgánico sea útil como un carácter quimiotaxonómico, debe ser específico a un determinado taxón o grupo de organismos y debe ser suficientemente abundante y poseer cierta estabilidad para poder ser aislado e identificado. ^[29]

Diversos carbohidratos de bajo peso molecular, formados durante la fotosíntesis por diferentes algas, han de ser considerados como prometedores caracteres quimiotaxonómicos, entre los cuales se encuentran los polioles y glucósidos los cuales han sido usados exitosamente para discriminación quimiotaxonómica en algas rojas. Además, de los anteriores, se encuentran los polioles los cuales también son sintetizados por diversas taxa de algas verdes. [30]

Por otro lado, las composiciones ácidos grasos en numerosas macroalgas, se han reportado en todo el mundo por su potencial nutricional. Sin embargo, sus implicaciones quimiotaxonómicas, ganaron importancia sólo en la última década. [31] Se sabe, que los lípidos figuran como importantes biomarcadores moleculares, debido a la especificidad de su biosíntesis y la adaptación de sus rutas biosintéticas, como resultado de adaptaciones medio ambientales. Entre ellos, los fitosteroles representan un único grupo que puede ser utilizado como un biomarcador quimiotaxonómico por los principales Phylum de algas: Rhodophyta, Chlorophyta y Phaeophyta. En general, los esteroides C₂₉, es decir, fucosterol (E), isofucosterol (Z), son los principales compuestos en algas pardas y verdes, respectivamente. [32]

Un estudio reciente, cuantificó las composiciones de ácidos grasos de 16 especies de algas verdes pertenecientes al orden Bryopsidales (Tabla 4). Revelando altos contenidos de ácidos grasos insaturados, con la excepción de las especies: *C. racemosa v. occidentalis*, *C. racemosa v. corneyphora*, *Codium dwarkense*, *Bryopsis plumosa* contenían con mayor contenido de ácidos grasos saturados. [27] Así, los principales ácidos grasos detectados en estas 16 algas fueron: mirístico (C14: 0), palmítico (C16: 0), esteárico (C18: 0), palmitoléico (C16: 1, n-9), oléico (C18: 1, n-9), linoléico (C18: 2, n-6), α -linolénico (18: 3, n-3) y ácido estearidónico (C18: 4, n-3). Curiosamente, ningún ácido graso trans fue hallado en ninguna de estas algas verdes estudiadas, sabiendo que este tipo de grasas, aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares en humanos. [31]

Tabla 4. Contenido de lípidos totales (LT) para diferentes órdenes.

<i>Bryopsidales</i>	LT (mg/g peso)
<i>Caulerpa scalpelliformis</i>	13.3 ± 1.5
<i>Caulerpa veravalensis</i>	16 ± 0.3
<i>Caulerpa racemosa</i>	15 ± 0.8
<i>Caulerpa racemosa v. corynephora</i>	10.3 ± 2.1
<i>Caulerpa racemosa v. occidentalis</i>	5.5 ± 1.1
<i>Caulerpa microphysa</i>	4.7 ± 1.3
<i>Caulerpa verticillata</i>	15.3 ± 1.3
<i>Caulerpa sertularioides</i>	9.1 ± 2.2
<i>Codium dwarkense</i>	14 ± 2.2
<i>Bryopsis pennata</i>	9.6 ± 1.7
<i>Bryopsis plumosa</i>	11.3 ± 1.5
<i>Trichosolen mucronatus</i>	5.4 ± 1.1
<i>Udotea indica</i>	12 ± 4.7
<i>Halimeda discoides</i>	3.1 ± 0.4
<i>Halimeda tuna</i>	10 ± 1.7

I.10. Justificación

En el Caribe se han encontrado registro de diversos estudios ficoquímicos y biológicos al género *Penicillus* colectado en Estados Unidos de América (Florida) y Las Bahamas. De igual manera, en Venezuela hay estudios significativos del tipo ficoquímico y biológico a la especie *Penicillus capitatus* Lamarck realizado por Herrera, A. (2009) y recientemente por Arata, P.; Quintana, I.; Canelón, D. J.; Vera, B.; Compagnone, R. S.; Ciancia, M. (2015).

Este estudio ficoquímico se realizó a las algas *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii* y *Penicillus pyriformis* se basó en la importancia biológica y química que tienen los metabolitos secundarios hallados a partir de productos naturales marinos, contribuyendo al desarrollo científico de nuestro país. Este estudio formó parte de un proyecto en conjunto entre la Cátedra de Química de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela y el Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos (356) de Escuela de Química la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela en el cuál se evaluó la posible presencia de un marcador quimiotaxonómico en las algas: *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii* y *Penicillus pyriformis*.

I.11. Objetivos

I.11.1. Objetivo General

Realizar el estudio ficoquímico de tres especies pertenecientes al género *Penicillus* (*P. capitatus* Lamarck, *P. lamourouxii* Decaisne y *P. pyriformis* A. Gepp & E. S. Gepp).

I.11.2. Objetivos Específicos

- Colectar e identificar las especies *P. capitatus*, *P. lamourouxii* y *P. pyriformis*.
- Efectuar la extracción de las especies estudiadas del género *Penicillus* con MeOH y particionar los mismos con solventes orgánicos de distintas polaridades: hexano, diclorometano y acetato de etilo.
- Separar y purificar los compuestos mayoritarios presentes en los extractos obtenidos de las especies del género *Penicillus*, por medio de técnicas cromatográficas.
- Determinar las estructuras de los compuestos mayoritarios por medio del empleo de técnicas espectroscópicas modernas: Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectrometría de Masas (EM) e Infrarrojo (IR).
- Establecer en lo posible la comparación quimiotaxonómica de los metabolitos secundarios hallados en las especies estudiadas del género *Penicillus*.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Materiales, reactivos y equipos.

II.1.1 Equipos:

- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN-¹H) frecuencia de 300,2 MHz y de Carbono 13 (RMN-¹³C) frecuencia de 75,49 MHz marca Bruker (ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC).
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN-¹H) frecuencia de 270 MHz y de Carbono 13 (RMN-¹³C) marca ECLIPSE-JEOL (ubicado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela).
- Espectrofotómetro de Infrarrojo medio (FT-IR), marca Nicolet, modelo 380, operado en modo de transformada de Fourier. Se empleó un intervalo espectral de 4000-400 cm⁻¹ y una resolución de 4 cm⁻¹ (ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela).
- Espectrómetro de masas acoplado a detector de masas, ambos marca Agilent Technologies (ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela).
- Rotavapor BÜCHI R-114.
- Lámpara ultravioleta (UV): USLV-25 onda corta (254 nm) y onda larga (366 nm).
- Balanza analítica OHAUS.

II.1.2. Soportes cromatográficos:

- La realización de cromatografía de capa fina fase normal, se empleó placas de sílica gel Alugram ® de dimensiones 20 x 20 cm, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄.
- En la realización de cromatografía en columna de fase normal, se utilizó sílica gel 60, con las siguientes especificaciones: 0,063-0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM.
- En cromatografía de capa fina fase reversa, se utilizó placas RP-18 soportadas en aluminio, de longitud 5 x 7,5 cm.
- En separaciones cromatográficas de tipo fase reversa, se utilizó columnas Sep-Pak® Vac 35 cc y 12 cc C₁₈.

II.1.3. Solventes y reactivos:

Solventes

- Hexano (C₆H₁₄), grado técnico previamente destilado.
- Diclorometano (CH₂Cl₂), grado técnico previamente destilado.
- Acetato de etilo (AcOEt), grado técnico previamente destilado.
- Metanol (MeOH), grado técnico previamente destilado.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), grado analítico. Aldrich.
- Agua (H₂O), previamente destilado.

Reveladores

- Revelador de p-anisaldehído, grado analítico. Aldrich.
- Revelador de timol, grado analítico. Aldrich.
- Revelador de ninhidrina, grado analítico. Aldrich.

Solventes para análisis RMN

- Cloroformo deuterado (CDCl₃), grado analítico. Aldrich.
- Metanol deuterado (MeOD), grado analítico. Aldrich.

- Dimetilsulfoxido deuterado (DMSO- d_6). Aldrich.

II.2. Área de recolección de las algas pertenecientes al género *Penicillus*.

Las algas verdes pertenecientes al género *Penicillus*, fueron colectadas manualmente a una profundidad aproximada de 1 metro en la Playa Mero, Parque Nacional Morrocoy, Estado Falcón (Figura 7), en abril de 2013 y fueron identificadas por la Doctora Vera Beatriz (Instituto de Biología Experimental, Centro de Botánica Tropical, Universidad Central de Venezuela).

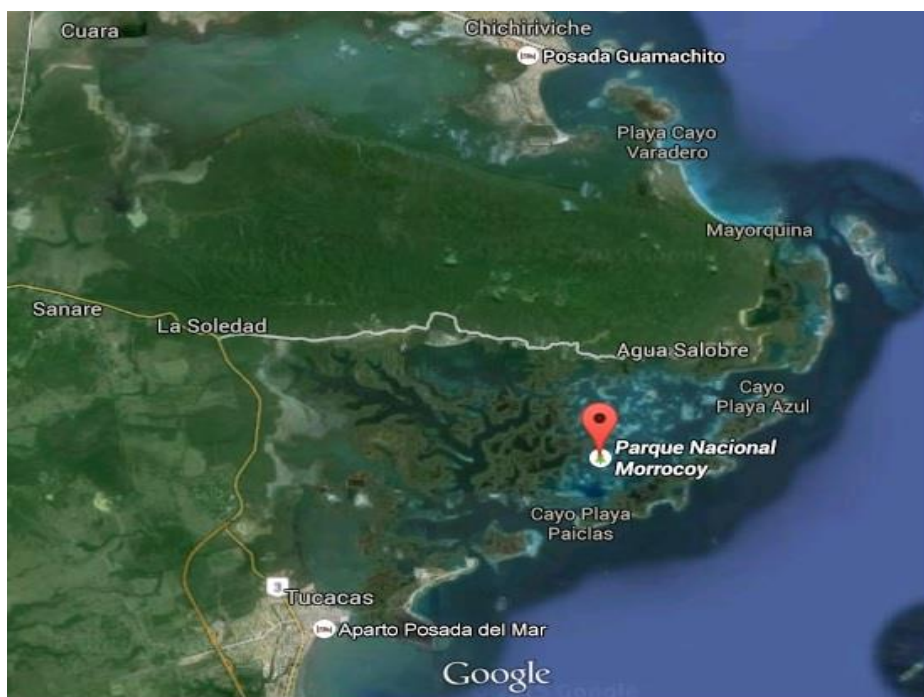
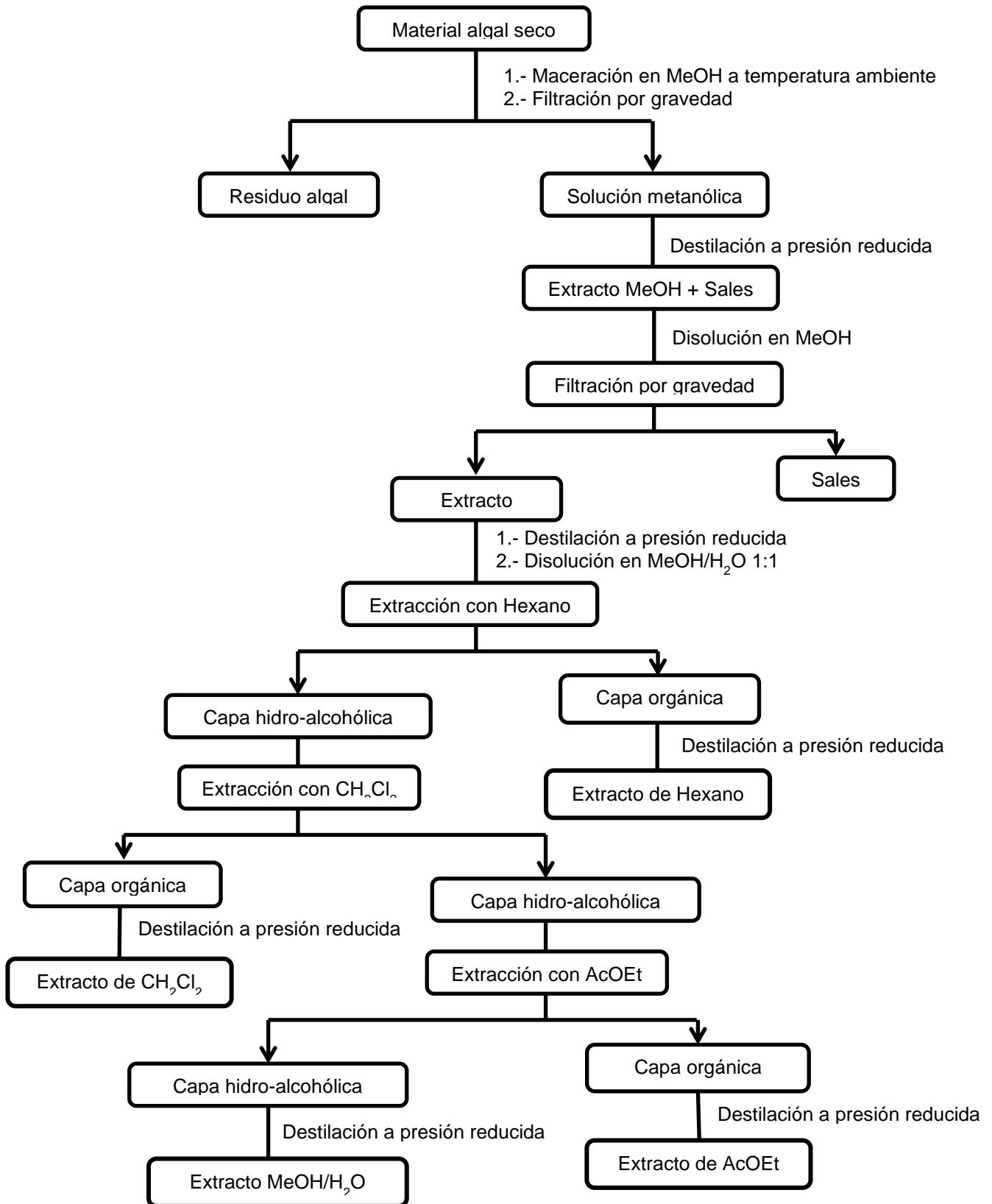


Figura 7. Mapa del parque Nacional Morrocoy, estado Falcón, Venezuela.^[33]

Una vez colectadas las algas, se sometieron a un proceso de refrigeración para su conservación desde el lugar de colección hasta el Laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos (356) de Escuela de Química la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Luego, se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 días y fueron sometidas a una limpieza manual con un cepillo de cerdas suaves para eliminar arena y otros residuos. Posteriormente se clasificaron y se separaron determinando que las especies pertenecientes al género *Penicillus* fueron: *P. lamourouxii*, *P. capitatus*, y *P. pyriformis*. Ejemplares representativos con números de colección: Q1 (*P. lamourouxii*), Q2 (*P. capitatus*) y Q3 (*P. pyriformis*) fueron depositados en el Jardín Botánico de la Universidad Central de Venezuela.

II.3. Procedimiento experimental.

Cada por separado fueron cortadas en pequeños trozos, se pesaron y realizaron maceraciones con aproximadamente 1 L de MeOH por 3 días, repitiendo este procedimiento 2 veces más. El producto de la extracción metanólica fueron filtrados y se llevaron a destilación a presión reducida. Seguidamente, se disolvió el extracto en MeOH y se separó las sales por filtración. Luego se evaporó el extracto y se disolvió en MeOH: H₂O 1:1 y se realizaron particiones sucesivas con solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetato de etilo a las especies *P. capitatus*, *P. lamourouxii* y *P. pyriformis* como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Método de extracción de las algas marinas.

II.3.1 Obtención de los extractos del alga *Penicillus capitatus*

Para la extracción del material seco se pesaron 53,85 g y se maceró el alga cortada en 1 L de metanol, por tres días. Después de realizar este procedimiento tres veces, la mezcla se filtró por gravedad y se concentró al vacío hasta sequedad, el peso fue 3,01 g. El extracto metanólico y sales, fue disuelto en la mínima cantidad de metanol, se filtró por succión y se obtuvieron unos cristales insolubles en metanol, correspondientes a sales inorgánicas con un peso de 1,53 g. Lo que permaneció disuelto en metanol, se llamó extracto crudo del alga. Se evaporó a presión reducida el metanol y se obtuvo un peso de 1,34 g.

El extracto crudo, fue disuelto en 50 mL de solución MeOH/H₂O, con una relación 1:1 (solución hidro-metanólica) y fue particionada en orden creciente de polaridad con hexano, diclorometano y acetato de etilo con 3 volúmenes de solvente 50 mL. Se obtuvieron 4 extractos: extracto de hexano (JGPCH), extracto de diclorometano (JGPCD), extracto de acetato de etilo (JGPCAc) y extracto hidro-metanólico (JGPCM). En la tabla 5, se muestran las cantidades de extracto obtenido luego de la partición.

Tabla 5. Masa de los extractos obtenidos alga *P. capitatus*

Extracto	Masa del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano (JGPCH)	0,33	25,88
Diclorometano (JGPCD)	0,22	17,09
Acetato de Etilo (JGPCAc)	0,04	3,51
Hidro-metanólico (JGPCM)	0,68	53,52

II.3.2 Obtención de los extractos del alga *Penicillus lamourouxii*

Para la extracción del material seco se pesaron 58,78 g y se maceró el alga cortada en 1 L de metanol, por tres días. Después de realizar este procedimiento tres veces, la mezcla se filtró por gravedad y se concentró al vacío hasta sequedad, el peso fue 2,48 g. El extracto metanólico y sales, fue disuelto en la mínima cantidad de metanol, se filtró por succión y se obtuvieron unos cristales insolubles en metanol, correspondientes a sales inorgánicas con un peso de 0,81 g. Lo que permaneció disuelto en metanol, se llamó extracto crudo del alga. Se evaporó a presión reducida el metanol y se obtuvo un peso de 1,74 g.

El extracto crudo fue disuelto en 50 mL de solución MeOH/H₂O, con una relación 1:1 (solución hidro-metanólica) y fue particionada en orden creciente de polaridad con hexano, diclorometano y acetato de etilo con 3 volúmenes de solvente 50 mL. Se obtuvieron 4 extractos: extracto de hexano (JGPLH), extracto de diclorometano (JGPLD), extracto de acetato de etilo (JGPLAc) y extracto hidro-metanólico (JGPLM). En la tabla 6, se muestran las cantidades de extracto obtenido luego de la partición.

Tabla 6. Masa de los extractos obtenidos alga *P. lamourouxii*

Extracto	Masa del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano (JGPLH)	0,55	32,91
Diclorometano (JGPLD)	0,20	12,09
Acetato de Etilo (JGPLAc)	0,06	3,61
Hidro-metanólico (JGPLM)	0,86	51,38

II.3.3 Obtención de los extractos del alga *Penicillus pyriformis*

Para la extracción del material seco se pesaron 100,18 g y se maceró el alga cortada en 1,5 L de metanol, por tres días. Después de realizar este procedimiento tres veces, la mezcla se filtró por gravedad y se concentró al vacío hasta sequedad, el peso fue 5,10 g. El extracto metanólico y sales, fue disuelto en la mínima cantidad de metanol, se filtró por succión y se obtuvieron unos cristales insolubles en metanol, correspondientes a sales inorgánicas con un peso de 1,98 g. Lo que permaneció disuelto en metanol, se llamó extracto crudo del alga. Se evaporó a presión reducida el metanol y se obtuvo un peso de 2,60 g.

El extracto crudo fue disuelto en 50 mL de solución MeOH/H₂O, con una relación 1:1 (solución hidro-metanólica) y fue particionada en orden creciente de polaridad con hexano, diclorometano y acetato de etilo con 3 volúmenes de solvente 50 mL. Se obtuvieron 4 extractos: extracto de hexano (JGPPH), extracto de diclorometano (JGPPD), extracto de acetato de etilo (JGPPAc) y extracto hidro-metanólico (JGPPM). En la tabla 7, se muestran las cantidades de extracto obtenido luego de la partición.

Tabla 7. Masa de los extractos obtenidos del alga *P. pyriformis*

Extracto	Masa del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano (JGPPH)	0,68	27,59
Diclorometano (JGPPD)	0,39	16,06
Acetato de Etilo (JGPPAc)	0,09	3,56
Hidro-metanólico (JGPPM)	1,29	52,79

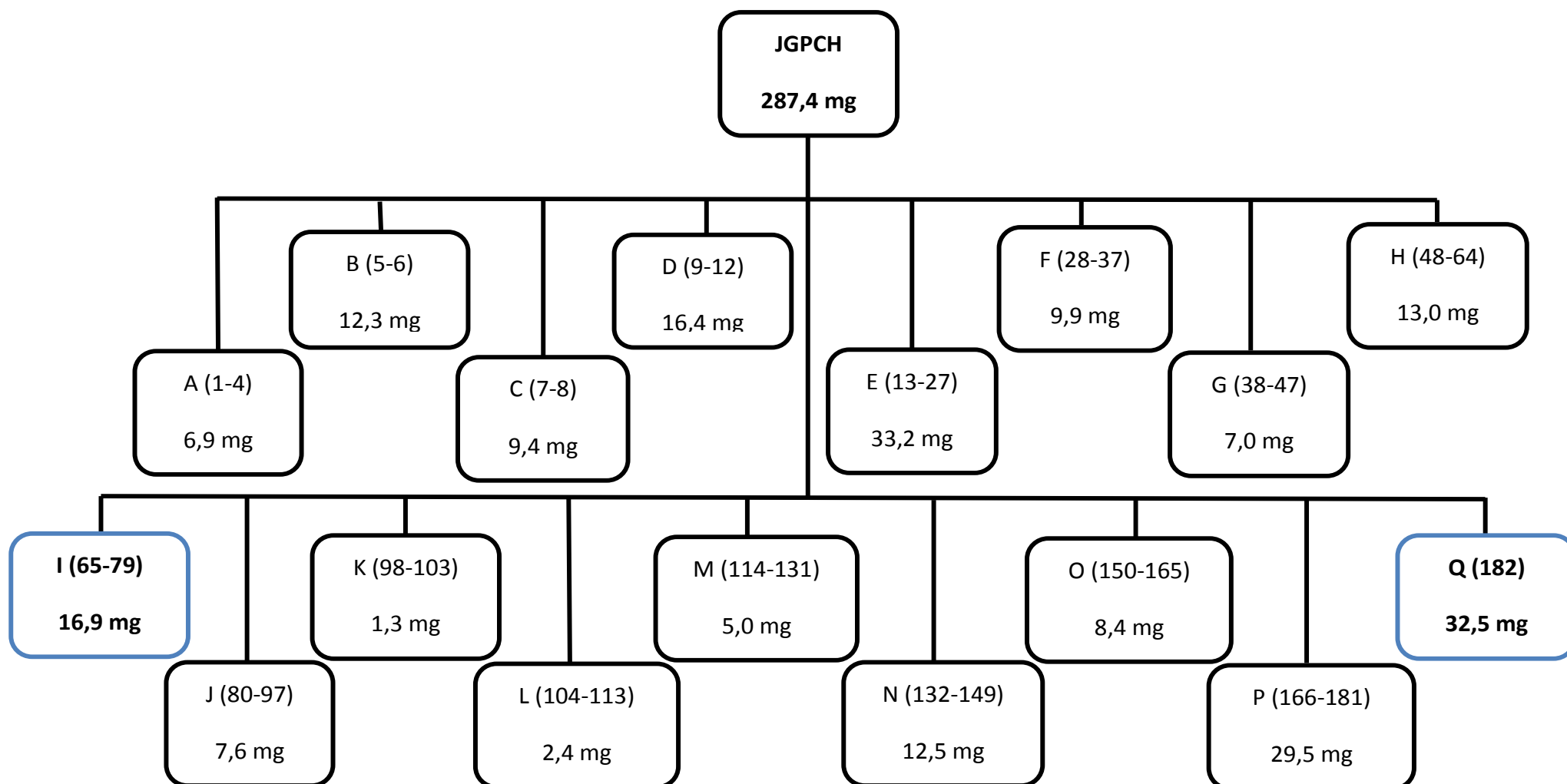
Luego de obtener los diferentes extractos, se procedió a la separación y purificación de los compuestos mediante técnicas cromatográficas y se realizó la caracterización de los compuestos por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

II.4 Extracto de Hexano

A partir del extracto de hexano de las 3 especies: *P. capitatus* (JGPCH), *P. lamourouxii* (JGPLH) y *P. pyriformis* (JGPPH), se realizó el estudio comparativo en cromatografía de capa fina (CCF) en fase normal utilizando variadas mezclas de solventes: hexano, acetato de etilo y metanol. Procediendo así a realizar cromatografía de columna en sílica-gel.

II.4.1 Extracto Hexano (JGPCH)

Se empacó una columna con hexano, alrededor de 17,40 g de sílica-gel y se pesaron 0,29 g de extracto. La columna fue eluída utilizando una mezcla de solventes de hexano, acetato de etilo y metanol con un aumento en el gradiente de polaridad. Se recogieron 182 fracciones y se unieron de acuerdo a los factores de retención, el color de las machas reveladas con p-anisaldehído y la utilización de la lámpara de UV en cromatografía de capa fina. Se utilizaron 10 mezclas de elución con variados volúmenes. En la tabla 8, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográficas para el extracto de hexano.



Esquema 2. Fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPCH.

Tabla 8. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto de hexano (JGPCH).

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
9:1 Hx-AcOEt	300	1-20
8:2 Hx-AcOEt	350	21-42
7:3 Hx-AcOEt	400	43-67
6:4 Hx-AcOEt	300	68-84
1:1 Hx-AcOEt	300	85-102
6:4 AcOEt-Hx	300	103-121
7:3 AcOEt-Hx	200	122-133
9:1 AcOEt-Hx	250	134-149
100% AcOEt	200	150-162
9:1 AcOEt-MeOH	300	163-182

En el esquema 2, se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina y la cantidad obtenida. Se obtuvieron 2 compuestos, resultando de interés las fracciones **I** y **Q**. La fracción **I** es un sólido blanco que revela color marrón con p-anisaldehído mientras la fracción **Q**, es igualmente un sólido blanco que revela color blanco con p-anisaldehído y timol.

Las fracciones restantes se estudiaron analíticamente por CCF, observando mezclas complejas, difíciles de resolver con diversos sistemas de elución. Aunado a esto, la poca masa presente en la fracción y la presencia de manchas rojas al ser reveladas con lámpara de UV, es indicativo de las distintas clorofilas presentes en estas fracciones. Por lo tanto, no se consideró el estudio de las mismas.

Obteniendo así el compuesto **I** con una masa de 16,90 mg soluble en CHCl_3 , proveniente de la fracción **I** con un rendimiento (0,50% para el extracto de hexano y 0,03% para el material inicial seco) y el compuesto **II** con una masa de 11,60 mg soluble en DMSO proveniente de la fracción **Q** con un rendimiento (0,40% para el extracto de hexano y 0,02% para el material inicial seco).

II.4.2 Extracto Hexano (JGPLH)

Se empacó una columna con hexano, alrededor de 40 g de sílica-gel y se pesaron 0,49 g de extracto. La columna fue eluída utilizando una mezcla de solventes de hexano, acetato de etilo y metanol con un aumento en el gradiente de polaridad.

Se colectaron 188 fracciones y se unieron de acuerdo a los factores de retención, el color de las machas reveladas con p-anisaldehído y la utilización de la lámpara de UV en cromatografía de capa fina. Se utilizaron 10 mezclas de elución con variados volúmenes. En la tabla 9, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográficas para el extracto de hexano.

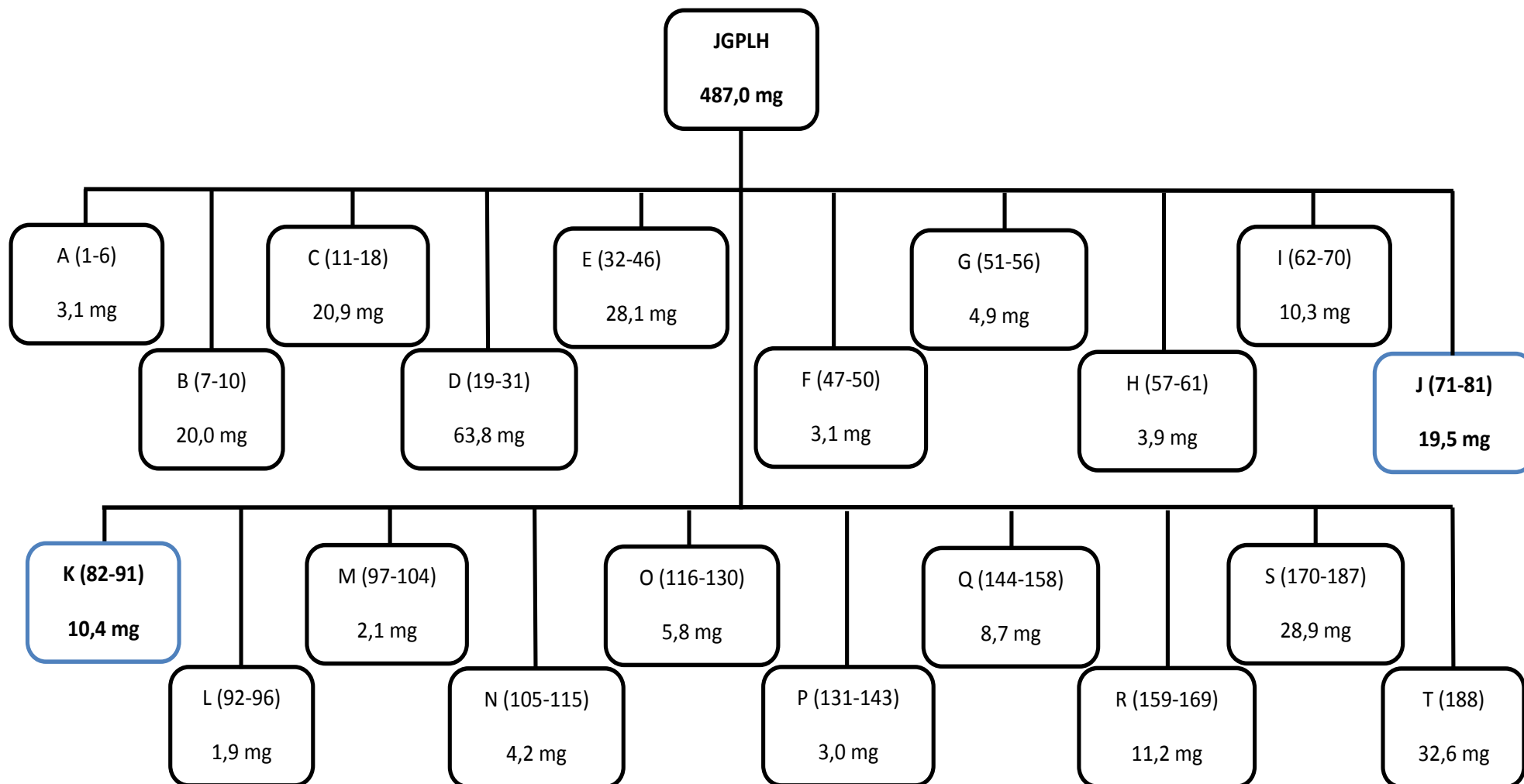
Tabla 9. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto de hexano (JGPLH)

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
9:1 Hx-AcOEt	200	1-13
8:2 Hx-AcOEt	350	14-34
7:3 Hx-AcOEt	400	35-57
6:4 Hx-AcOEt	300	58-75
1:1 Hx-AcOEt	500	76-105

6:4 AcOEt-Hx	400	106-129
7:3 AcOEt-Hx	200	130-141
9:1 AcOEt-Hx	200	142-154
100 % AcOEt	200	155-173
9:1 AcOEt-MeOH	400	174-188

En el esquema 3, se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina y la cantidad obtenida. Se obtuvieron 2 compuestos, resultando de interés las fracciones **J** y **K**. Estos compuestos son sólidos blancos, que revelan de color azul, al reaccionar con p-anisaldehído y una coloración blanca al observarse bajo lámpara de UV. Las fracciones **J** y **K** poseían un factor de retención cercano. Obteniendo así el compuesto **III** con una masa de 19,50 mg soluble en CHCl_3 , proveniente de la fracción J con un rendimiento (0,40% para el extracto de hexano y 0,03% para el material inicial seco) y el compuesto **IV** con una masa de 10,40 mg soluble en CHCl_3 proveniente de la fracción K con un rendimiento (0,21% para el extracto de hexano y 0,02% para el material inicial seco).

El resto de las fracciones colectadas no fueron estudiadas, debido a la insuficiente masa, a las mezclas complejas observadas con distintos sistemas de elución en CCF y a la presencia de las distintas clorofilas reveladas con lámpara de UV.



Esquema 3. Fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPLH.

II.4.3 Extracto Hexano (JGPPH)

Se empacó una columna con hexano, alrededor de 40 g de silica-gel y se pesaron 0,55 g de extracto. La columna fue eluída utilizando una mezcla de solventes de hexano, acetato de etilo y metanol con un aumento en el gradiente de polaridad. Se recogieron 205 fracciones y se unieron de acuerdo a los factores de retención, el color de las machas reveladas con p-anisaldehído y la utilización de la lámpara de UV en cromatografía de capa fina. Se utilizaron 10 mezclas de elución con variados volúmenes. En la tabla 10, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográfica para el extracto de hexano.

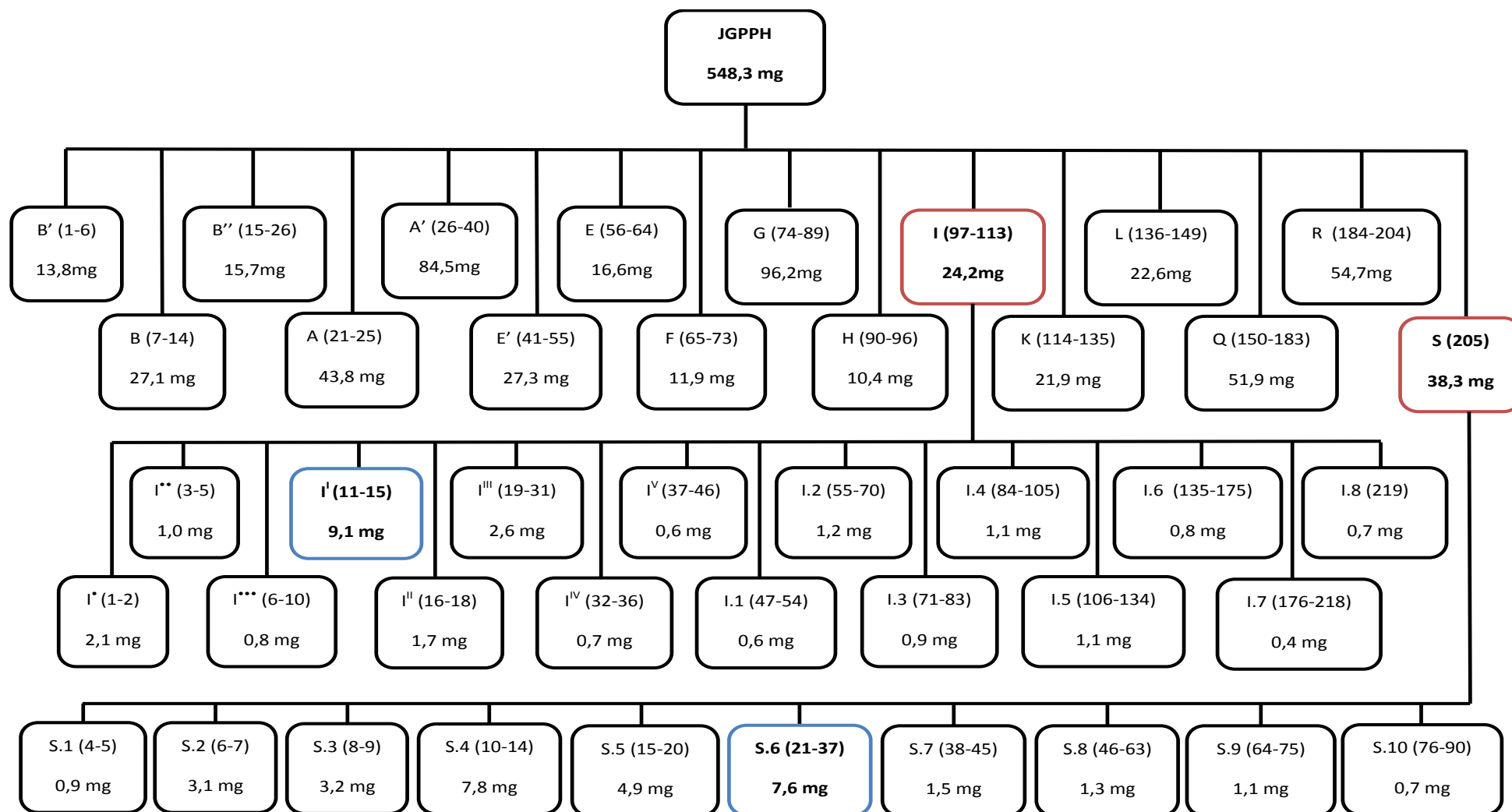
Tabla 10. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto de hexano (JGPPH)

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
9:1 Hx-AcOEt	200	1-17
8:2 Hx-AcOEt	350	18-45
7:3 Hx-AcOEt	400	46-73
6:4 Hx-AcOEt	300	74-90
1:1 Hx-AcOEt	400	91-113
6:4 AcOEt-Hx	400	114-135
7:3 AcOEt-Hx	200	136-150
9:1 AcOEt-Hx	200	151-163
100 % AcOEt	200	164-175
9:1 AcOEt-MeOH	300	176-205

En el esquema 4, se observan las fracciones y sub-fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina, y la cantidad obtenida para el extracto JGPPH.

Resultando de interés las fracciones **I y S**; debido a las pocas manchas observadas en CCF que se lograron resolver con mezclas de elución sencillas, donde se percibió la formación de una mancha azul intensa, que se asumió como producto mayoritario, al reaccionar con p-anisaldehído, para ambas fracciones.

Las fracciones no estudiadas presentan poca masa, además de revelar rojo bajo lámpara UV, indicativo de los diferentes tipos de clorofilas presentes en estas fracciones, lo que dificultó su evaluación.



Esquema 4. Fracciones y sub-fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPPH.

II.4.1.1 Purificación de la fracción I.

La fracción I fue soluble en hexano, CH_2Cl_2 y CHCl_3 . Se purificó ésta, disolviendo en hexano y utilizando cromatografía de fase normal sílica-gel. El empacado se sembró con una masa 35,80 mg de la fracción I como un tapón de sílica-gel. La cantidad de sílica utilizada en la columna fue de 3,36 g. Se utilizaron gradientes de polaridad, partiendo de una relación 1:1 Hx-AcOEt con aumento de polaridad hasta 100% AcOEt. Se colectaron 219 sub-fracciones. En la tabla 11, se observa la mezcla de solventes utilizadas en la purificación cromatográfica de la fracción I y las masas de las sub-fracciones obtenidas.

Tabla 11. Mezclas de solventes utilizadas y sub-fracciones obtenidas en la purificación de la fracción I.

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Sub-fracciones obtenidas
1:1 Hx-AcOEt	100	1-51
6:4 AcOEt-Hx	100	52-102
7:3 AcOEt-Hx	100	102-161
8:2 AcOEt-Hx	100	162-218
100 % AcOEt	50	219

En el esquema 4, se observan las sub-fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina y la masa obtenida. El compuesto eluyó en la fase móvil 1:1 Hx-AcOEt. El compuesto **V** es un sólido blanco con una masa de 9,10 mg, soluble en CHCl_3 correspondiente a la sub-fracción **I'** con un rendimiento (0,16 % para el extracto de hexano y 0,01 % para el material inicial seco).

II.4.1.2 Purificación de la fracción S

La fracción S fue soluble en CH_2Cl_2 , CHCl_3 y MeOH. Se purificó la fracción S, disolviendo en MeOH y utilizando cromatografía en fase reversa. La columna se estabilizó primero con aproximadamente 10 mL de la mezcla de elución 9,75:0,25 MeOH-MeCN. Luego, se sembró la muestra y se utilizó aproximadamente 20 mL de la mezcla de elución 9,75:0,25 MeOH-MeCN. En el esquema 4, se muestra las sub-fracciones obtenidas y las masas respectivas.

Se obtuvo 1 compuesto, con aspecto de aceite de color amarillo. El compuesto **VI** con una masa de 7,60 mg soluble en CHCl_3 resultante de la sub-fracción S.6 con un rendimiento (0,14% para el extracto de hexano y 0,008% para el material inicial seco).

II.5 Extracto de CH_2Cl_2

A partir del extracto de CH_2Cl_2 de las 3 especies: *P. capitatus* (JGPCD), *P. lamourouxii* (JGPLD) y *P. pyriformis* (JGPPD), se realizó el estudio comparativo en cromatografía de capa fina (CCF) en fase normal utilizando variadas mezclas de solventes: hexano, diclorometano acetato de etilo y metanol. Procediendo así a realizar cromatografía de columna en sílica-gel.

II.5.1 Extracto CH_2Cl_2 (JGPCD)

La columna fue empacada con CH_2Cl_2 , se utilizaron alrededor de 18,70 g de sílica-gel y se pesaron 0,16 g de extracto. La columna fue eluída utilizando una mezcla de solventes: CH_2Cl_2 , AcOEt y MeOH, con un aumento en el gradiente de polaridad. Se colectaron 192 fracciones y se juntaron de acuerdo a los factores de retención, el color de las manchas reveladas con p-anisaldehído y la utilización de la lámpara de UV en

cromatografía de capa fina. Se utilizaron 16 mezclas de elución con variados volúmenes. En la tabla 12, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográficas para el extracto de CH_2Cl_2 .

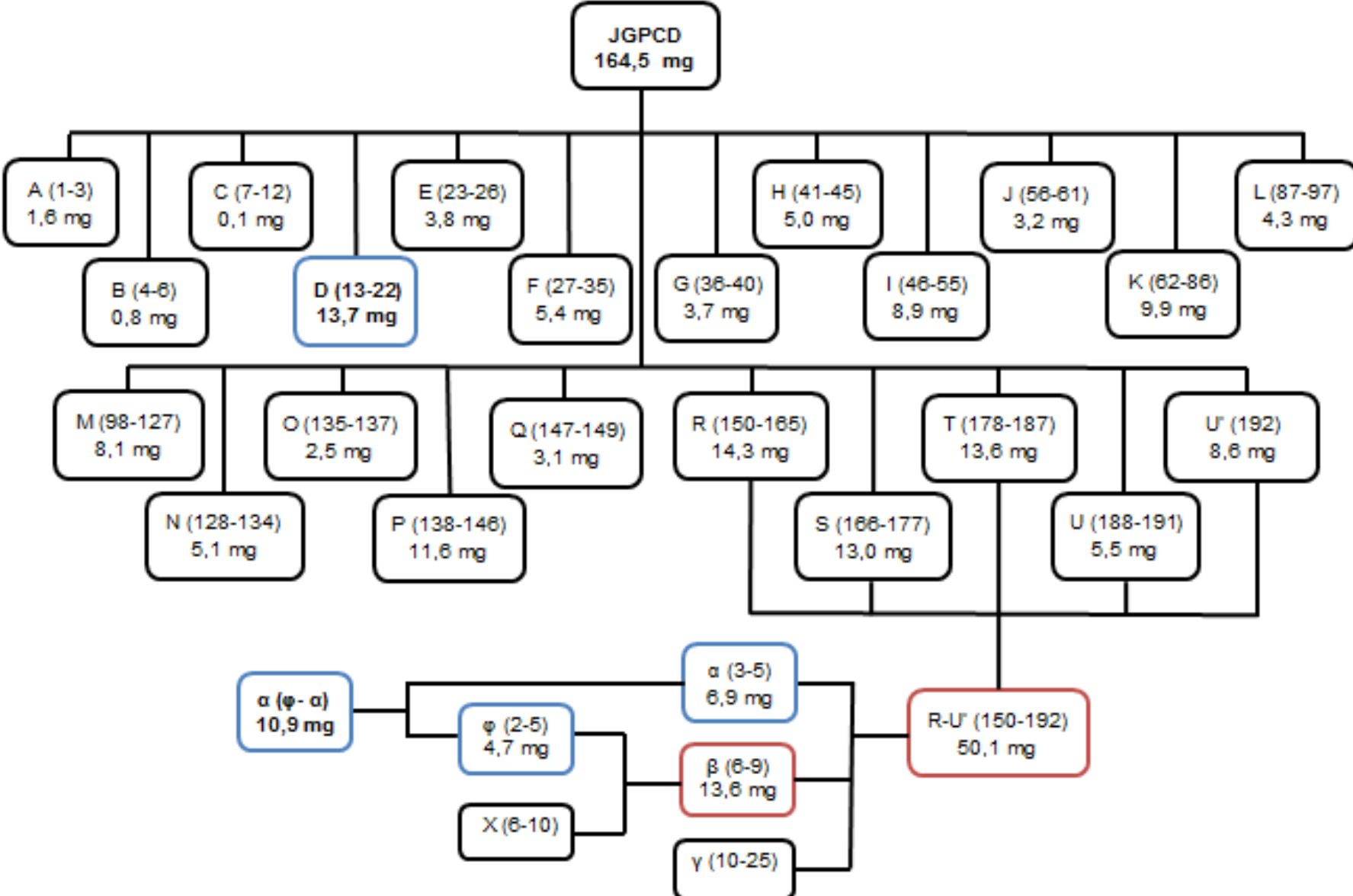
Tabla 12. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto de CH_2Cl_2 (JGPCD)

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
100 % CH_2Cl_2	200	1-13
9:1 CH_2Cl_2 -AcOEt	100	14-19
8:2 CH_2Cl_2 -AcOEt	100	20-26
7:3 CH_2Cl_2 -AcOEt	100	27-32
6:4 CH_2Cl_2 -AcOEt	100	33-38
1:1 CH_2Cl_2 -AcOEt	100	39-45
6:4 AcOEt- CH_2Cl_2	100	46-51
7:3 AcOEt- CH_2Cl_2	100	52-57
8:2 AcOEt- CH_2Cl_2	100	58-63
9:1 AcOEt- CH_2Cl_2	100	64-69
100 % AcOEt	100	70-75
9:1 AcOEt-MeOH	200	76-118
8:2 AcOEt- MeOH	100	119-147
7:3 AcOEt- MeOH	100	148-166
1:1 AcOEt- MeOH	100	167-177
100 % MeOH	100	178-191

En el esquema 5, se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina y la cantidad obtenida. Resultando de interés la fracción D, por ser un sólido blanco, que revela de color blanco con p-anisaldehído y las fracciones R, S, T, U y U' debido a la presencia de una mancha intensa, la cual se consideró mayoritaria revelando de color verde al utilizar p-anisaldehído y fluorescencia de color verde y blanco al utilizar lámpara de UV con igual factor de retención para estas fracciones. Las fracciones restantes poseen poca masa y se estudiaron por CCF mostraron mezclas complejas, con variados sistemas de elución, no permitió su estudio.

II.5.1.1 Purificación de las fracciones R, S, T, U y U'

Las fracciones R, S, T, U y U' se unieron, siendo estas soluble en CHCl_3 . Se purificó esta fracción disolviendo en la mínima cantidad de CHCl_3 y utilizando cromatografía de fase reversa. La columna se estabilizó primero con 50 mL de la mezcla de elución 95:5 MeOH- H_2O . Se sembraron aproximadamente 44,90 mg y se utilizaron aproximadamente 12 mL de la mezcla de elución ya mencionada, recogiendo así 25 fracciones. En el esquema 5, se muestra las sub-fracciones obtenidas y las masas respectivas.



Esquema 5. Fracciones y sub-fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPCD.

En la sub-fracción α , se aisló el compuesto de interés, que también se encontraba en la fracción β . Así, que se tomó la fracción β y se aplicó el mismo sistema de purificación arriba mencionado. Se sembró aproximadamente 13,60 mg de β , que resultó soluble en MeOH. Se eluyeron 10 mL de mezcla 95:5 MeOH-H₂O, recogiendo así 10 fracciones. Se logró aislar el compuesto de interés en la fracción ϕ , que fue unida a la fracción α .

Se obtuvo 2 compuestos, con aspecto de aceite de color amarillo. El compuesto **VII** con una masa de 10,90 mg soluble en MeOH resultante de la sub-fracciones α y ϕ con un rendimiento (6,60 % para el extracto de CH₂Cl₂ y 0,02 % para el material inicial seco) y el compuesto **VIII** con una masa de 13,70 mg soluble en CHCl₃ resultante de la fracción D con un rendimiento (8,30 % para el extracto de CH₂Cl₂ y 0,02 % para el material inicial seco).

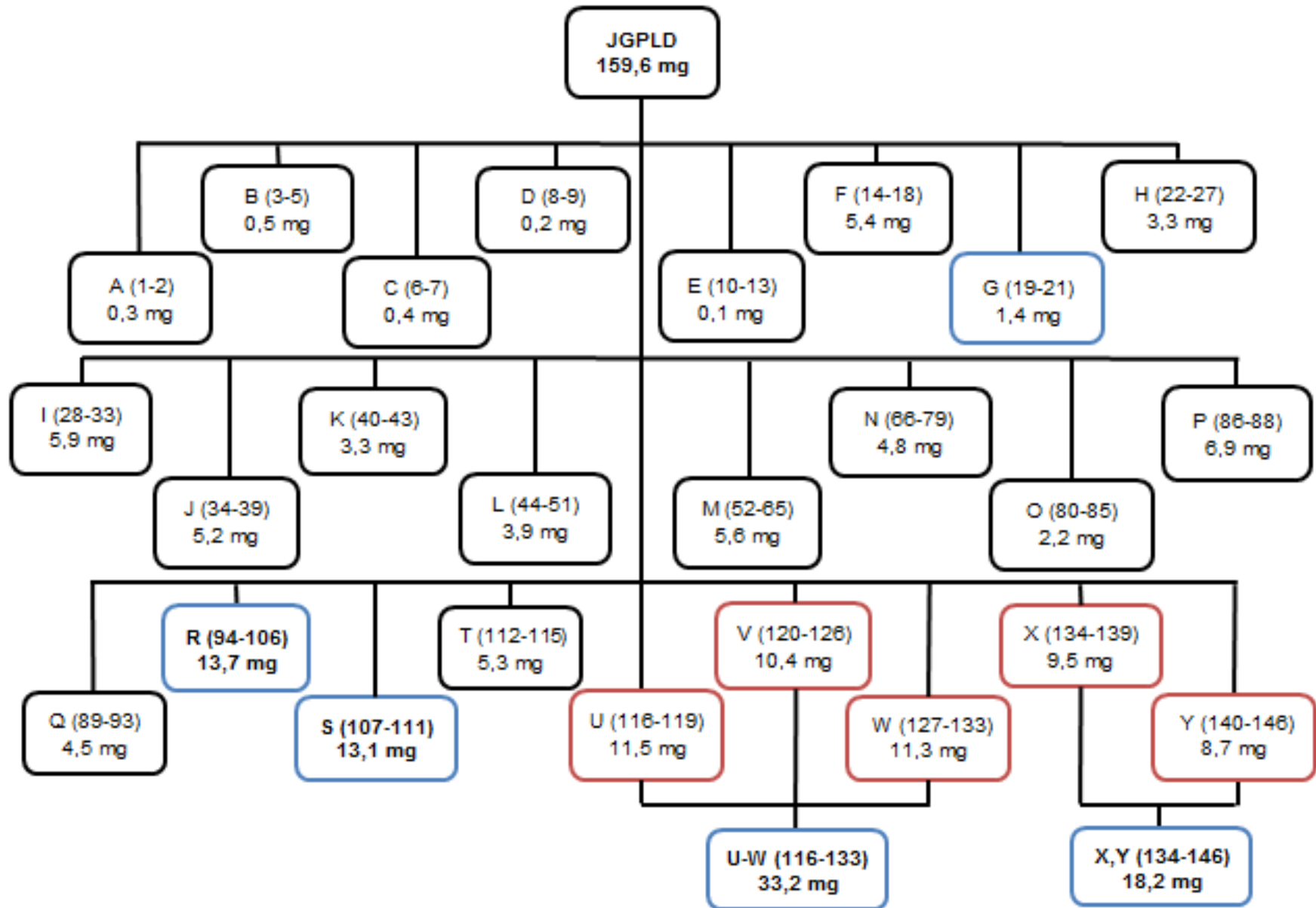
II.5.2 Extracto CH₂Cl₂ (JGPLD)

La columna fue empacada con CH₂Cl₂ y se utilizaron alrededor de 18,00 g de sílica-gel y se pesaron 0,16 g de extracto. La columna fue eluída utilizando una mezcla de solventes de CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH con un aumento en el gradiente de polaridad. Se recogieron 146 fracciones y se juntaron de acuerdo a los factores de retención, el color de las manchas reveladas con p-anisaldehído y la utilización de la lámpara de UV en cromatografía de capa fina. Se utilizaron 16 mezclas de elución con variados volúmenes. En la tabla 13, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográficas para el extracto de CH₂Cl₂.

En el esquema 6, se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina, y la cantidad obtenida. Resultando de interés las fracciones D, R, S, T, U, V, W, X y Y.

Tabla 13. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto de CH₂Cl₂ (JGPLD)

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
100 % CH ₂ Cl ₂	200	1-12
9:1 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	100	13-18
8:2 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	100	19-25
7:3 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	100	26-31
6:4 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	100	32-37
1:1 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	100	38-43
6:4 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	100	44-51
7:3 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	100	52-59
8:2 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	100	60-66
9:1 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	100	67-75
100 % AcOEt	100	76-83
9:1 AcOEt-MeOH	200	84-101
8:2 AcOEt- MeOH	100	102-111
7:3 AcOEt- MeOH	100	112-123
1:1 AcOEt- MeOH	100	124-135
100 % MeOH	100	136-146



Esquema 6. Fracciones y sub-fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPLD

La fracción D, es un sólido blanco, que revela de color blanco con p-anisaldehído. En la fracción R se apreció una mancha azul intensa al revelar con p-anilsaldehído. La fracción S es un sólido blanco que revela una macha de color verde-azul con p-anisaldehído. Las fracciones X e Y se unieron debido a la presencia de manchas verdes con igual factor de retención. Estas 3 fracciones ya mencionadas, revelaron una macha poco intensa de color rojo bajo lámpara de UV, perteneciente a clorofila. A estas fracciones, se le realizaron extracciones con hexano, lo cual permitió su purificación. De igual forma se unieron las fracciones U, V y W debido a la formación de manchas verdes al revelar con p-anisaldehído con igual factor de retención. La cual se purificó, solubilizando las fracciones unidas en MeOH y separando de estas un residuo blanco amorfo insoluble en este solvente. Las fracciones restantes se estudiaron analíticamente por CCF, observando mezclas complejas, difíciles de resolver con diversos sistemas de elución y sumado a esto, la poca masa presente en la fracción, no permitió su estudio.

Se obtuvieron 5 compuestos: El compuesto **VIII** con una masa 1,40 mg soluble en CHCl_3 resultante de la fracción G con un rendimiento (1,00 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,002 % para el material inicial seco). El compuesto **IX** de color amarillo con una masa de 13,70 mg, soluble en CHCl_3 resultante de la fracción R, con un rendimiento (8,60 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,02 % para el material inicial seco). El compuesto **X** es un sólido blanco con una masa de 9,90 mg, soluble en CHCl_3 resultante de la fracción S, con un rendimiento (6,20 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,02 % para el material inicial seco). El compuesto **XI** de color amarillo con una masa de 28,90 mg, soluble en MeOH, resultante de la fracción U-W, con un rendimiento (18,10 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,03 % para el material inicial seco). El compuesto **XII** de color naranja oscuro con una masa de 11,60 mg, soluble en DMSO resultante de la fracción X, Y, con un rendimiento (7,30 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,02 % para el material inicial seco).

II.5.3 Extracto CH₂Cl₂ (JGPPD)

Se empacó una columna con CH₂Cl₂, se utilizaron alrededor de 15,90 g de sílica-gel y se pesaron 0,32 g de extracto. La columna fue eluída utilizando solventes: CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH con un aumento en el gradiente de polaridad. Se colectaron 183 fracciones y se unieron de acuerdo a los factores de retención, el color de las manchas reveladas con p-anisaldehído y la utilización de la lámpara de UV en cromatografía de capa fina. Se utilizaron 16 mezclas de elución con variados volúmenes. En la tabla 14, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográfica para el extracto de CH₂Cl₂.

Tabla 14. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto de CH₂Cl₂ (JGPPD)

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
100 % CH ₂ Cl ₂	200	1-13
9:1 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	100	14-19
8:2 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	200	20-31
7:3 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	300	32-55
6:4 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	200	56-68
1:1 CH ₂ Cl ₂ -AcOEt	200	69-80
6:4 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	100	81-86
7:3 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	200	87-98
8:2 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	200	99-109

9:1 AcOEt- CH ₂ Cl ₂	200	110-121
100 % AcOEt	100	122-127
9:1 AcOEt-MeOH	200	128-139
8:2 AcOEt- MeOH	100	140-152
7:3 AcOEt- MeOH	200	153-164
1:1 AcOEt- MeOH	150	165-174
100 % MeOH	100	175-183

En el esquema 7, se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina, y la cantidad obtenida. Resultando de interés las fracciones D, R, T y U.

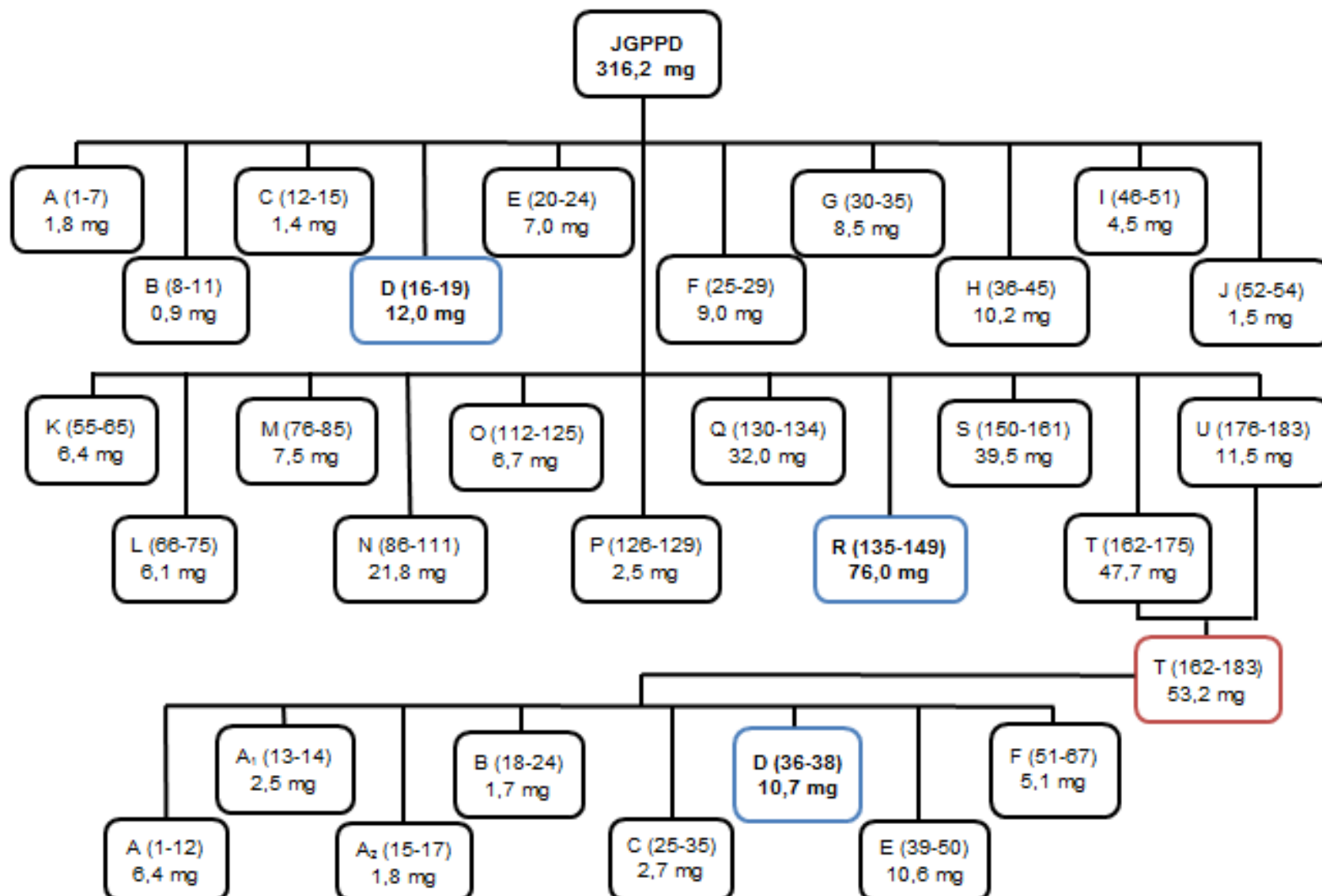
La fracción D es un sólido blanco, que reveló color blanco con p-anisaldehído y la fracción R es un sólido blanco, que reveló color verde con p-anisaldehído y una mancha tenue que reveló de color rojo bajo lámpara de UV, así que se purificó la fracción con hexano. Luego se disolvió la fracción en CH₂Cl₂ y se hizo precipitar el sólido al agregar MeOH gota a gota, para luego centrifugar este sólido y finalizar la purificación.

La fracción T y U, se unieron debido a que se observó manchas verdes y azul con igual factor de retención al revelar con p-anisaldehído. Estas manchas se lograron resolver por CCF en fase reversa con un sistema 1:1 MeOH-H₂O. Por lo tanto, se procedió a realizar purificación por cromatografía en fase reversa.

Se sembró aproximadamente 53,20 mg de las fracciones T y U, en la mínima cantidad de solución 1:1 MeOH-H₂O. Se utilizaron 2 mezclas de elución: la primera 10 mL de una solución 1:1 MeOH-H₂O, donde se recogieron las fracciones (1-29) y la segunda 55 mL de una solución 100 % MeOH, donde se recogieron las fracciones (30-67). Siendo de interés la fracción D por solo observar una mancha verde al revelar con

p-anisaldehído. En las fracciones restantes, se observó más de una mancha que no se pudo resolver con variados sistemas de solventes.

Se obtuvieron 3 compuestos. El compuesto **VIII** con una masa de 12,00 mg soluble en CHCl_3 resultante de la fracción D con un rendimiento (3,80 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,01 % para el material inicial seco) El compuesto El compuesto **XIII** un sólido blanco con una masa de 9,10 mg soluble en H_2O resultante de la fracción R con un rendimiento (2,90 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,01 % para el material inicial seco). El compuesto **XIV** de color amarillo con una masa de 10,70 mg soluble en CHCl_3 , resultante de la sub-fracción D de la columna de purificación de las fracciones T y U, con un rendimiento (3,40 % para el extracto de CH_2Cl_2 y 0,01 % para el material inicial seco).



Esquema 7. Fracciones y sub-fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPPD

II.6 Extracto de AcOEt

A partir del extracto de AcOEt de las 3 especies: *P. capitatus* (JGPCAc), *P. lamourouxii* (JGPLAc) y *P. pyriformis* (JGPPAc), se realizó el estudio comparativo en cromatografía de capa fina (CCF) en fase normal utilizando variadas mezclas de solventes: hexano, diclorometano acetato de etilo y metanol. Se evidenció mezclas complejas difíciles de resolver con diferentes sistemas de elución en CCF, por lo tanto, sumado a la poca masa de los extractos, no se consideró conveniente el estudio por cromatografía de columna.

II.7 Extracto Hidro-metanólico

A partir del extracto hidro-metanólico de las 3 especies: *P. capitatus* (JGPCM), *P. lamourouxii* (JGPLM) y *P. pyriformis* (JGPPM), se realizó el estudio comparativo en cromatografía de capa fina (CCF) en fase reversa utilizando variadas mezclas de solventes polares: acetonitrilo, metanol y agua. Procediendo así a realizar cromatografía de columna fase reversa para la especie *P. pyriformis* (JGPPM).

Los extractos hidro-metanólicos secos de las 3 especies, fueron disueltos en metanol, donde se observó la formación de un precipitado el cual fue posteriormente separado mediante centrifugación. En la tabla 16, se observa las masas obtenidas y los rendimientos respectivos. Éste es un sólido laminar color blanco y beige, soluble en solventes polares: agua, metanol y dimetilsulfoxido. El estudio mediante cromatografía de capa fina en fase reversa reveló la presencia de manchas color rojo-amarillo y violeta utilizando ninhidrina como agente revelador, y manchas color verde y blanco utilizando p-anisaldehído, igualmente se observó fluorescencia al utilizar lámpara de UV.

Tabla 16. Masas y rendimientos del extracto hidro-metanólico para las especies: *P. capitatus* (JGPCM), *P. lamourouxii* (JGPLM) y *P. pyriformis* (JGPPM),

Identificación	JGPCM	JGPLM	JGPPM
Extracto Hidro-metanólico (g)	0,68	0,86	1,29
Sólido precipitado (g)	0,22	0,59	1,00
Rendimiento del Extracto Hidro-metanólico (%)	32,04	69,00	76,75
Rendimiento del Material seco inicial (%)	0,40	1,01	1,00

II.7.1 Extracto Hidro-metanólico (JGPCM)

Se obtuvo 1 compuesto, el compuesto **XV** como mayoritario con 0,22 g con un rendimiento (32,04 % para el extracto hidro-metanólico y 0,40 % para el material inicial seco). Soluble en H₂O, MeOH y DMSO.

II.7.2 Extracto Hidro-metanólico (JGPLM)

Se obtuvo 1 compuesto, el compuesto **XV** como mayoritario con 0,60 g con un rendimiento (69,00 % para el extracto hidro-metanólico y 1,01 % para el material inicial seco). Soluble en H₂O, MeOH y DMSO.

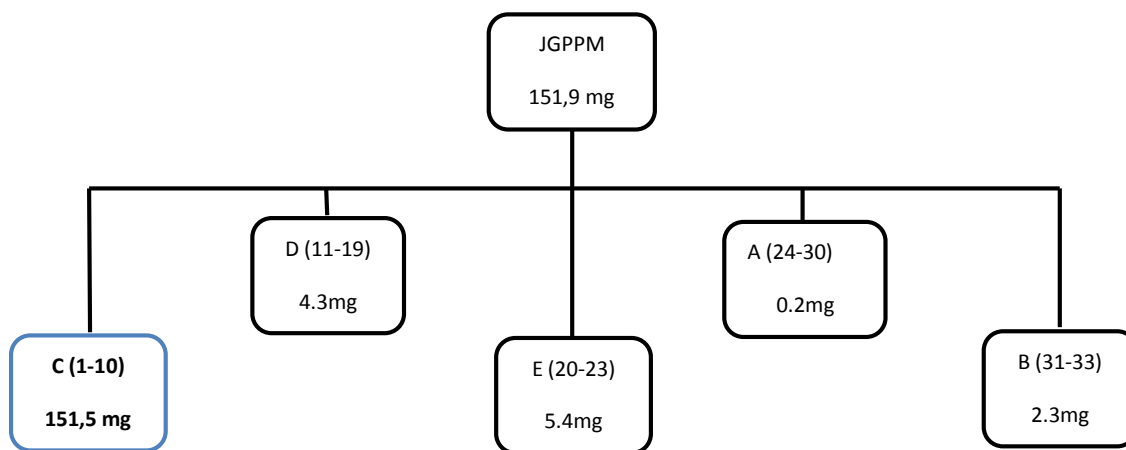
II.7.3 Extracto Hidro-metanólico (JGPPM)

El sólido obtenido fue purificado utilizando cromatografía de fase reversa. Se tomaron 0,15 g del sólido, se sembró y eluyó con distintas relaciones de H₂O:MeOH. En la tabla 17, se observa las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográfica para el extracto hidro-metanólico.

Tabla 17. Mezcla de solventes utilizadas en la separación cromatográfica del extracto hidro-metanólico (JGPPM)

Mezcla de solventes	Volumen (mL)	Fracciones Obtenidas
6:1 H ₂ O-MeOH	10	1-10
1:1 H ₂ O-MeOH	10	11-19
100% MeOH	10	20-33

En el esquema 8, se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina, y la cantidad obtenida.



Esquema 8. Fracciones unidas y las masas de cada una para el extracto JGPPM.

Se obtuvo 1 sólido de color blanco, soluble en DMSO, H₂O y MeOH. Se observó ligera fluorescencia verde bajo lámpara de UV a longitud de onda 254 nm. Como mancha mayoritaria que revela de color blanco al utilizar p-anisaldehído, como mancha minoritaria revela de color rosa claro y violeta con ninhidrina, azul con p-anisaldehído y rosa con timol. La fracción C con mayor masa (Esquema 8), estudiada bajo distintas condiciones de elución en CCF en fase normal y fase reversa, mostró la mezcla de 2 compuestos muy polares que no se logró separar. Este sólido al ser disuelto en MeOH, una parte se solubilizaba, mientras otra quedaba un sólido residual, el cual fue separado mecánicamente por centrifugación repetidas veces.

Finalmente, sólo se tomó la fracción soluble en MeOH. A modo de comparación, se realizaron análisis de IR a la parte soluble en MeOH resultante de la fracción C de la columna antes mencionada y al sólido que precipitó inicialmente del extracto hidro-metanólico que no fue tratado. Así, el compuesto **XV** como mayoritario con una masa de 1,00 g con un rendimiento (76,70 % para el extracto hidro-metanólico y 1,00 % para el material inicial seco).

Al compuesto XV, se le realizaron las siguientes pruebas de grupos funcionales:

1. Amina (Prueba anhídrido crómico): Se tomaron aproximadamente 50 mg del compuesto **XV** en un tubo de ensayo y se agregó 2 mL de NaOH al 10 %, luego se agregó 8 gotas de bencenosulfonilo. Se tapó el tubo de ensayo y se agitó durante 5 minutos asegurándose que la mezcla era fuertemente básica utilizando papel pH.
2. Amida (Hidrólisis en medio básico): Se tomó aproximadamente 50 mg del compuesto **XV** en un tubo de ensayo y se agregó 3 mL de NaOH al 10%. Se humedeció con agua papel pH y se dispuso en la boca del tubo de ensayo.

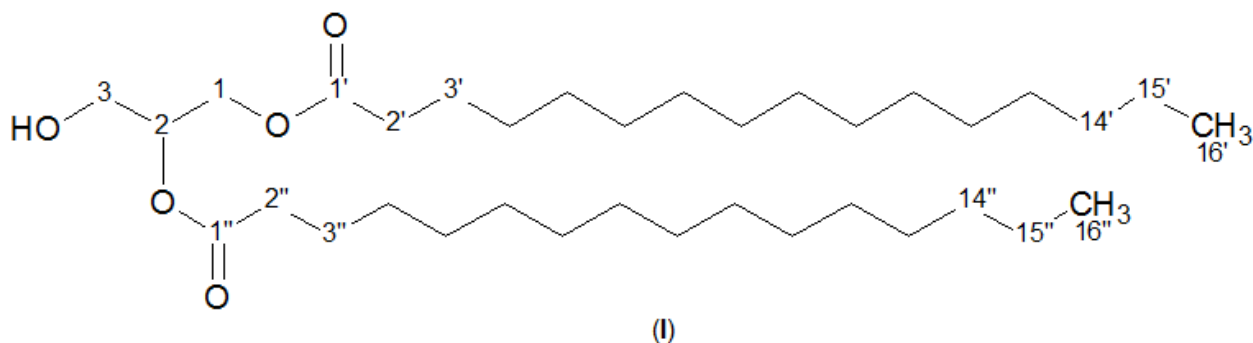
III.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los compuestos identificados y caracterizados aislados a partir de las 3 especies de algas verdes, pertenecientes al género *Penicillus* (*capitatus*, *lamourouxii* y *pyriformis*) fueron llevadas a cabo por el uso de diferentes técnicas espectrométricas: espectrometría de resonancia magnética nuclear RMN ^1H y ^{13}C , en una y 2D, DEPT, espectrofotometría de infrarrojo y espectrometría de masas. Los compuestos aislados, fueron comparados respectivamente, con los datos reportados en la literatura.

En el estudio sobre los metabolitos secundarios de los extractos obtenidos de las algas verdes: *P. capitatus*, *P. lamourouxii* y *P. pyriformis*, se tiene:

- Del extracto de Hexano, se lograron aislar e identificar seis (6) compuestos.
- Del extracto de diclorometano, se lograron aislar e identificar ocho (8) compuestos.
- Del extracto hidro-metanólico, se logró aislar e identificar un (1) compuesto.

III.1 Elucidación de compuesto I: 1,2-dipalmitil-glicerol



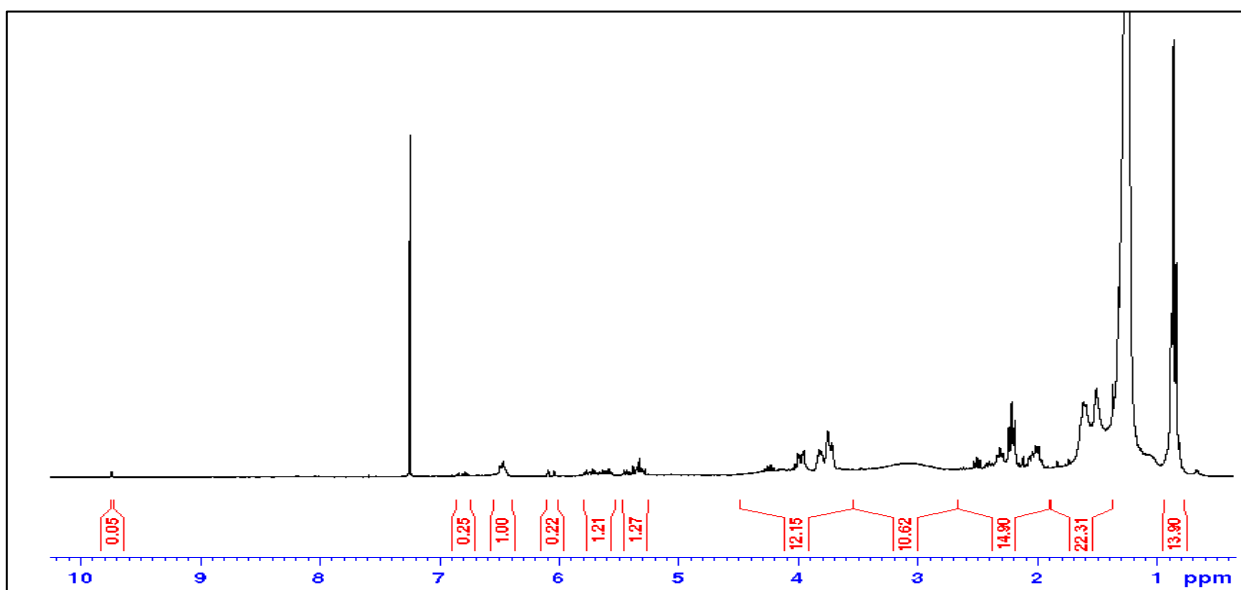
El compuesto I es el metabolito mayoritario aislado del extracto de hexano del alga *Penicillus capitatus*, es un sólido blanco con una masa de 16,90 mg, soluble en CHCl_3 , proveniente de la fracción I con un rendimiento (0,50 % para el extracto de hexano y 0,03 % para el material inicial seco).

El análisis de los espectros RMN (CDCl_3) de ^1H (Espectros 1.1-1.2) y ^{13}C junto al DEPT 135 (Espectro 1.3-1.4) se observan alrededor de 39 señales, asignadas en la tabla 18 y 19, que se compararon con lo citado en la literatura. [35], [36], [37], [38]

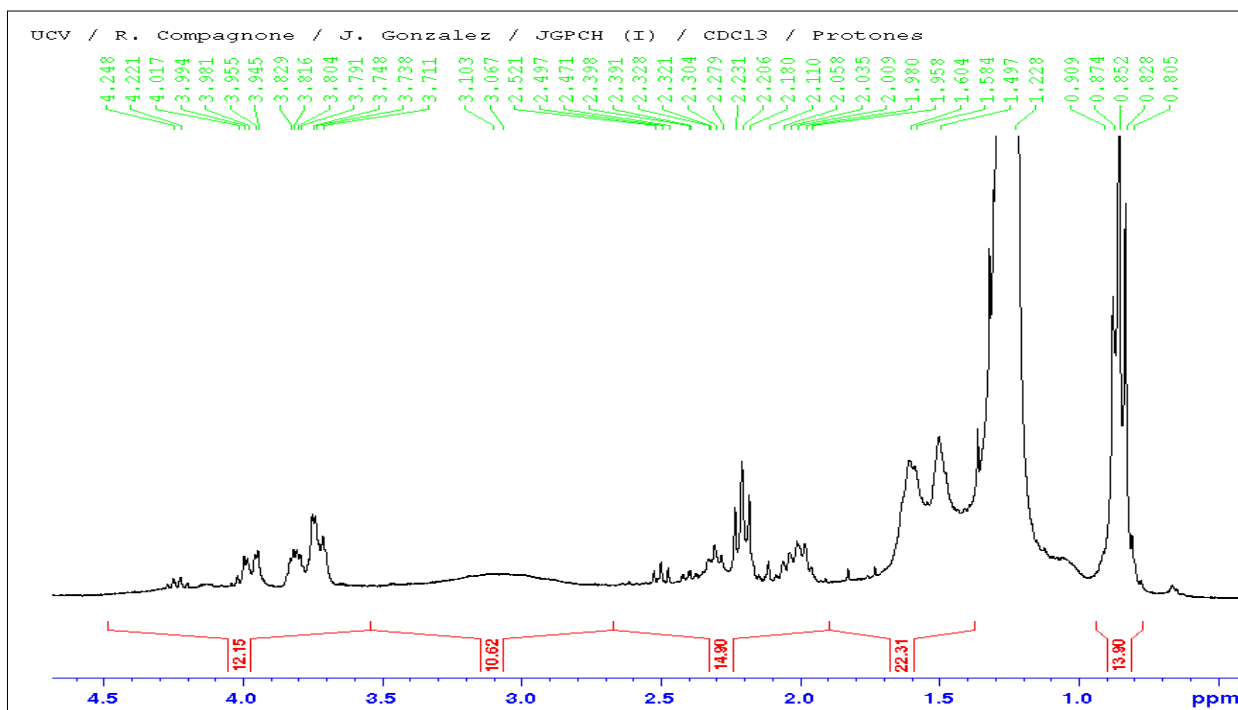
En el espectro 1.1 de ^1H , se aprecia a campo alto, un multiplete (δ_{H} 0,85, m), perteneciente a protones de metilos que se encuentran apantallados, seguido de un multiplete (δ_{H} 1,23, m), característico de protones sobre cadenas alifáticas saturadas. Además, señales (2,23, t, 7,65 y δ_{H} 1,50-1,60, m) propias de protones vecinos a carbonos del tipo carbonílico en posiciones α y β , respectivamente. Luego, en la zona media del espectro se aprecia un conjunto de señales dobletes de dobletes, correspondiente a la unidad de glicerol, (δ_{H} 3,95, $J= 3,90 \text{ Hz}$ y $J= 11,70 \text{ Hz}$) y (δ_{H} 3,74, $J= 3,00 \text{ Hz}$ y $J= 11,11 \text{ Hz}$), así, un protón del metileno H-1a o H-3a, se acopla con el protón geminal H-1b o H-3b y con el protón H-2 del carbono vecino (δ_{H} 3,82, m).

Tabla 18. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto I.

Posición H	δ_{H} [CDCl_3]	δ_{H} [CDCl_3]
	(int, mult., J en Hz) ref. ^[38]	(int, mult., J en Hz) exp.
1 a	4,23 (2H, m)	3,95 (2H, dd, 3,90; 11,7)
2	3,90 (1H, m)	3,82 (1H, m)
3 a	3,60 (1H, m)	3,74 (2H, dd, 3,00; 11,11)
3b	3,70 (1H, m)	
2'-2''	2,35 (2H, t, 6,5)	2,21 (4H, t, 7,65)
3'-3''	1,65 (2H, m)	1,58-1,60 (4H, m)
(4-15)'-(4-15)''	1,30 (24H, m)	1,23 (48H, m)
16'-16''	0,90 (3H, t, 5,0)	0,85 (6H, t, 6,9)



Espectro 1.1 de ^1H (10-0) ppm para el compuesto I



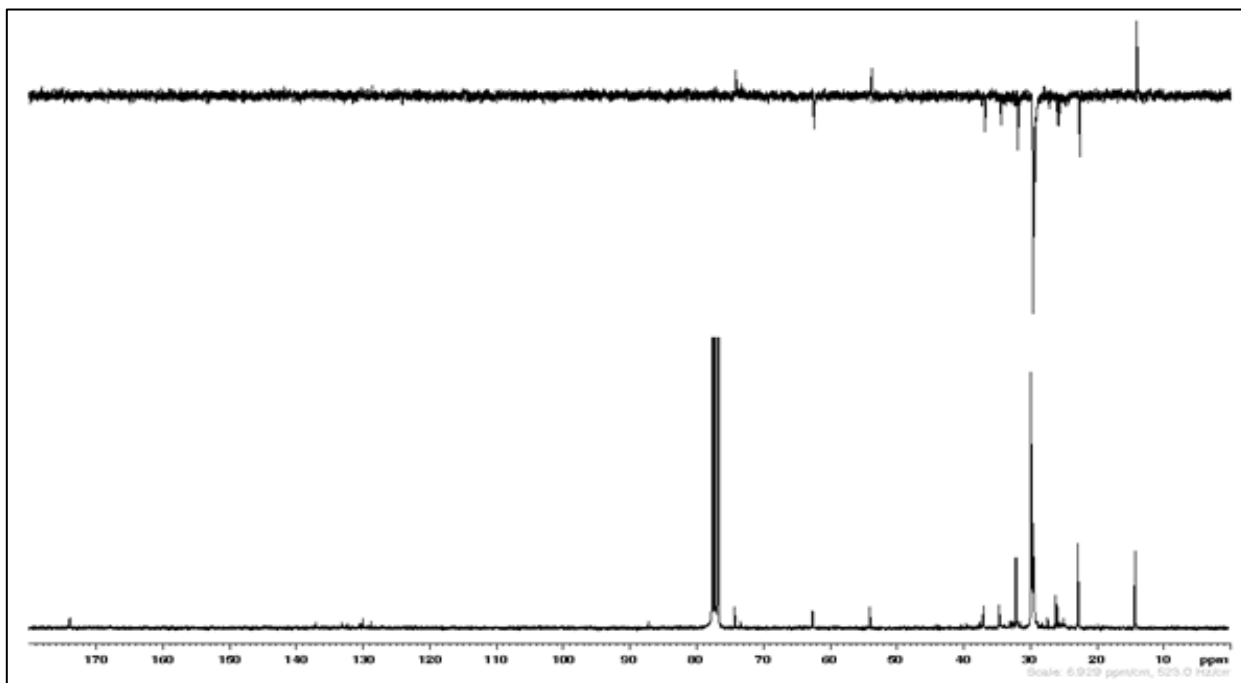
Espectro 1.2 de ^1H , (4,5-0,5) ppm para el compuesto I

En los espectros 1.3 - 1.4 de ^{13}C , se observan señales dobles, indicando la presencia de cadenas alifáticas con iguales ambientes químicos. Realizando la comparación entre los espectros ^{13}C y DEPT 135, se tienen las multiplicidades de estos carbonos, donde los desplazamientos para la mayoría de carbonos metilénicos (δ_{C} 29,3-29,7) y para los metilos terminales (δ_{C} 14,1) de las cadenas alifáticas. Además, se observan señales (δ_{C} 34,4) de metilenos despanatallados, vecinos a carbonilos del tipo carboxílicos (δ_{C} 173,8, δ_{C} 173,7), planteándose la unión de estos a una unidad de glicerol (δ_{C} 62,3, 74,1 y 62,4) para C-1, C-2 y C-3 respectivamente.

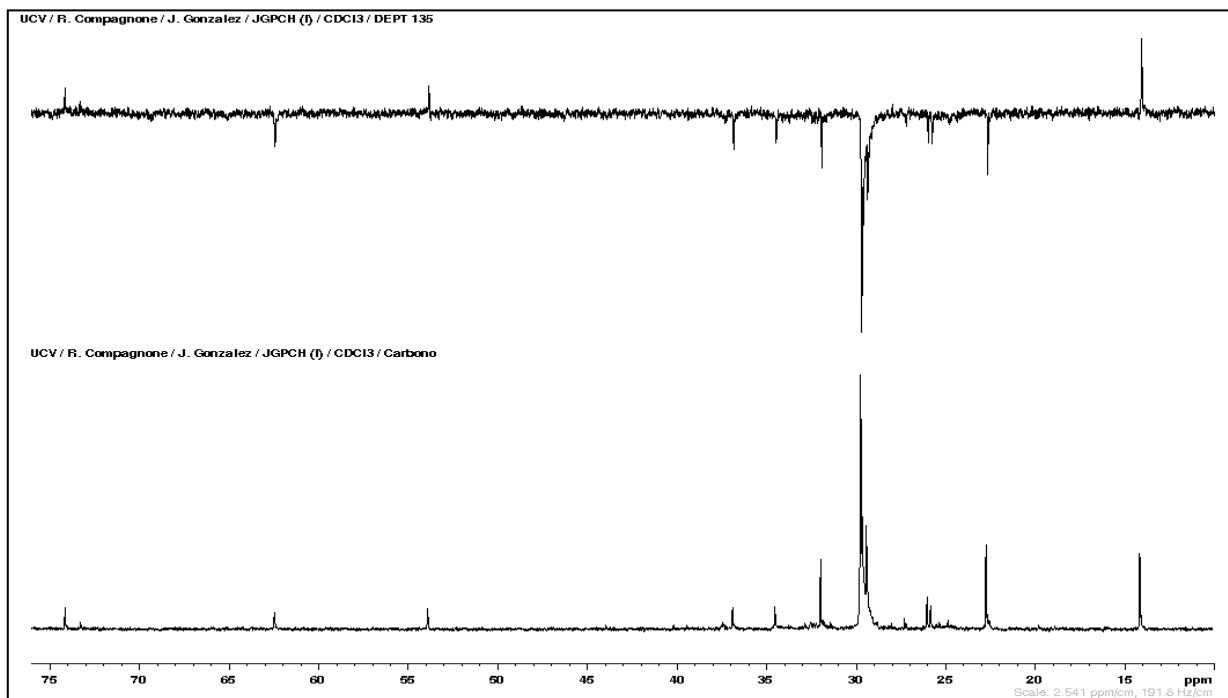
Tabla 19. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto I.

Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. [36] [38]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1	65,4 (CH_2)	62,4 (CH_2)
2	70,5 (CH)	74,1 (CH)
3	63,4 (CH_2)	62,3 (CH_2)
1'-1''	174,5 (C)	173,7 (C) 173,8 (C)
2'-2''	34,2 (CH_2)	34,8 (CH_2) 36,8 (CH_2)
3'-3''	25,0 (CH_2)	25,7 (CH_2) 25,9 (CH_2)
(4-13)'-(4-13)''	30,0 (CH_2)	28,7-29,7 (CH_2)
14'-14''	32,1 (CH_2)	31,9 (CH_2)
15'-15''	22,7 (CH_2)	22,6 (CH_2)
16'-16''	14,0 (CH_3)	14,1 (CH_3)

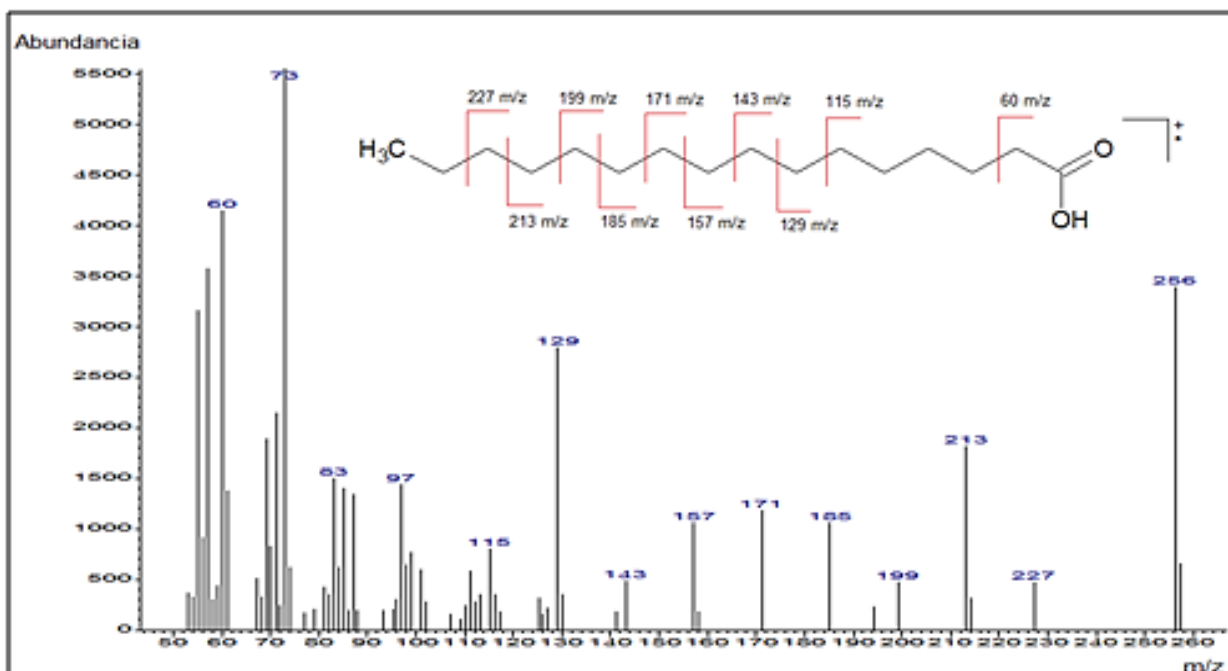
^aMultiplicidad asignada mediante DEPT 135.



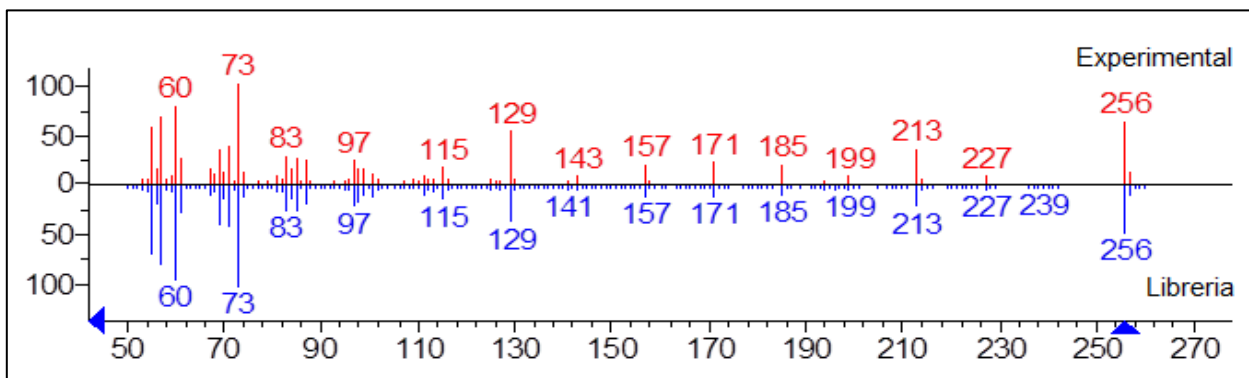
Espectro 1.3 comparación ^{13}C y DEPT 135, (0-180) ppm para la compuesto I



Espectro 1.4 comparación ^{13}C y DEPT 135, (0-75) ppm para la compuesto I



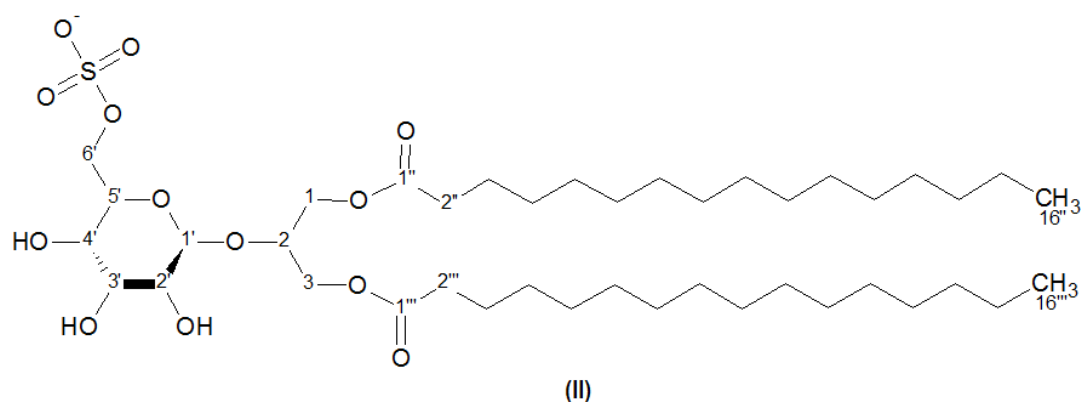
Espectro 1.5 de Masas para el compuesto I



Espectro 1.6 de Masas para el compuesto I comparado con la librería NIST

En el espectro de masas 1.5 y 1.6, mediante la técnica de impacto electrónico presentó un M^+ de 256 uma y un pico base de m/z 73 uma. La correlación realizada con la librería NIST, permitió la identificación de la cadena alifática, para un ácido graso C16:0 identificado como ácido palmítico, correspondiente a la fórmula molecular de $C_{16}H_{32}O_2$. Estos datos sumados a los espectros de 1H , ^{13}C y DEPT 135 permitió la caracterización del compuesto I como un glicolípido identificado: 1,2-dipalmitil-glicerol.

III.2 Elucidación de compuesto II: 1,3-dipalmitil-2-sulfoquinovosil-glicerol



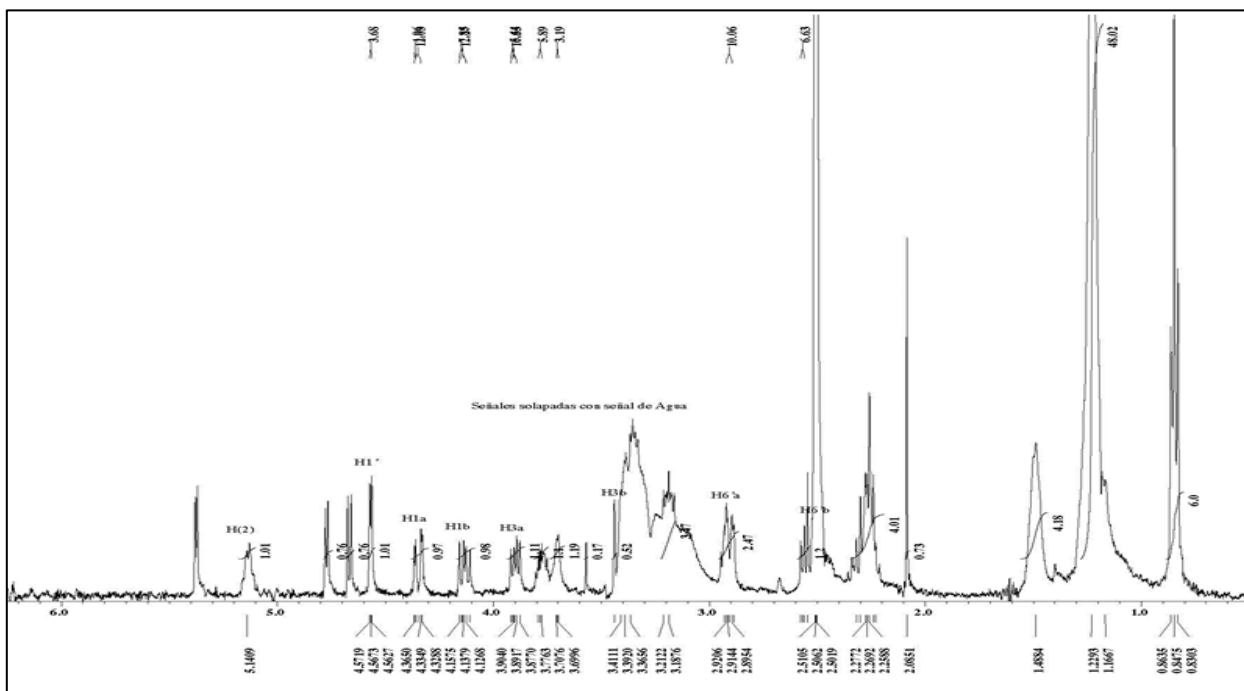
El compuesto **II** es el metabolito mayoritario aislado, con señales similares al compuesto **I**, sin embargo muestra señales características de una azúcar y se obtuvo del extracto de hexano del alga *Penicillus capitatus*. El compuesto **II** es un sólido blanco con una masa de 11,60 mg, soluble en DMSO, proveniente de la fracción Q con un rendimiento (0,40 % para el extracto de hexano y 0,02 % para el material inicial seco). En el análisis de espectros de RMN (DMSO- d_6) de ^1H (Espectro 2.1) y ^{13}C (Espectro 2.2) conjuntamente con el DEPT 135 (Espectro 2.3), permitió la asignación de 3 grupos de señales en las tablas 20 y 21, que se compararon con lo citado en la literatura.^{[39], [40]}

El primer grupo de señales fue asignado al grupo glicósido (δ_{C} 98,8, δ_{H} 4,57; δ_{C} 72,1, δ_{H} 3,19; δ_{C} 73,5, δ_{H} 3,33; δ_{C} 74,8, δ_{H} 2,92; δ_{C} 69,1, δ_{H} 3,78 y δ_{C} 55,0, δ_{H} 2,89 y 2,55) correspondientes a los cinco oximetinos, donde el primero es un carbono anomérico y finalmente un metileno desapantallado. El segundo grupo de señales pertenece a un grupo glicerol (δ_{C} 63,2, δ_{H} 4,34 y 4,13; δ_{C} 70,3, δ_{H} 5,12; δ_{C} 65,2, δ_{H} 3,91 y 3,39) y el tercer grupo de señales corresponden a los carbonos de cadenas alifáticas: para metilos terminales (δ_{C} 14,4, δ_{H} 0,84) y para los metilenos (δ_{C} 32,9, δ_{H} 2,27) unidos a dos carbonilos tipo carboxílico (δ_{C} 173,3; δ_{C} 173,2).

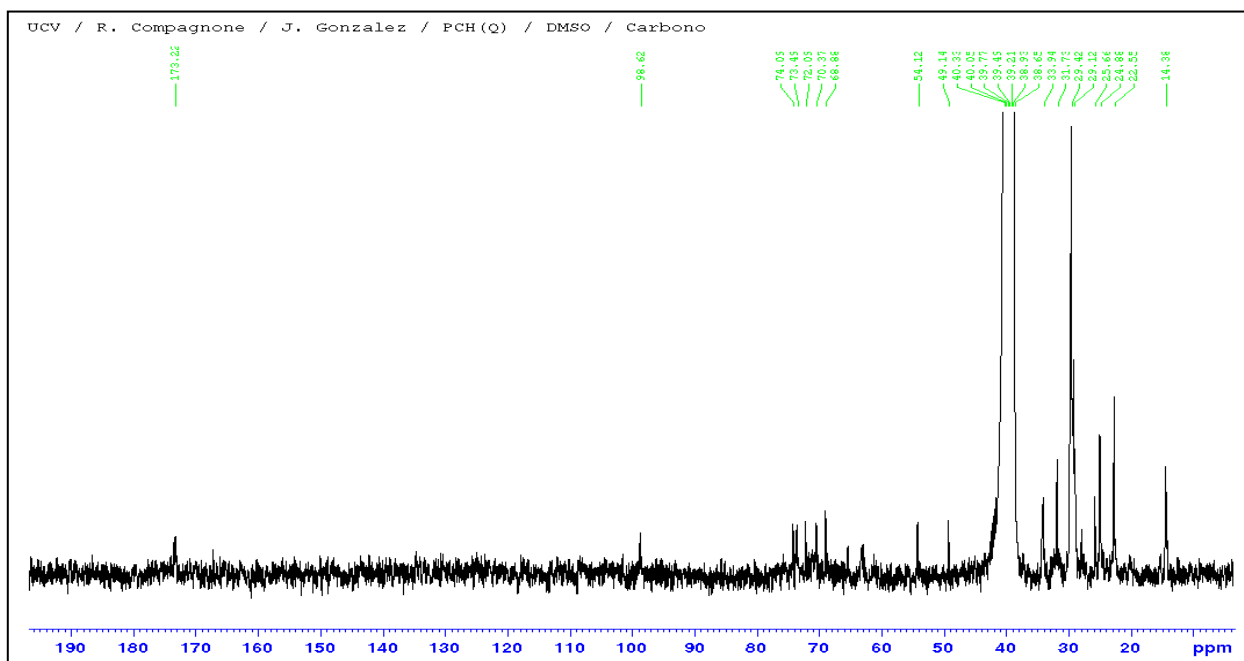
Tabla 20. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto II.

Posición H	δ_{H} (int, mult., J en Hz) ref. ^[39] ^[40]	δ_{H} [DMSO- d_6] (int, mult., J en Hz) exp.
1 ^a	4,00*	3,91 (1H, dd, 10,55; 5,64)
1b	3,52*	3,39 (1H, dd)
2	5,27*	5,12 (1H, m)
3 ^a	4,47*	4,34 (1H, dd, 12,03; 1,96)
3b	4,25*	4,13 (1H, dd, 12,27; 7,85)
1'	4,70*	4,57 (1H, d, 3,68)
2'	3,30*	3,19 (1H, m)
3'	3,49*	3,33 (1H, m)
4'	3,05*	2,92 (1H, m)
5'	3,91*	3,78 (1H, m)
6'	3,04*	2,89 (1H, m)
		2,55 (1H, m)
2''-2'''	2,29**	2,27 (4H, m)
3''-3'''	1,67**	1,48 (4H, m)
(4-15)''-(4-15)'''	1,43**	1,22 (48H, m)
16''-16'''	1,01**	0,84 (6H, t, 6,38)

*Tomado en DMSO- d_6 y D_2O . **Tomado en CDCl_3 .



Espectro 2.1 de ^1H , (0-6) ppm para el compuesto II

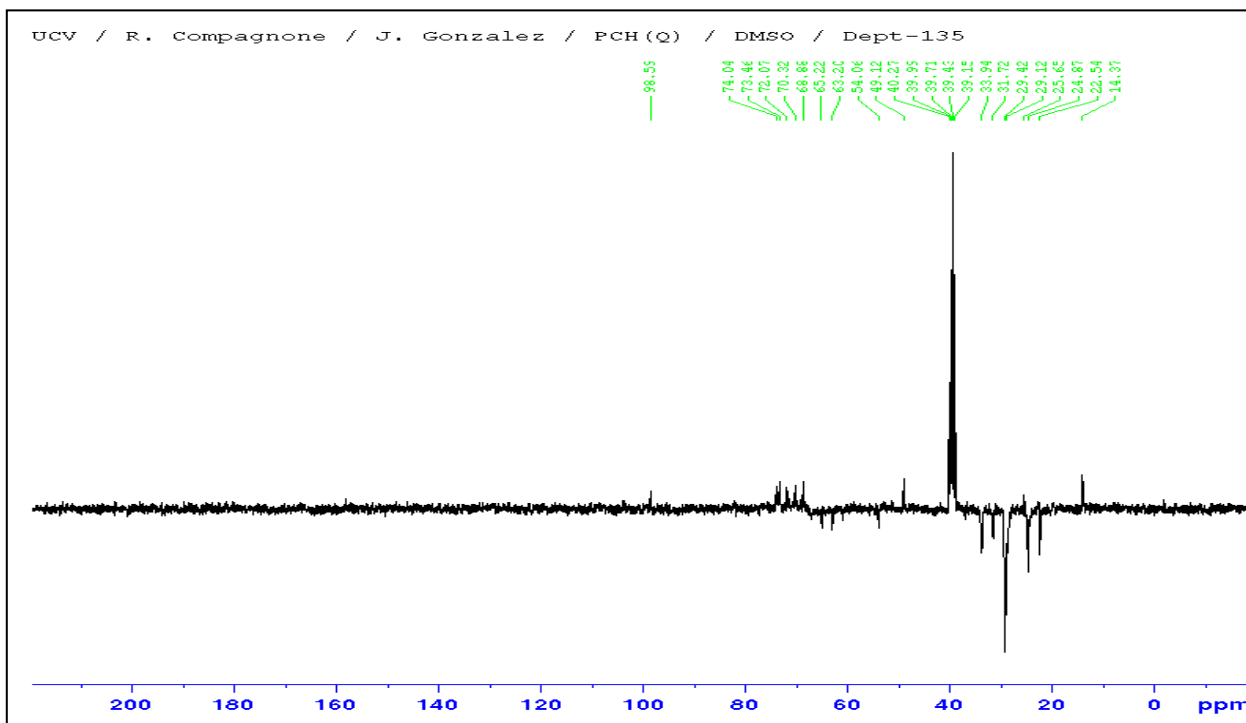


Espectro 2.2 de ^{13}C , (10-190) ppm para el compuesto II

Tabla 21. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto II.

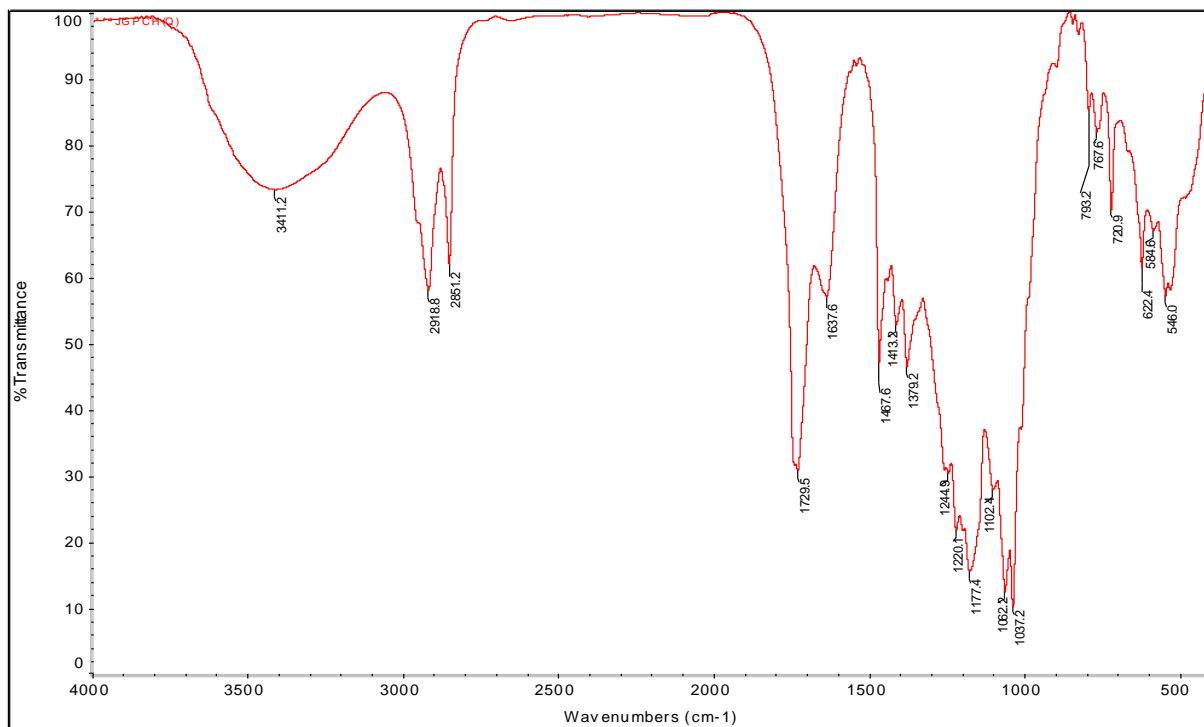
Posición C	δ_{C} (<i>mult.</i>) ref. ^[39] ^[40]	δ_{C} [DMSO- <i>d</i> ₆] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1	63,7 (CH ₂)*	63,2 (CH ₂)
2	71,0 (CH)*	70,3 (CH)
3	66,0 (CH ₂)*	65,2 (CH ₂)
1'	99,8 (CH)*	98,5 (CH)
2'	72,9 (CH)*	72,1 (CH)
3'	74,3 (CH)*	73,5 (CH)
4'	75,8 (CH)*	74,0 (CH)
5'	69,7 (CH)*	68,9 (CH)
6'	55,8 (CH ₂)*	54,1(CH ₂)
1''		173,2 (C)
1'''	174,6 (C)*	173,3 (C)
2''-2'''	40,7 (CH ₂)**	33,9 (CH ₂)
3''-3'''	29,1 (CH ₂)**	24,9 (CH ₂)
4''-13'''		
4'''-13''	32,7 (CH ₂)**	29,1-29,4 (CH ₂)
14''-14'''	34,7 (CH ₂)**	31,7 (CH ₂)
15''-15'''	25,3 (CH ₂)**	22,5 (CH ₂)
16''-16'''	16,5 (CH ₃)**	14,4 (CH ₃)

*Tomado en DMSO-*d*₆ y D₂O. **Tomado en CDCl₃. ^a Multiplicidad asignada mediante DEPT 135.

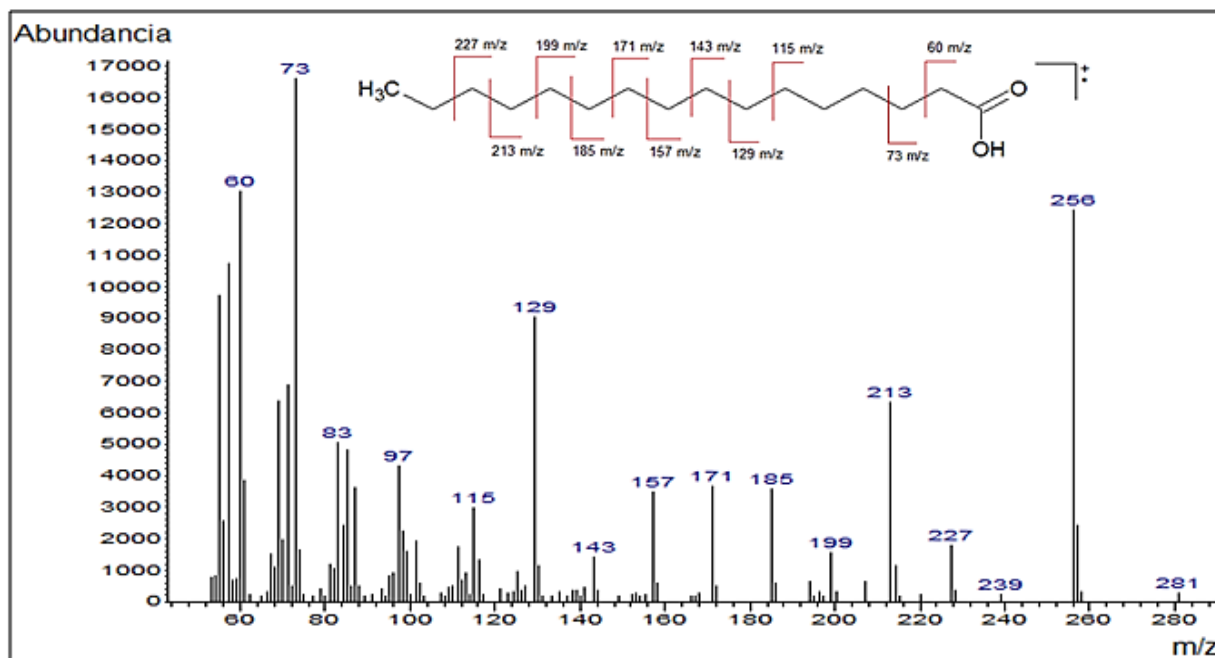


Espectro 2.3 DEPT 135, (0-200) ppm para el compuesto II

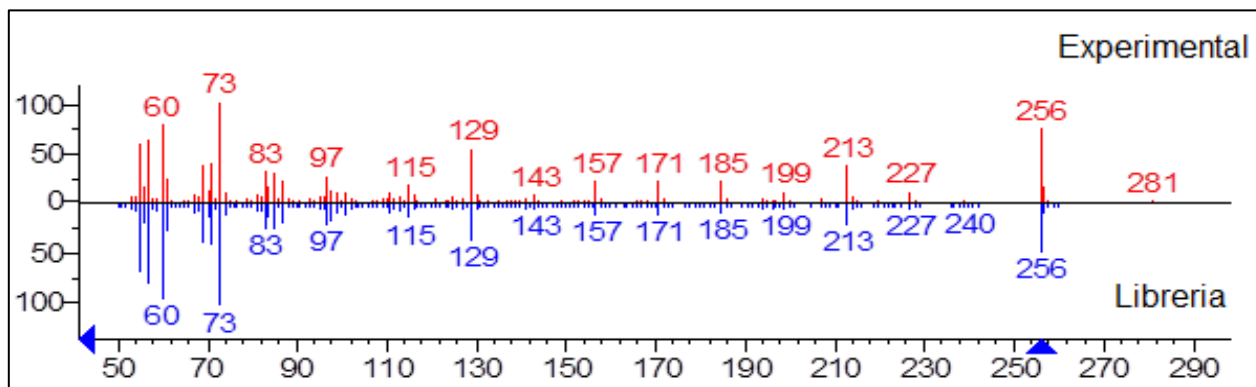
En el análisis del espectro 2.4 de Infrarrojo, se observa una banda ancha y poco intensa en 3411.2 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H, indicando presencia de los grupos hidroxilo en la molécula. Dos bandas agudas y de mediana intensidad en 2918.8 cm^{-1} y 2851.2 cm^{-1} correspondiente a los estiramientos C-H de carbonos Csp_3 , muestran la presencia de cadenas alifáticas. Se observa, una banda aguda e intensa en 1729.5 cm^{-1} característico de vibraciones C=O, se asignaron 2 grupos carbonílicos tipo carboxílicos. Las bandas de mediana y mayor intensidad en 1379.2 cm^{-1} y 1177.4 cm^{-1} respectivamente, para el estiramiento S=O, se asignaron a la presencia de grupo sulfonato. ^[41]



Espectro 2.4 de Infrarrojo para el compuesto II



Espectro 2.5 de Masas para el compuesto II

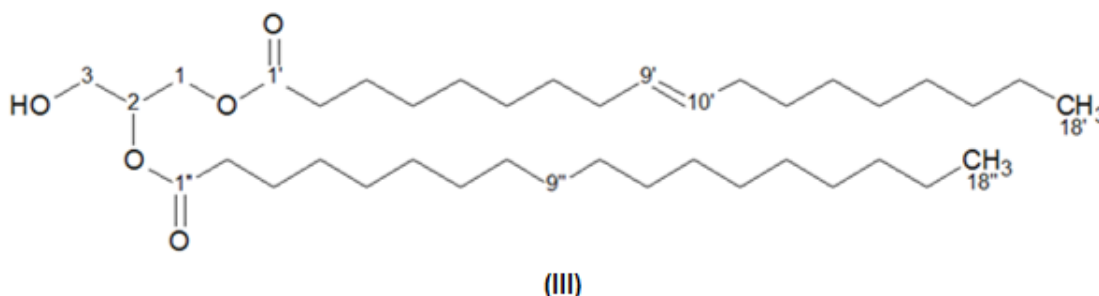


Espectro 2.6 de Masas para el compuesto **II** comparado con la librería NIST

En el espectro de masas 2.5 y 2.6, mediante la técnica de impacto electrónico presentó un M^+ de 256 uma y pico base de m/z 73 uma. La correlación realizada con la librería NIST, permitió la identificación de la cadena alifática, para un ácido graso C16:0 identificado como ácido palmítico, correspondiente a una fórmula molecular de $C_{19}H_{38}O_4$. Estos datos sumados a los espectros de 1H , ^{13}C , DEPT 135 e IR permitió la caracterización del compuesto **II** como un glicolípido identificado: 1,2-dipalmitil-sulfoquinovosil-glicerol.

El compuesto **II**, pertenece a un grupo de compuestos llamados sulfoquinovosil diacil glicerol (SQDG).^[42] Esta clase de compuestos han sido aislados del alga roja como: *Gigartina tenella* con actividad contra VIH transcriptasa reversa tipo 1 con un $IC_{50}=11,2\mu M$, del alga verde *Caulerpa racemosa* presentó actividad contra el Virus Herpes Simplex II con $IC_{50}=15,6\mu M$ y del alga parda *Sargassum vulgare* con actividad contra el Virus Herpes Simplex I y II.^{[43], [44], [45]} Finalmente, un estudio ficoquímico realizado en el laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos de la escuela de Química de la Facultad de Ciencias (UCV), se lograron aislar varios (SQDG) del extracto de hexano del alga *Penicillus capitatus*, con desplazamientos similares a los observados en el compuesto **II**.^[22]

III.3 Elucidación de compuesto III: 2-estearoil-1-oleil-glicerol



El compuesto **III** es el metabolito mayoritario aislado, con señales similares al compuesto **I**, sin embargo muestra señales características de insaturaciones en cadenas alifáticas y se obtuvo del extracto de hexano del alga *Penicillus lamourouxii*. El compuesto **III** es un sólido blanco, con una masa de 19,50 mg, soluble en CHCl_3 , proveniente de la fracción J y un rendimiento (0,40 % para el extracto de hexano y 0,03 % para el material inicial seco). El análisis de los espectros RMN (CDCl_3) de ^1H (Espectro 3.1) y ^{13}C junto al DEPT 135 (Espectro 3.2 al 3.5) permitió la asignación de señales en las tablas 22 y 23, que fueron comparados con lo citado en la literatura. ^[36]
[46]

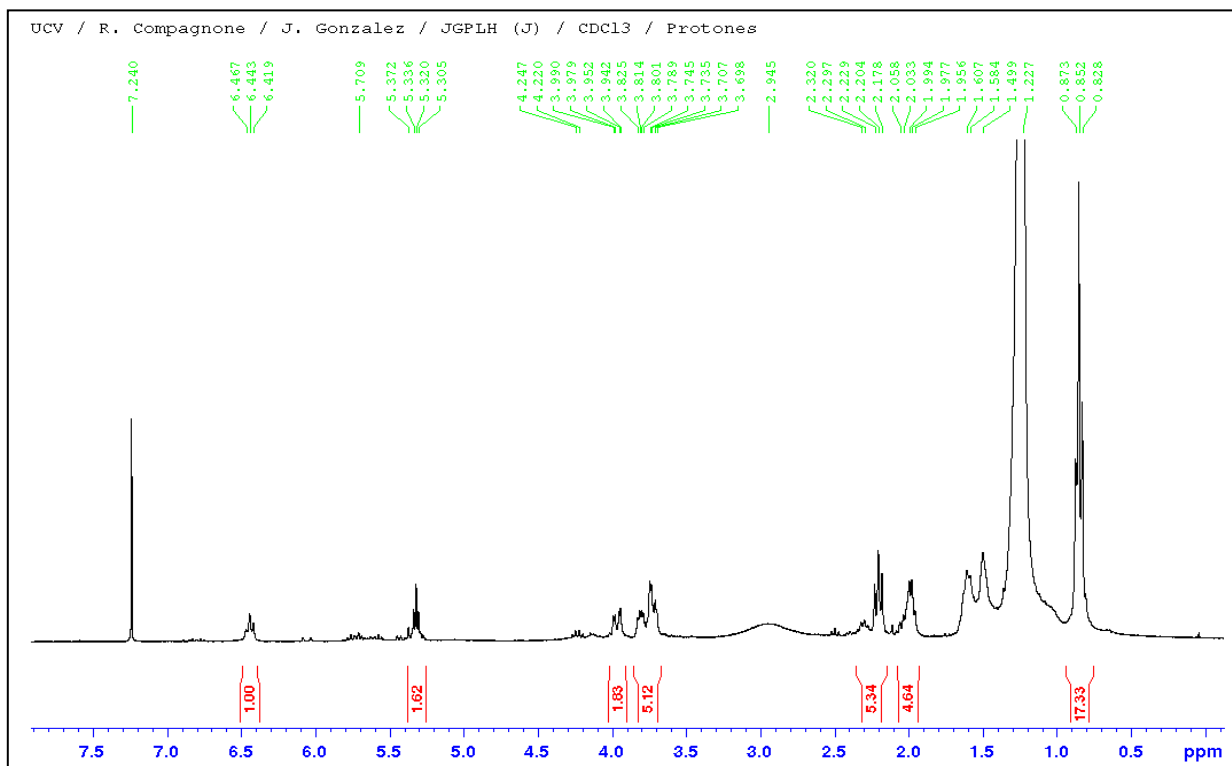
En el espectro 3.1 de ^1H , a campo bajo se observan 2 tripletes (δ_{H} 0,85 $J= 6,75$ Hz), pertenecientes a metilos apantallados, seguidamente por un multiplete (δ_{H} 1,23) correspondiente a los metilenos en cadenas alifáticas. A campo alto un multiplete indicativo de protones desapantallados en carbonos alifáticos (δ_{H} 5,30-5,37), seguidos por protones en carbonos metilénicos vecinos a la insaturación (δ_{H} 1,96-,06).

Luego se aprecia un triplete (δ_{H} 2,20 $J= 7,65$ Hz) característico en protones α a un carbono carbonílico del tipo éster. Finalmente, en la zona media del espectro, dobletes de dobletes (δ_{H} 4,00, $J= 3,30$ Hz y $J= 11,41$ Hz) y (δ_{H} 3,60, $J= 3,00$ Hz y $J= 11,41$ Hz) pertenecientes a los metilenos de una unidad de glicerol, por el acoplamiento

de un protón H-1a o H-3a con el protón geminal H-1b o H-3b y con el protón vecino H-2 (δ_{H} 3,80, m).

Tabla 22. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto III.

Posición H	δ_{H} [CDCl_3] (int, mult., J en Hz) ref. ^[46]	δ_{H} [CDCl_3] (int, mult., J en Hz) exp.
1 ^a	3,59 (1H, dd, 11,5; 5,9)	3,60 (2H, dd, 11,41; 3,00)
1b	3,69 (1H, dd, 11,5; 3,9)	
2	3,90-3,95 (1H, m)	3,80 (1H, m)
3 ^a	4,14 (1H, dd, 11,7; 6,1)	4,00 (2H, dd, 11,41; 3,30)
3b	4,19 (1H, dd, 11,7; 4,8)	
2'	2,34 (2H, t, 5,75)	2,20 (4H, t, 7,65)
3'	1,66-1,58 (2H, m)	1,61-1,58 (4H, m)
(4-7)'	1,25 (m)	1,23 (16H, m)
(8-11)'	1,98-2,03 (4H, m)	1,96-2,06 (8H, m)
(9-10)'	5,30-5,38 (2H, m)	5,30-5,37 (4H, m)
(12-17)'	1,25 (m)	1,23 (16H, m)
18'	0,87 (3H, t, 5,70)	0,85 (6H, t, 6,75)



Espectro 3.1 de ¹H, (0-7,5) ppm para el compuesto III

En los espectros 3.2 - 3.5 de ¹³C y DEPT 135 se observan alrededor de 39 señales. Desplazamientos a campo alto (δ_c 14,0) evidencia la presencia de carbono terminal de una cadena alifática insaturada (δ_c 128,6 y 128,9), donde los carbonos vecinos a las insaturaciones tienen desplazamientos de (δ_c 31,8 y 34,5) debido al desapantallamiento causado por la densidad de carga localizada. De igual forma la densidad de carga presente en el carbonilo tipo carboxílico (δ_c 173,8) causa desapantallamiento en el carbono α (δ_c 36,8). Enlazado al carbonilo, se encuentra el grupo glicerol (δ_c 74,1; 62,4 y 62,3).

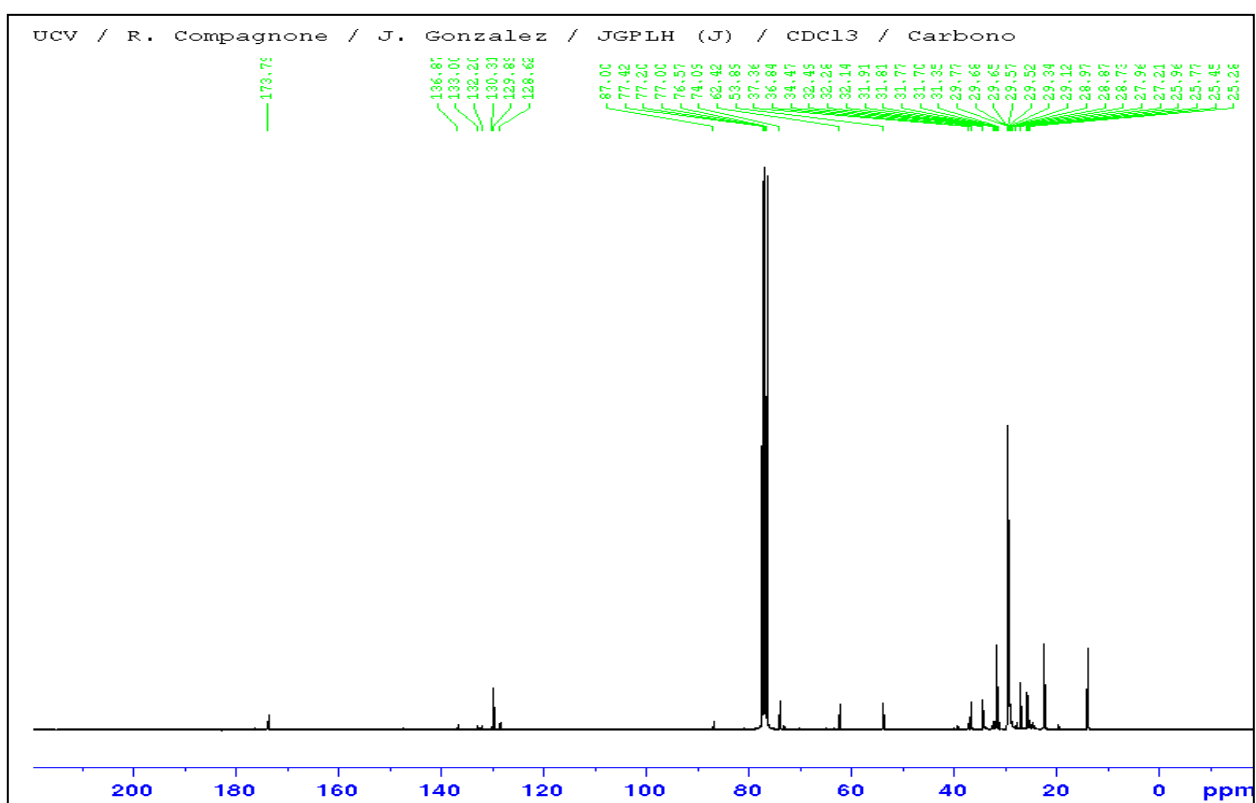
Tabla 23. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto III.

Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. ^[46]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1	63,5 (CH_2)	62,3 (CH_2)
2	70,4 (CH)	74,1 (CH)
3	65,3 (CH_2)	62,4 (CH_2)

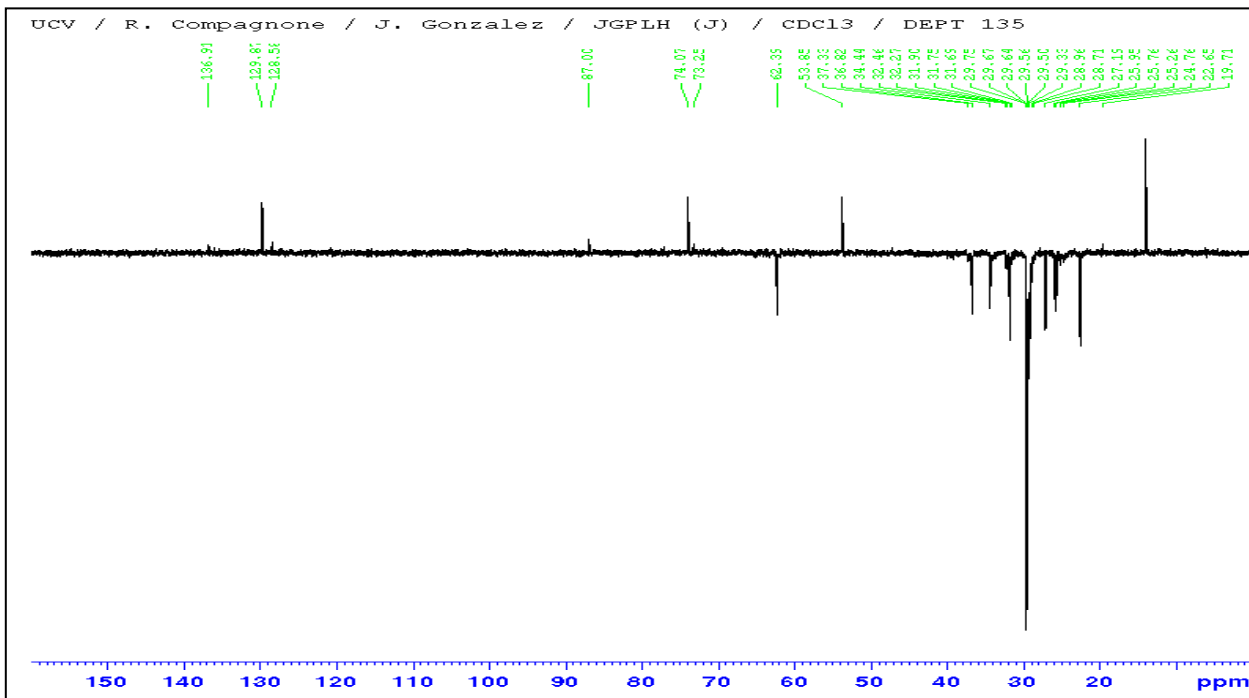
Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. ^[46]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. ^[36]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1'-1''	174,3 (C)	173,8 (C)	174,4 (C)	173,7 (C)
2'-2''	34,1 (CH_2)	36,8 (CH_2)	34,1 (CH_2)	34,5 (CH_2)
3'-3''	24,9 (CH_2)	25,8 (CH_2)	25,0 (CH_2)	26,0 (CH_2)
4'-4''		28,9 (CH_2)	29,2 (CH_2)	28,7 (CH_2)
5'-5''	29,1-29,7 (CH_2)		29,3 (CH_2)	29,3 (CH_2)
6'-6''		29,1-29,7 (CH_2)	29,5 (CH_2)	29,5 (CH_2)
7'-7''			29,6 (CH_2)	29,6 (CH_2)
8'-8''	27,1 (CH_2)	27,2 (CH_2)	27,3 (CH_2)	27,2 (CH_2)
9'-9''	129,7 (CH)	128,6 (CH)	29,8 (CH_2)	29,8 (CH_2)
10'-10''	130,0 (CH)	128,9 (CH)	29,4 (CH_2)	29,3 (CH_2)
11'-11''	27,2 (CH_2)	27,2 (CH_2)		
12'-12''				
13'-13''	29,1-29,7 (CH_2)	29,3-29,7 (CH_2)	29,7 (CH_2)	29,7 (CH_2)
14'-14''				

15'-15''			29,4 (CH ₂)	29,3 (CH ₂)
16'-16''	31,9 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,9 (CH ₂)	31,8 (CH ₂)
17'-17''	22,7 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)
18'-18''	14,1 (CH ₃)	14,0 (CH ₃)	14,1 (CH ₃)	14,0 (CH ₃)

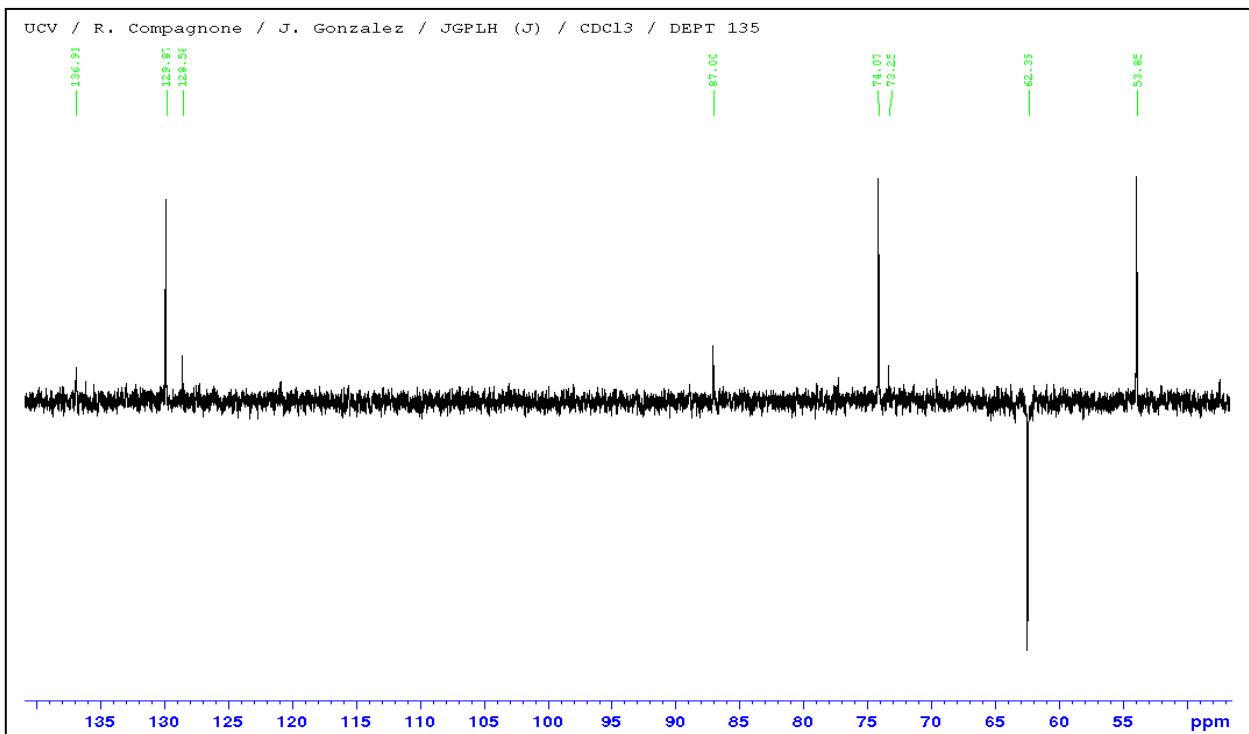
^aMultiplicidad asignada mediante DEPT 135.



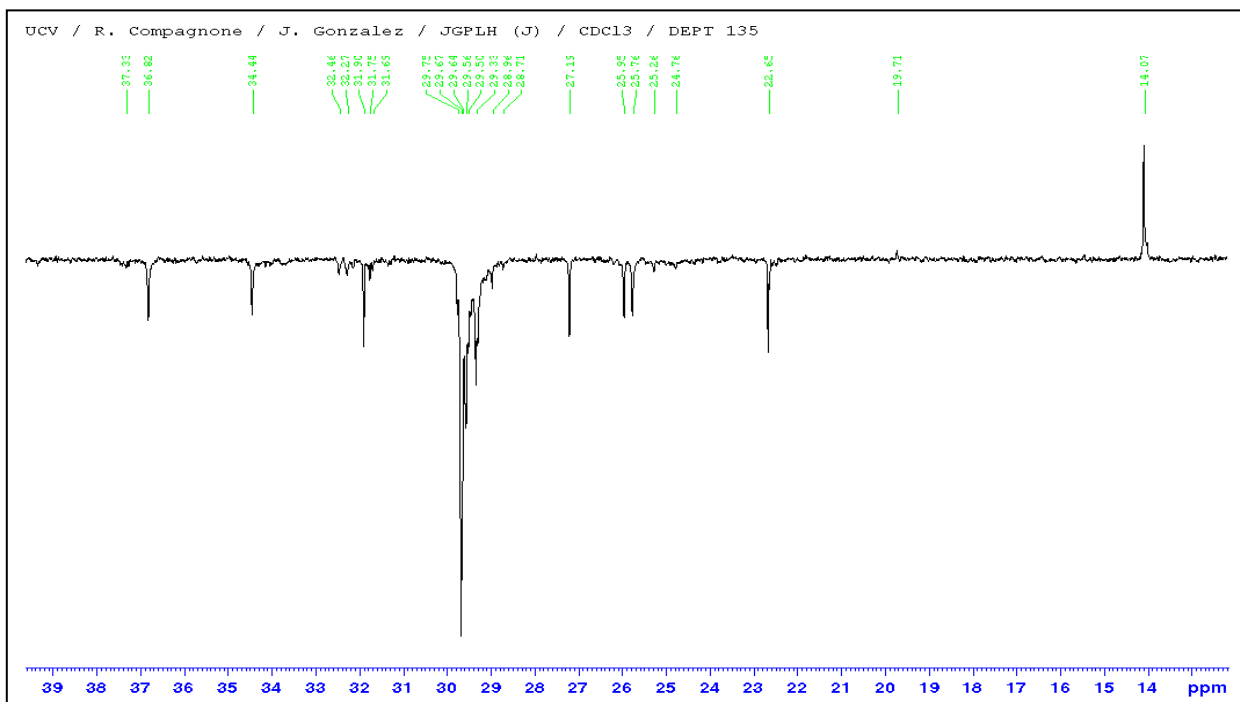
Espectro 3.2 de ¹³C, (0-200) ppm para el compuesto III



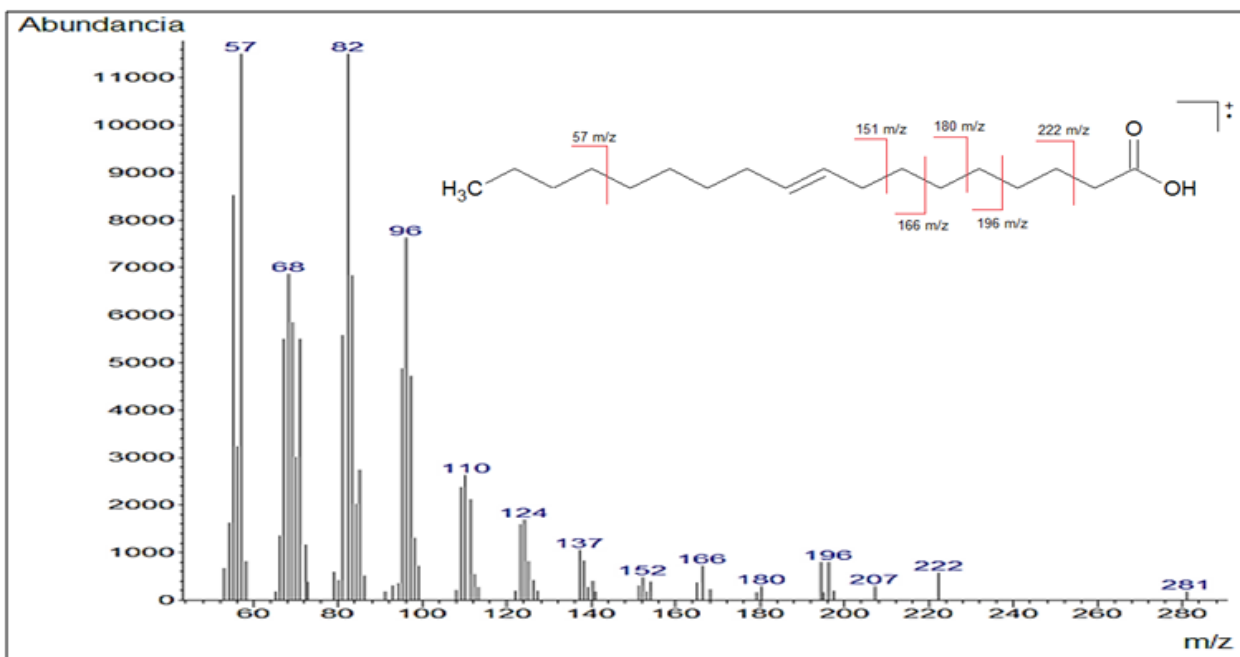
Espectro 3.3 de DEPT 135, (0-150) ppm para el compuesto III



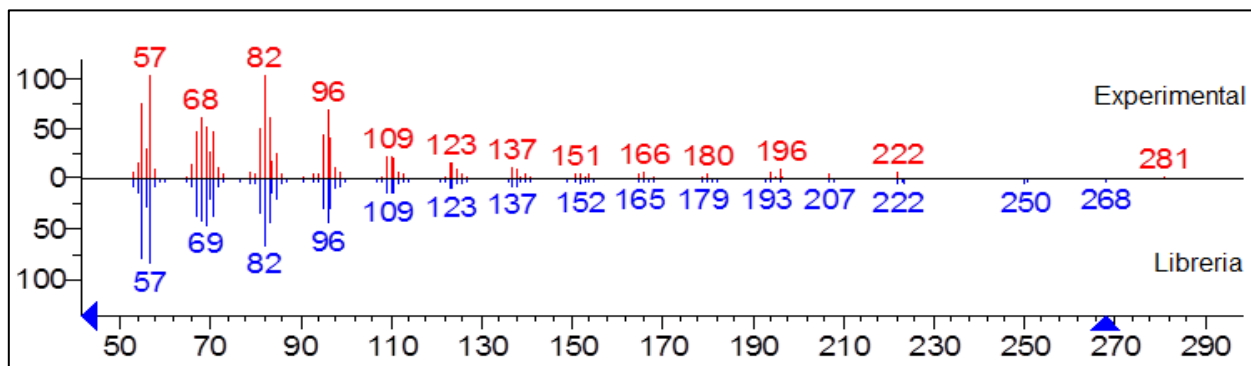
Espectro 3.4 de DEPT 135, (50-140) ppm para el compuesto III



Espectro 3.5 de DEPT 135, (13-39) ppm para el compuesto III



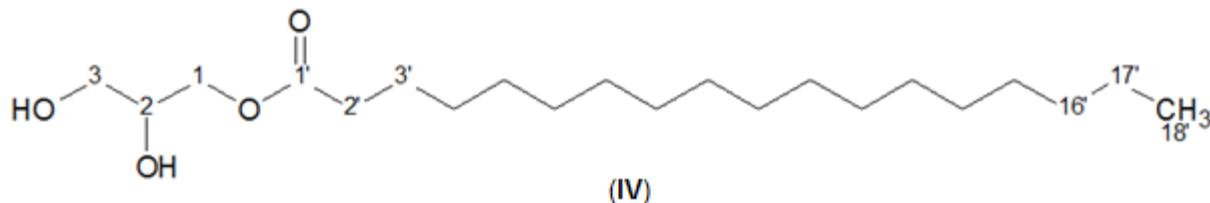
Espectro 3.6 de Masas para el compuesto III



Espectro 3.7 de Masas para el compuesto **III** comparado con la librería NIST

En el espectro de masas 3.6 y 3.7, mediante la técnica de impacto electrónico presentó un M^+ de 281 uma y pico base de m/z 57 uma. La correlación realizada con la librería NIST, permitió la identificación de la cadena alifática insaturada. El espectro experimental, corresponde a el ácido oleico de formula molécula $C_{18}H_{34}O_2$. Estos datos sumados a los espectros de 1H , ^{13}C y DEPT 135 permitió la caracterización del compuesto **III** como un glicolípido identificado: 2-estearoil-1-oleil-glicerol.

III.4 Elucidación de compuesto IV: 1-estearoil-glicerol

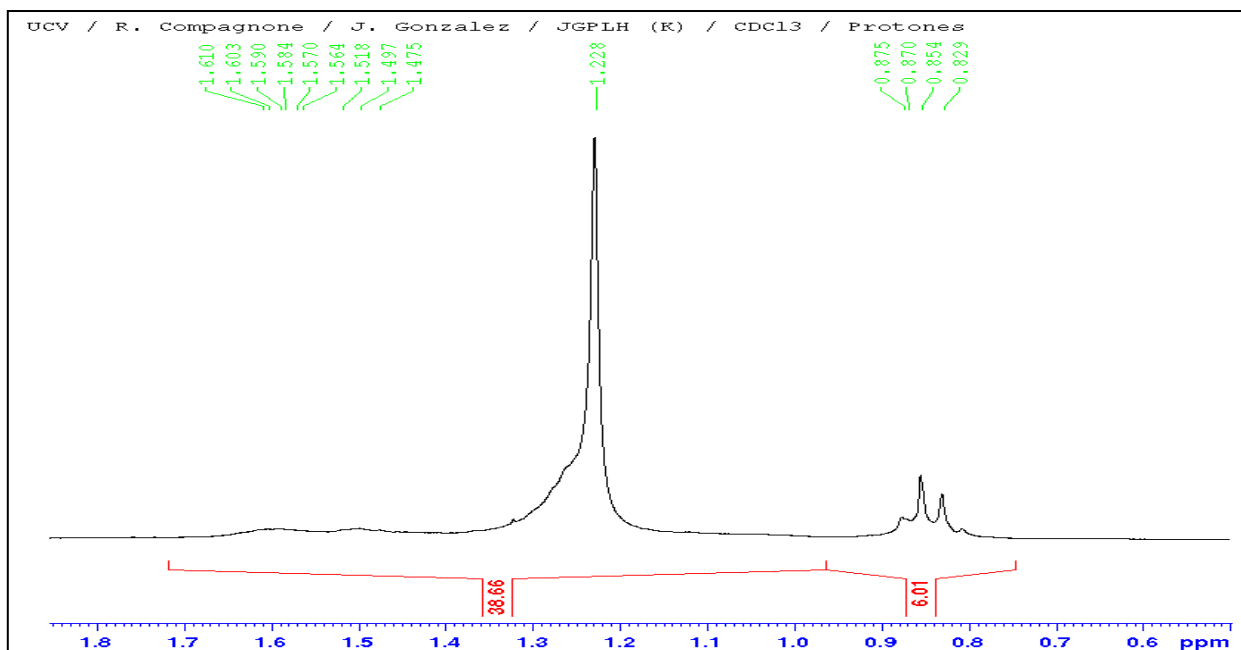


El compuesto **IV** es el metabolito mayoritario aislado, posee señales similares al compuesto **I** y se obtuvo del extracto de hexano del alga *Penicillus lamourouxii*. El compuesto **IV** es un sólido blanco, con una masa de 10,40 mg, soluble en CHCl_3 proveniente de la fracción K y un rendimiento (0,21% para el extracto de hexano y 0,02% para el material inicial seco). El análisis de los espectros RMN (CDCl_3) de ^1H (Espectro 4.1 al 4.3) y ^{13}C junto al DEPT 135 (Espectro 4.4 al 4.7) permitió la asignación de señales en la tabla 24 y 25, que fueron comparados con lo citado en la literatura. [38],[47]

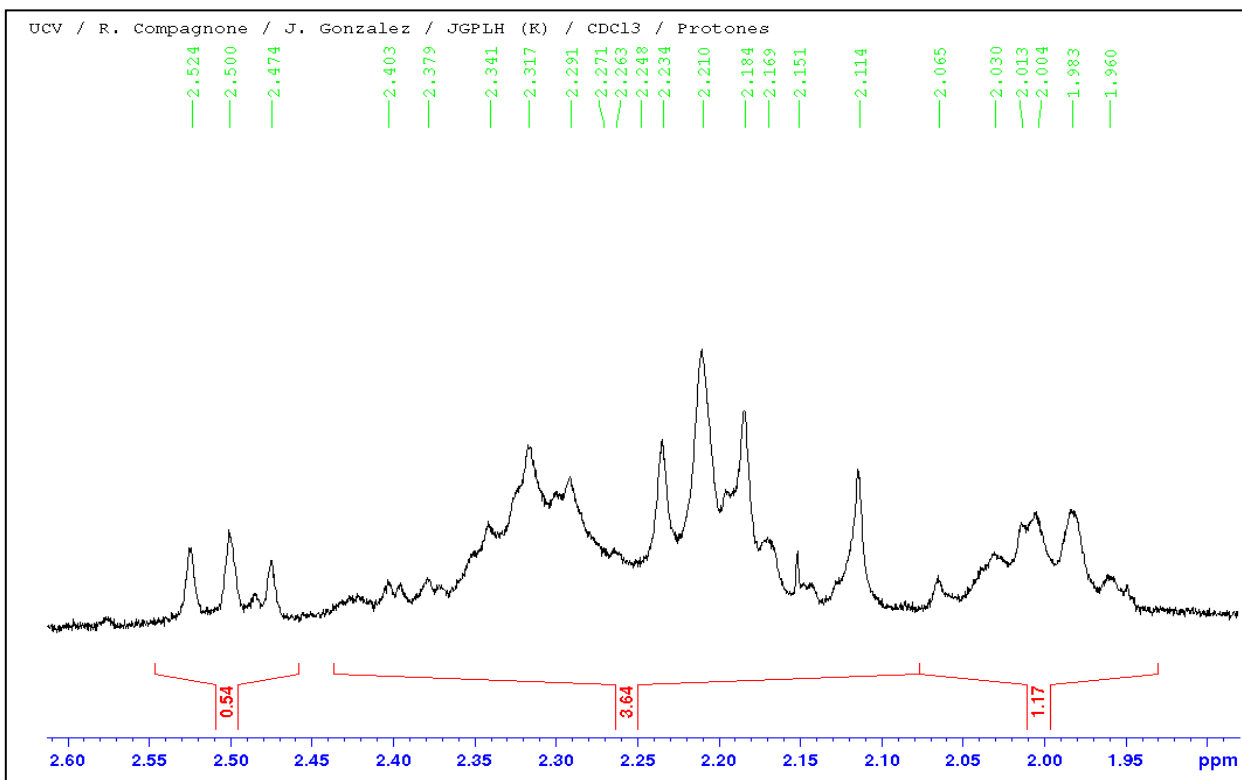
En el espectro 4.1 de ^1H , se distingue a campo alto un multiplete (δ_{H} 0,85) perteneciente a protones en carbonos de metilos apantallados, seguido de un multiplete (δ_{H} 1,23) característico de protones en carbonos metilénicos de cadenas alifáticas. Luego en el espectro 4.2 de ^1H , se observa un triplete en (δ_{H} 2,32), característico de protones α a grupos carbonílicos. Además, en el espectro 4.3 de ^1H , se observa dobletes de dobletes (δ_{H} 3,97 $J= 3,00 \text{ Hz}$ y $J= 11,11 \text{ Hz}$) y (δ_{H} 3,75 $J= 2,70 \text{ Hz}$ y $J= 11,41 \text{ Hz}$) por el acoplamiento del protón metilénico H-1a o H-1b con el protón geminal H-3a o H-3b y el protón del carbono vecino H-2 (δ_{H} 3,81, m).

Tabla 24. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto **IV**.

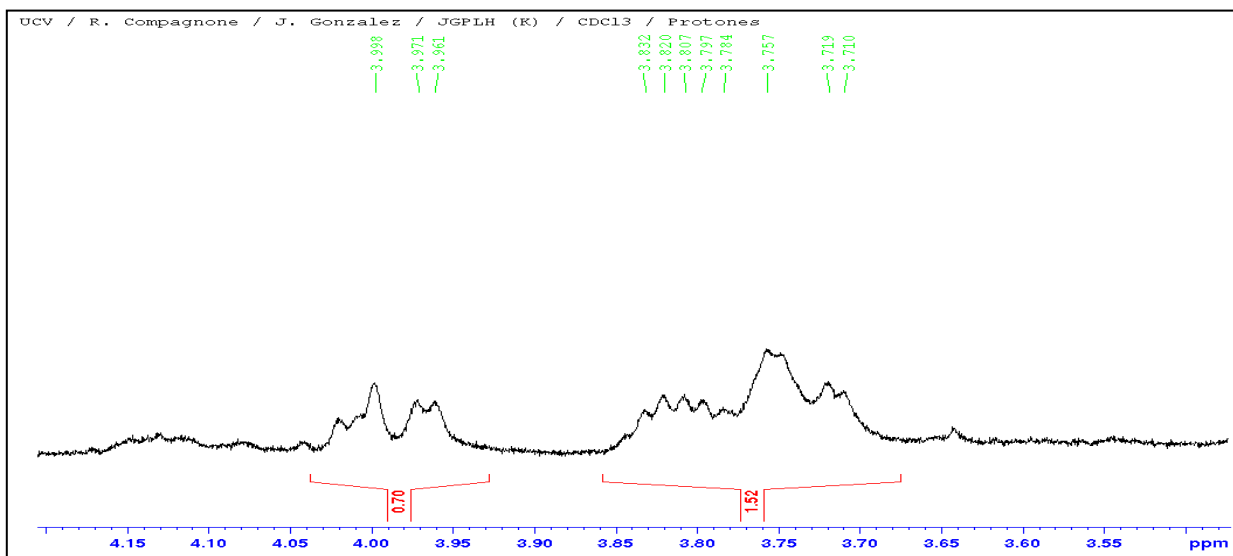
Posición H	δ_{H} [CDCl_3]	δ_{H} [CDCl_3]
	(int, mult., J en Hz) ref. ^[38]	(int, mult., J en Hz) exp.
1	4,20 (2H, m)	3,97 (2H, dd, 3,00; 11,11)
2	5,23 (1H, m)	3,81 (1H, m)
3	4,30 (2H, m)	3,75 (2H, dd, 2,70; 11,41)
2'	2,35 (2H, m)	2,32 (2H, t, 7,5)
3'	1,65 (2H, m)	2,21(2H, t, 7,5)
(4-17)'	1,30 (28H, m)	1,23 (24H, s)
18'	0,89 (3H, m)	0,85 (3H, m)



Espectro 4.1 de ^1H , (0,-1,8) ppm para el compuesto **IV**



Espectro 4.2 de ^1H , (1,90-2,60) ppm para el compuesto IV



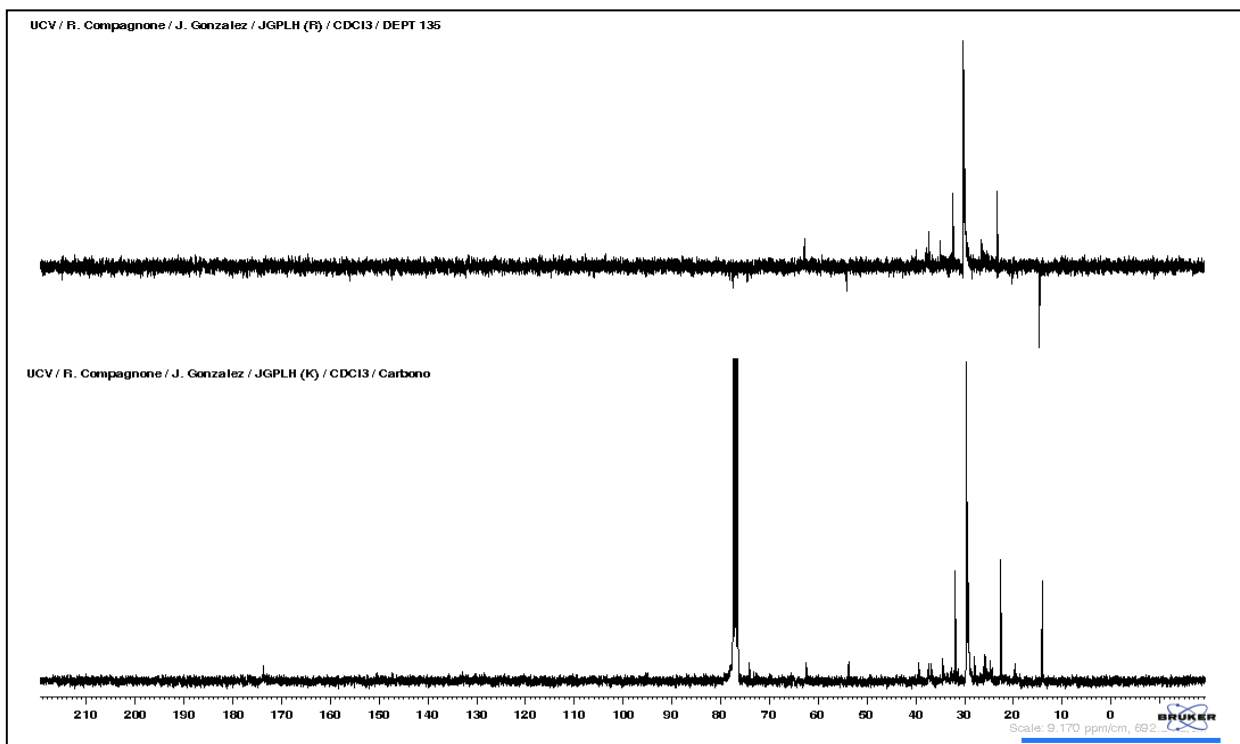
Espectro 4.3 de ^1H , (3,50-4,20) ppm para el compuesto IV

Tabla 25. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **IV**.

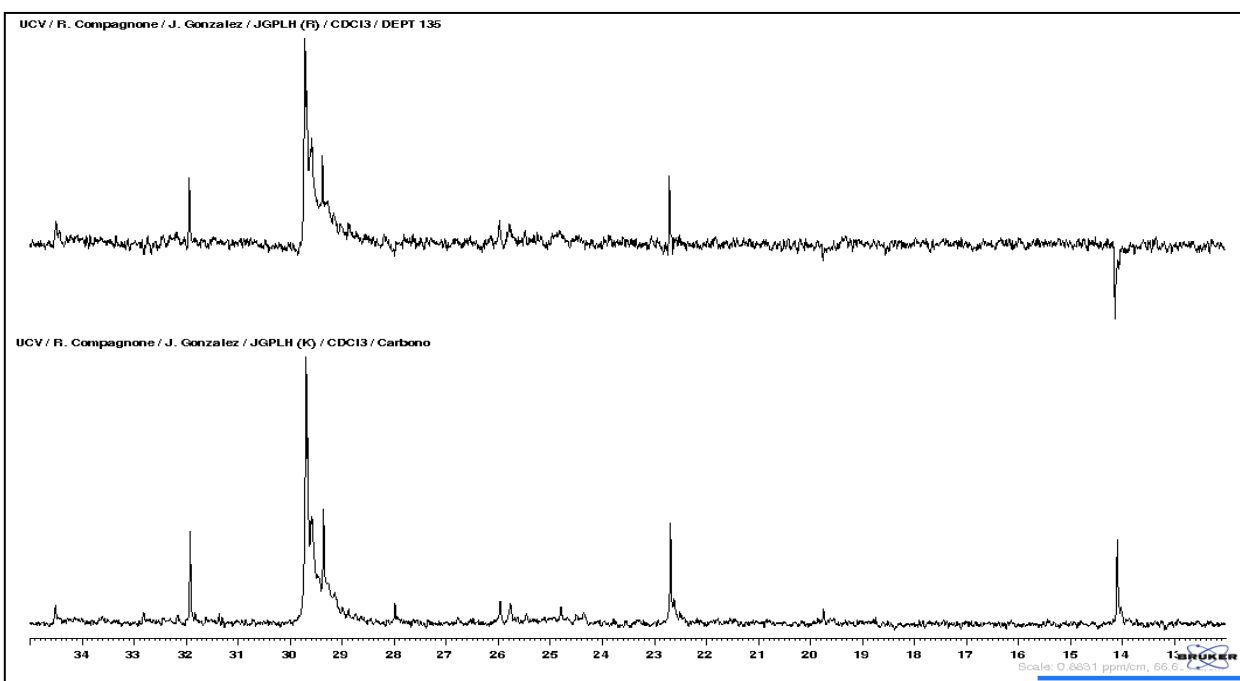
Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. ^[38]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1	62,1 (CH_2)	62,4 (CH_2)
2	68,9 (CH)	74,2 (CH)
3	62,1 (CH_2)	62,5 (CH_2)
1'	173,3 (C)	173,7 (C)
2'	34,5 (CH_2)	34,5 (CH_2)
3'	24,5 (CH_2)	24,8 (CH_2)
(4-14)'	29,5 (CH_2)	29,3-29,7 (CH_2)
15'	27,5 (CH_2)	
16'	32,0 (CH_2)	32,0 (CH_2)
17'	22,8 (CH_2)	22,7 (CH_2)
18'	14,0 (CH_3)	14,0 (CH_3)

^aMultiplicidad asignada mediante DEPT 135.

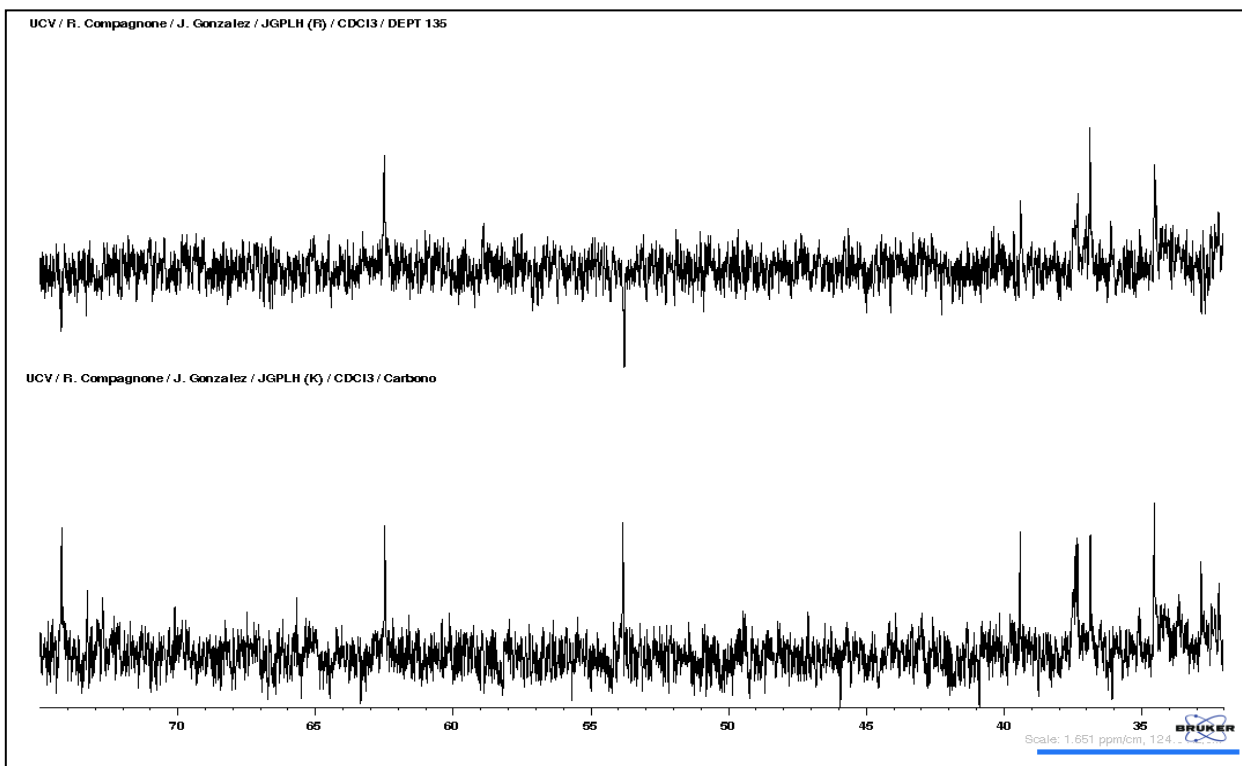
En los espectros 4.4 - 4.7 de ^{13}C , se observaron 2 grupos de señales. El primero correspondiente al grupo glicerol (δ_{C} 74,2, 62,5 y 62,4). El segundo grupo de señales pertenecen a la cadena alifática saturada, para el carbono terminal (δ_{C} 14,0) y para el carbono α (δ_{C} 34,5) unido al carbonilo tipo carboxílico (δ_{C} 173,7).



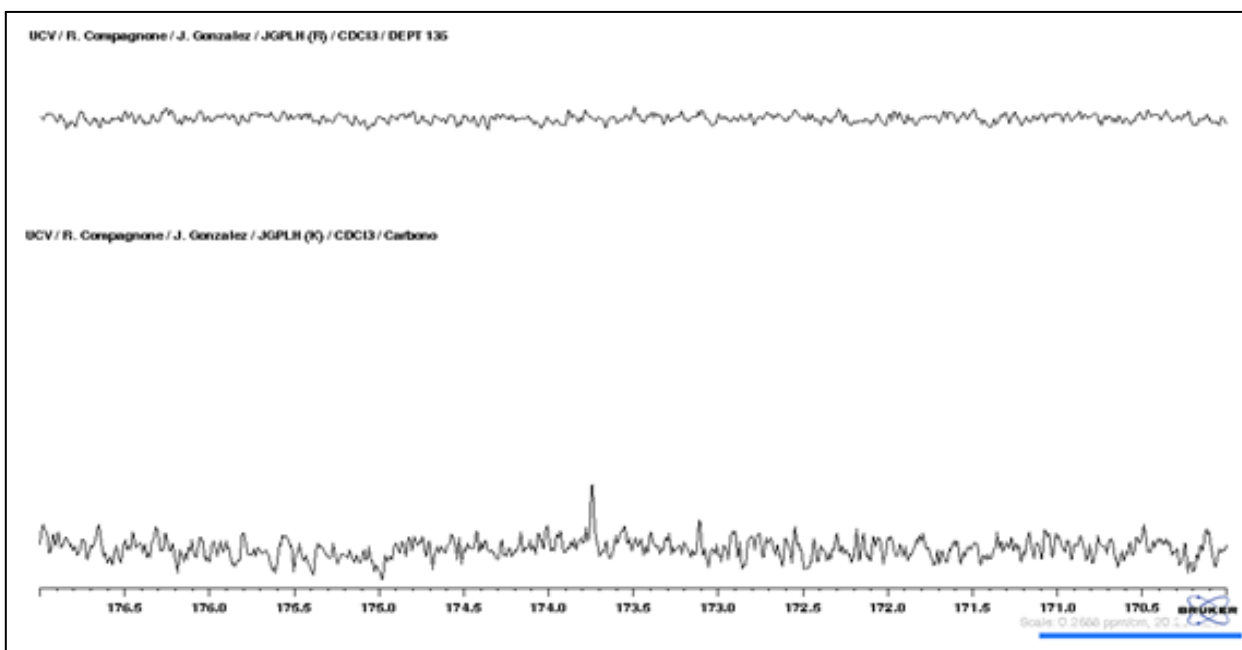
Espectro 4.4 comparación ¹³C y DEPT 135, (0-210) ppm para la compuesto IV



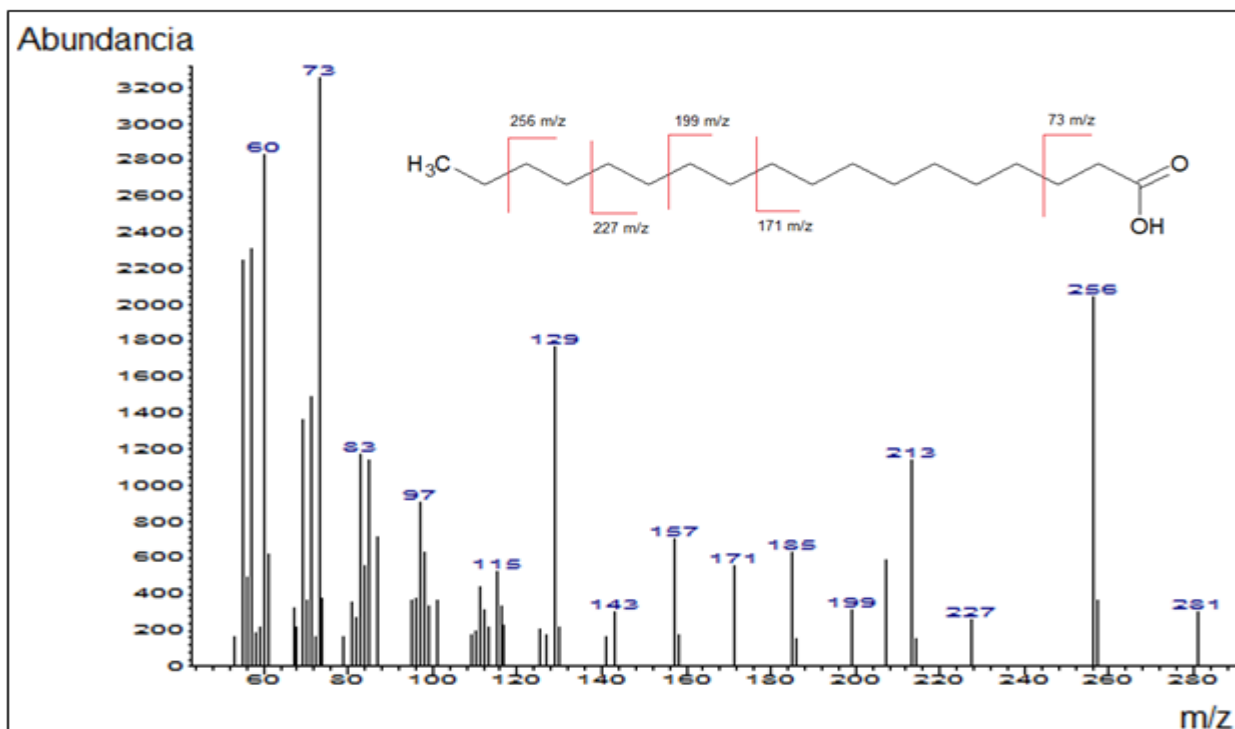
Espectro 4.5 comparación ¹³C y DEPT 135, (13-34) ppm para la compuesto IV



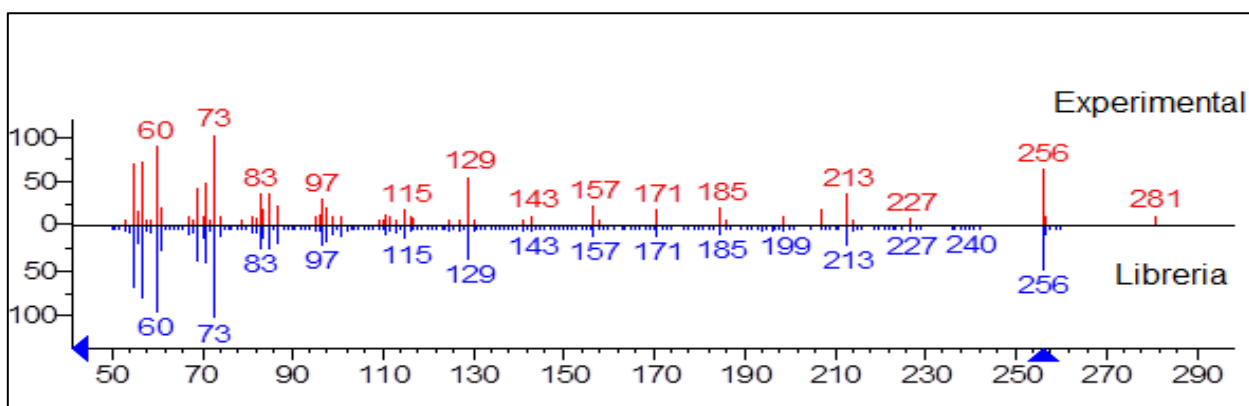
Espectro 4.6 comparación ¹³C y DEPT 135, (35-75) ppm para la compuesto **IV**



Espectro 4.7 comparación ¹³C y DEPT 135, (170-177) ppm para compuesto **IV**



Espectro 4.8 de Masas para el compuesto IV

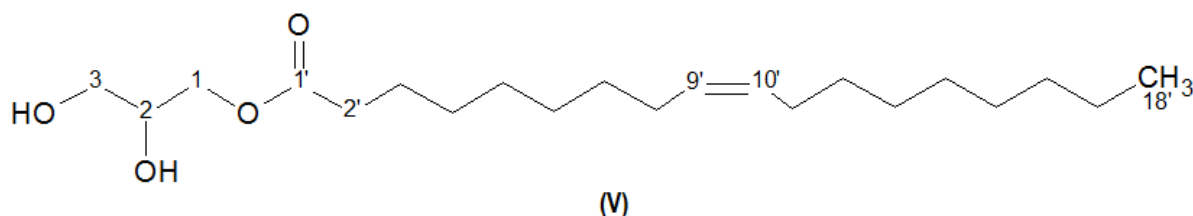


Espectro 4.9 de Masas para el compuesto IV comparado con la librería NIST

En el espectro de masas 4.8 y 4.9, mediante la técnica de impacto electrónico presentó un M^+ de 281 uma y picos base de m/z 73 uma. La correlación realizada con la librería NIST, permitió la identificación de la cadena alifática saturada. En el espectro experimental, corresponde ácido octadecanoico para una fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$.

Estos datos sumados a los espectros de ^1H , ^{13}C y DEPT 135 permitió la caracterización del compuesto **IV** como un glicolípido identificado: 1-estearoil-glicerol.

III.5 Elucidación del compuesto V: 1-oleil-glicerol.

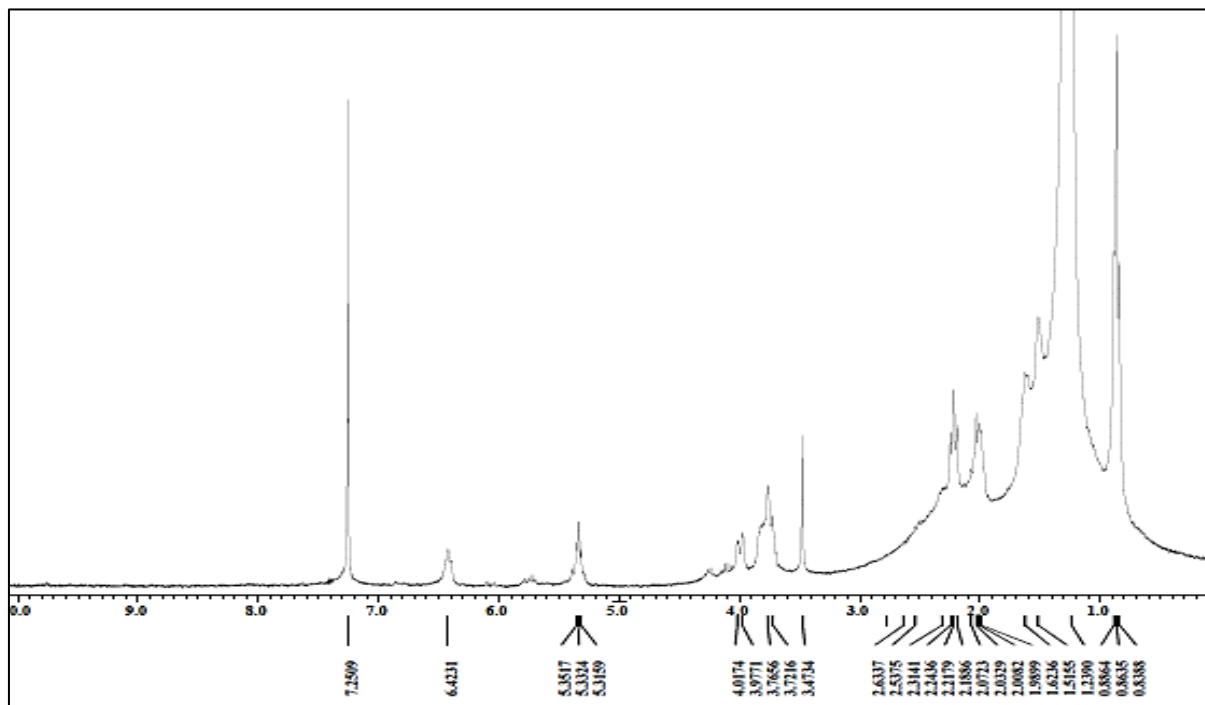


El compuesto **V** es el metabolito mayoritario aislado, con señales similares al compuesto **III** y se obtuvo del extracto de hexano del alga *Penicillus pyriformis*. El compuesto **V** un sólido blanco con una masa de 9,10 mg, soluble en CHCl_3 , correspondiente a la sub-fracción **I'** con un rendimiento (0,16 % para el extracto de hexano y 0,01 % para el material inicial seco). El análisis de los espectros RMN (CDCl_3) de ^1H (Espectro 5.1) y ^{13}C junto al DEPT 135 (Espectro 5.2 al 5.4) permitió la asignación de señales en las tablas 26 y 27, que fueron comparados con lo citado en la literatura. ^{[46], [47]}

En el espectro 5.1 de ^1H , se observa a campo bajo, un triplete (δ_{H} 0,86 $J= 6,42$ Hz) característico de metilos terminales en cadenas alifáticas terminales, seguido de un multiplete (δ_{H} 1,24, m) perteneciente a metilenos en cadenas alifáticas. Luego se observa, protones vecinos a carbonos sp_2 insaturados (δ_{H} 1,99-2,03) y protones α al grupo carbonilo (δ_{H} 2,22). Además, se observa en la zona media, un multiplete perteneciente a la unidad de glicerol (δ_{H} 4,02, 3,98 y 3,72), y a campo bajo se observa un triplete (δ_{H} 5,33) perteneciente a la insaturación en la cadena carbonada.

Tabla 26. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto **V**.

Posición H	δ_{H} [CDCl_3] (int, mult., J en Hz) ref. ^[46]	δ_{H} [CDCl_3] (int, mult., J en Hz) exp.
1 ^a	3,59 (1H, dd, 11,5; 5,9)	4,02 (2H, m)
1b	3,69 (1H, dd, 11,5; 3,9)	
2	3,90-3,95 (1H, m)	3,98 (1H, m)
3 ^a	4,14 (1H, dd, 11,7; 6,1)	3,72 (2H, m)
3b	4,19 (1H, dd, 11,7; 4,8)	
2'	2,34 (2H, t, 5,75)	2,22 (2H, t, 7,06)
3'	1,66-1,58 (2H, m)	1,52-1,62 (2H, m)
(4-7)'	1,25 (m)	1,24 (m)
(8-11)'	1,98-2,03 (4H, m)	1,99-2,03 (4H, m)
(9-10)'	5,30-5,38 (2H, m)	5,33 (2H, t, 5,37)
(12-17)'	1,25 (m)	1,24 (m)
18'	0,87 (3H, t, 5,70)	0,86 (3H, t, 6,42)



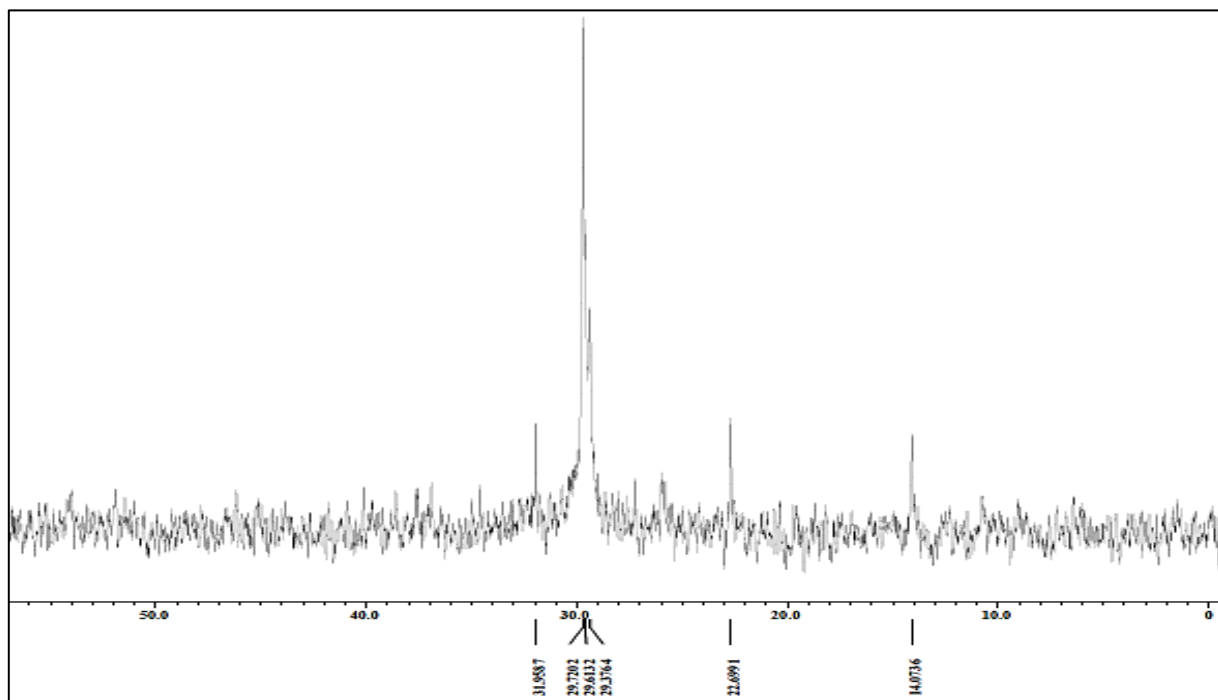
Espectro 5.1 de ^1H , (0-10) ppm para el compuesto **V**

En los espectros 5.2-5.4 de ^{13}C y DEPT 135, se observan alrededor de 18 señales. El compuesto posee desplazamientos a campo alto (δ_{C} 14,1), que evidencia la presencia de carbono terminal de una cadena alifática insaturada (δ_{C} 136,0 y δ_{C} 130,0), donde los carbonos vecinos a las insaturaciones tienen desplazamientos de (δ_{C} 34,6) debido al desapantallamiento causado por la densidad de carga localizada. De igual forma, desapantallamiento en el carbono α (δ_{C} 32,0) debido a la densidad de carga presente en el carbonilo tipo carboxílico (δ_{C} 174,5) que se encuentra enlazado al grupo glicerol (δ_{C} 74,3, 62,4 y 62,4).

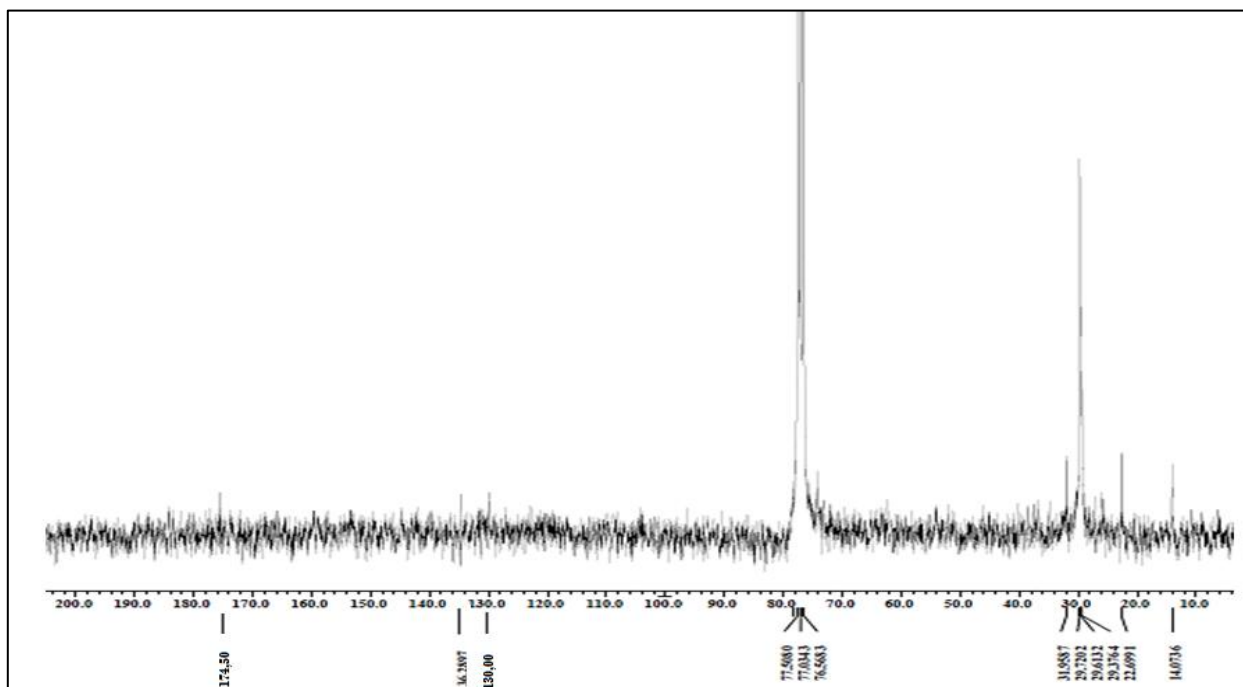
Tabla 27. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto V.

Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. ^[46]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1	63,5 (CH_2)	62,4 (CH_2)
2	70,4 (CH)	74,3 (CH)
3	65,3 (CH_2)	62,5 (CH_2)
1'	174,3 (C)	174,5 (C)
2'	34,1 (CH_2)	32,0 (CH_2)
3'	24,9 (CH_2)	25,8 (CH_2)
4'		27,3 (CH_2)
5'-7'	29,1-29,7 (CH_2)	29,4-29,7 (CH_2)
8'-11'	27,1 (CH_2)	34,6 (CH_2)
11'-8'		
9'-10'	129,7 (CH)	130,0 (CH)
10'-9'	130,0 (CH)	136,0 (CH)
12'-15'	29,1-29,7 (CH_2)	29,4-29,7 (CH_2)
16'	31,9 (CH_2)	30,2 (CH_2)
17'	22,7 (CH_2)	22,7 (CH_2)
18'	14,1 (CH_3)	14,1 (CH_3)

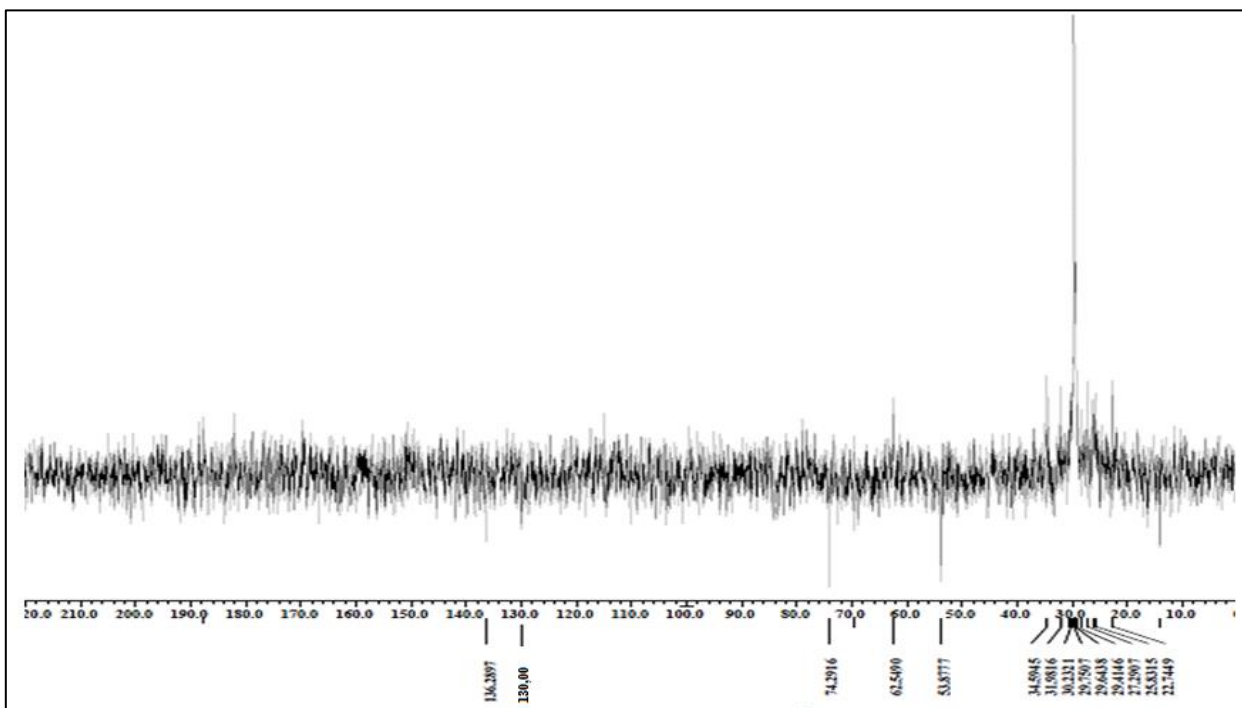
^aMultiplicidad asignada mediante DEPT 135.



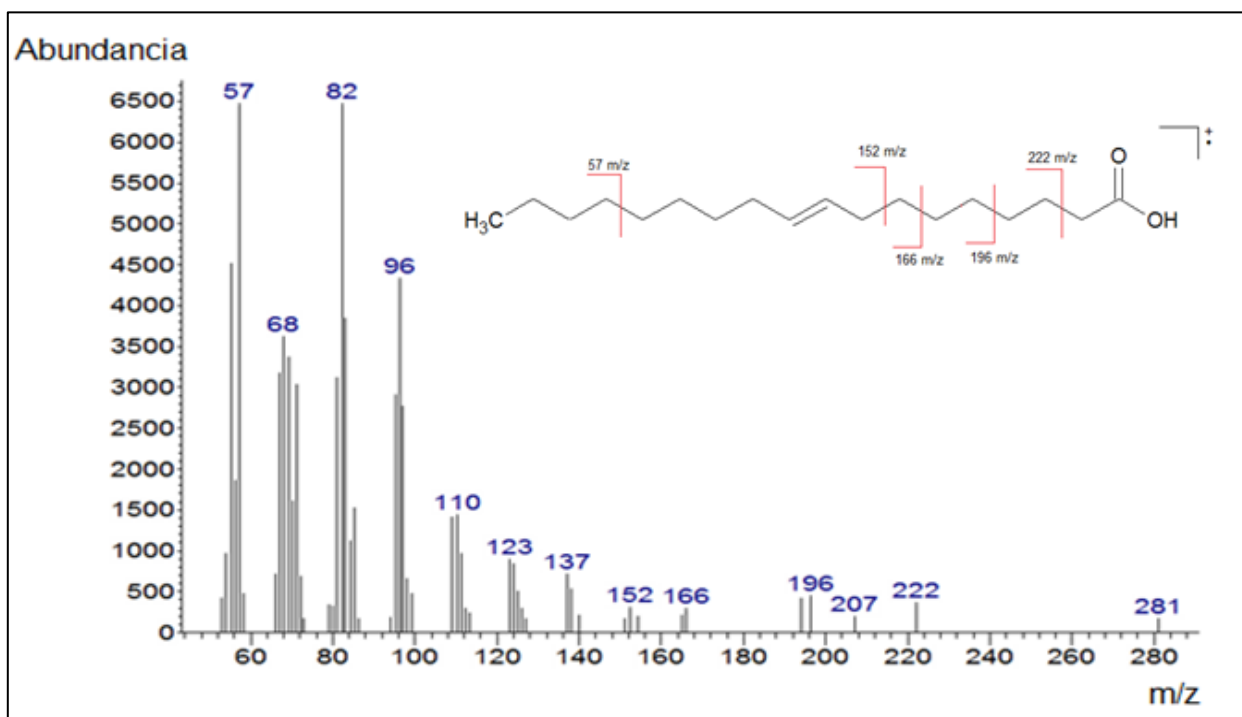
Espectro 5.2 de ^{13}C , (0-50) ppm para el compuesto V



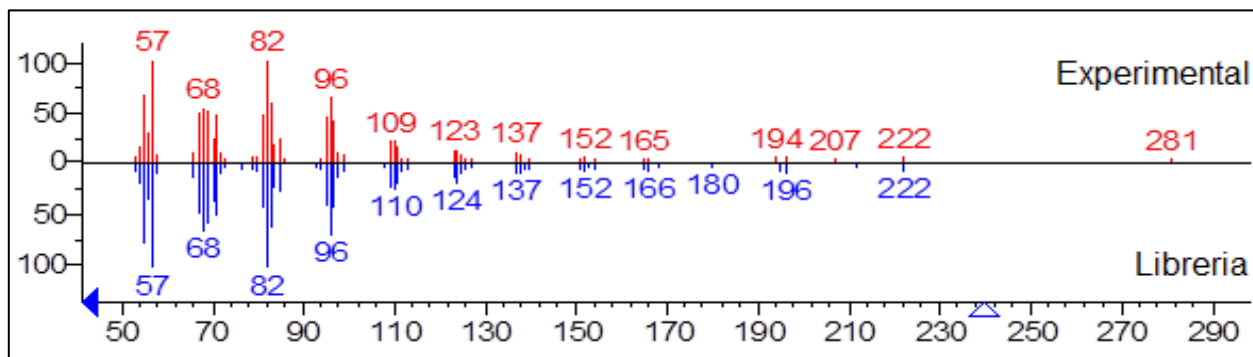
Espectro 5.3 de ^{13}C , (0-210) ppm para el compuesto V



Espectro 5.4 de DEPT 135, (0-220) ppm para el compuesto **V**



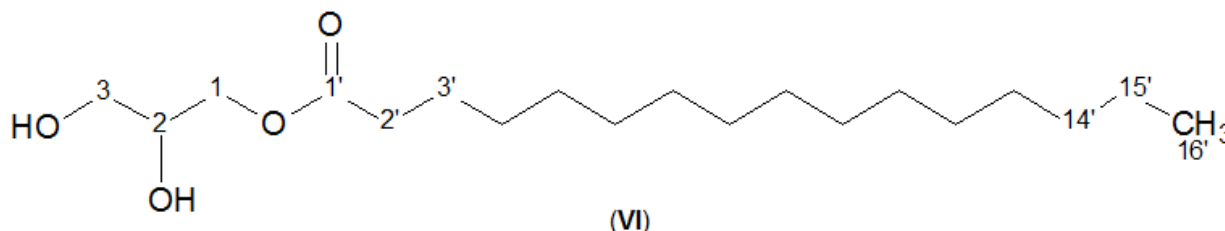
Espectro 5.5 de Masas para el compuesto **V**



Espectro 5.6 de Masas para el compuesto **V** comparado con la librería NIST

En el espectro de masas 5.5 y 5.6, mediante la técnica de impacto electrónico presentó un M^+ de 281 uma y picos base de m/z 57 uma. La correlación realizada con la librería NIST, permitió la identificación de la cadena alifática saturada. El espectro experimental sugiere la presencia de ácido oleico, para una fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_2$. Estos datos sumados a los espectros de 1H , ^{13}C y DEPT 135 permitió la caracterización del compuesto **V** como un glicolípido identificado: 1-oleil-glicerol.

III.6 Elucidación del compuesto VI: 1-palmitil-glicerol



El compuesto **VI** es la propuesta de metabolito mayoritario aislado, con señales similares al compuesto **I** y se obtuvo del extracto de hexano del alga *Penicillus pyriformis*. El compuesto **VI** es un aceite de color amarillo con una masa de 7,60 mg, soluble en CHCl_3 , correspondiente a la sub-fracción **S.6** con un rendimiento (0,14% para el extracto de hexano y 0,008% para el material inicial seco). El análisis de los espectros RMN (CDCl_3) de ^1H (Espectro 6.1) y ^{13}C junto al DEPT 135 (Espectro 6.2 y 6.3) permitió la asignación de señales en las tablas 28 y 29, que fueron comparados con lo citado en la literatura. ^{[48]. [49]}

En el espectro de 6.1 de ^1H , a campo bajo se observa triplete (δ_{H} 0,86 $J= 6,42$ Hz), seguido de un multiplete (δ_{H} 1,24, m) perteneciente a metilenos en cadenas alifáticas saturadas, luego se observan multipletes con desplazamientos (δ_{H} 2,28 y 1,50, m) para protones α y β , al carbono carbonílico respectivamente. En la zona media (δ_{H} 3,47-3,72, m) multipletes pertenecientes a la unidad de glicerol. En los espectro de ^{13}C y DEPT 135 6.2 y 6.3, se observan alrededor de 8 señales, con desplazamientos a campo alto (δ_{C} 14,0), evidencia metilo terminar de la cadena alifática, enlazado a metilenos (δ_{C} 29,3-29,8), que se encuentra unido a un carbonilo del tipo carboxílico con desplazamiento a campo bajo (δ_{C} 173,7).

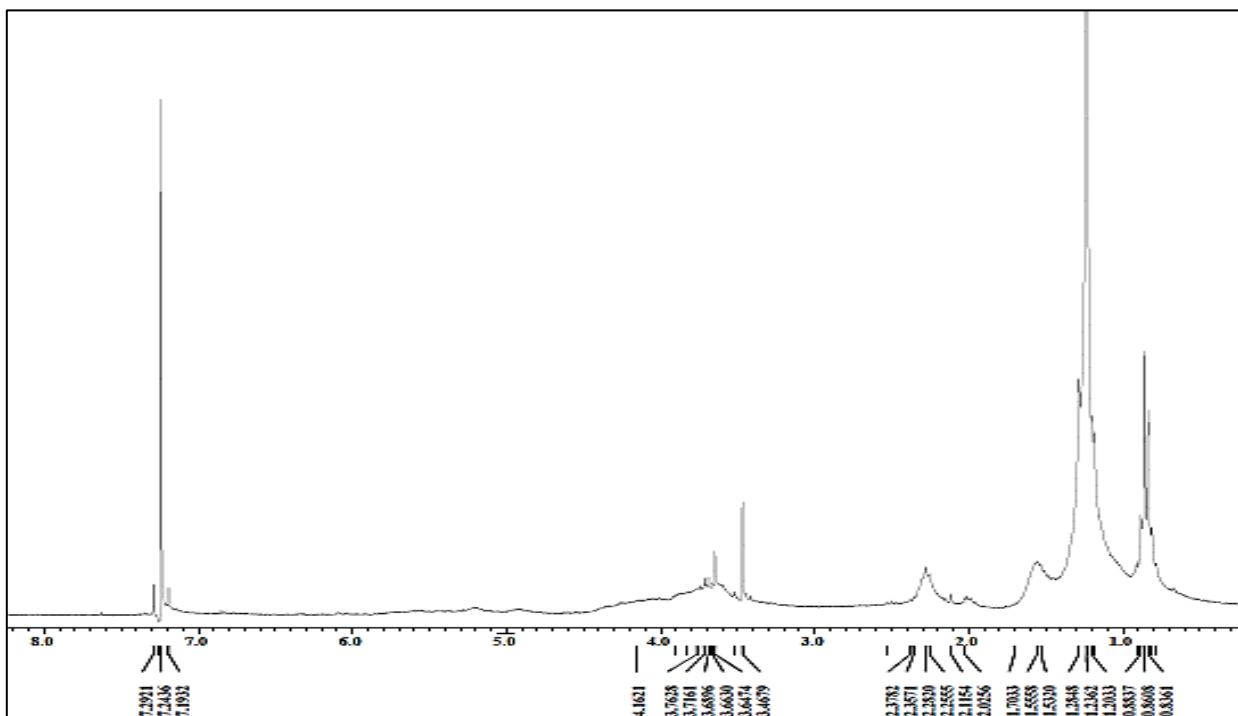
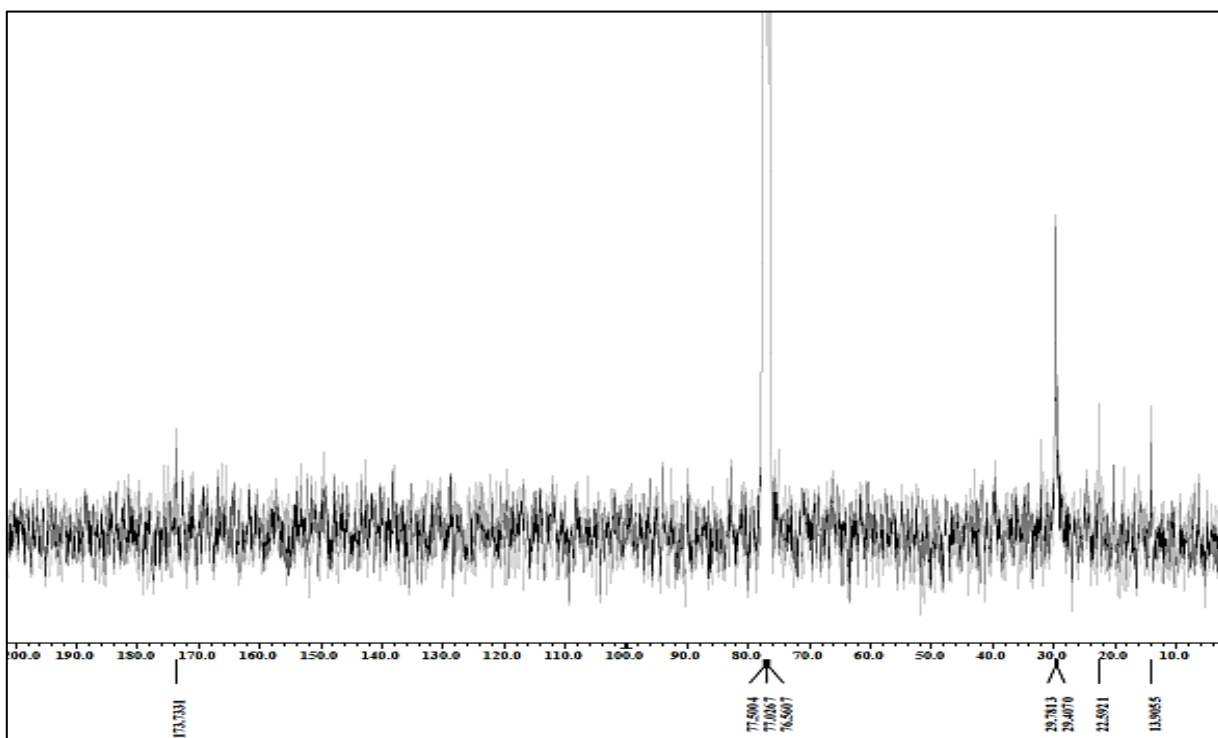
Tabla 28. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto **VI**.

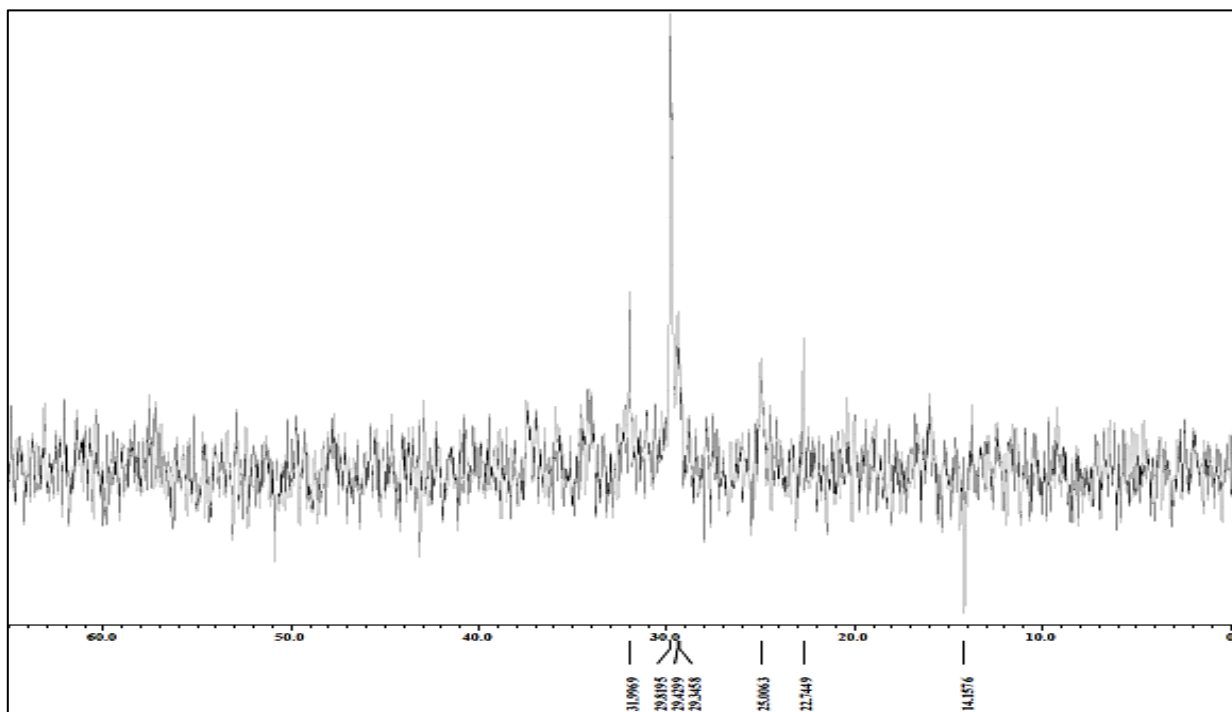
Posición H	δ_{H} [CDCl_3] (int, mult., J en Hz) ref. ^[38]	δ_{H} [CDCl_3] (int, mult., J en Hz) exp.
1	4,23 (2H, m)	3,47 (2H, m)
2	3,90 (1H, m)	3,62 (1H, m)
3 a	3,60 (1H, m)	3,69 (2H, m)
3b	3,70 (1H, m)	
2'-2''	2,35 (2H, t, 6,5)	2,28 (2H, m)
3'-3''	1,65 (2H, m)	1,53-1,56 (2H, m)
(4-15)'-(4-15)''	1,30 (24H, m)	1,24 (10H, m)
16'-16''	0,90 (3H, t, 5,0)	0,86 (3H, t, 6,42)

Tabla 29. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **VI**.

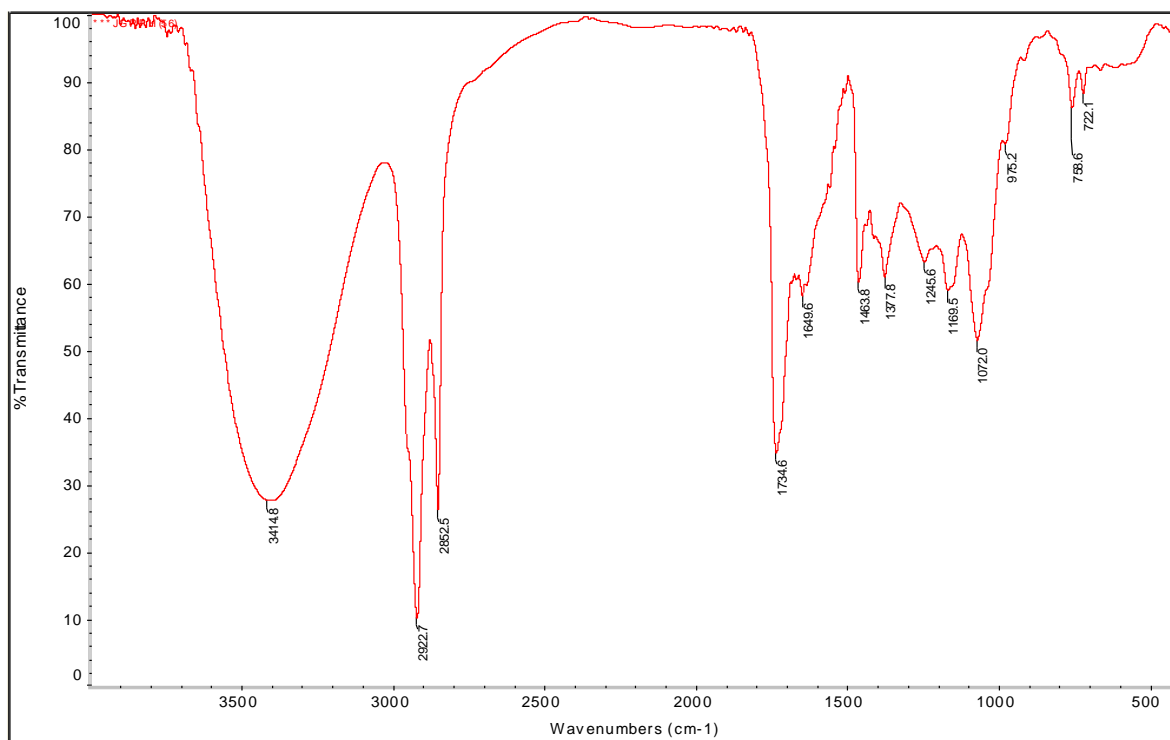
Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ref. ^[38]	δ_{C} [CDCl_3] (<i>mult.</i>) ^a exp.
1	65,4 (CH_2)	-
2	70,5 (CH)	-
3	63,4 (CH_2)	-
1'	174,5 (C)	173,7 (C)
2'	34,2 (CH_2)	-
3'	25,0 (CH_2)	25,0 (CH_2)
(4-13)'	30,0 (CH_2)	29,3-29,8 (CH_2)
14'	32,1 (CH_2)	32,0 (CH_2)
15'	22,7 (CH_2)	22,0 (CH_2)
16'	14,0 (CH_3)	14,0 (CH_3)

^a Multiplicidad asignada mediante DEPT 135

Espectro 6.1 de ^1H , (0-8) ppm para el compuesto VIEspectro 6.2 de ^{13}C , zona (0-200) ppm para el compuesto VI

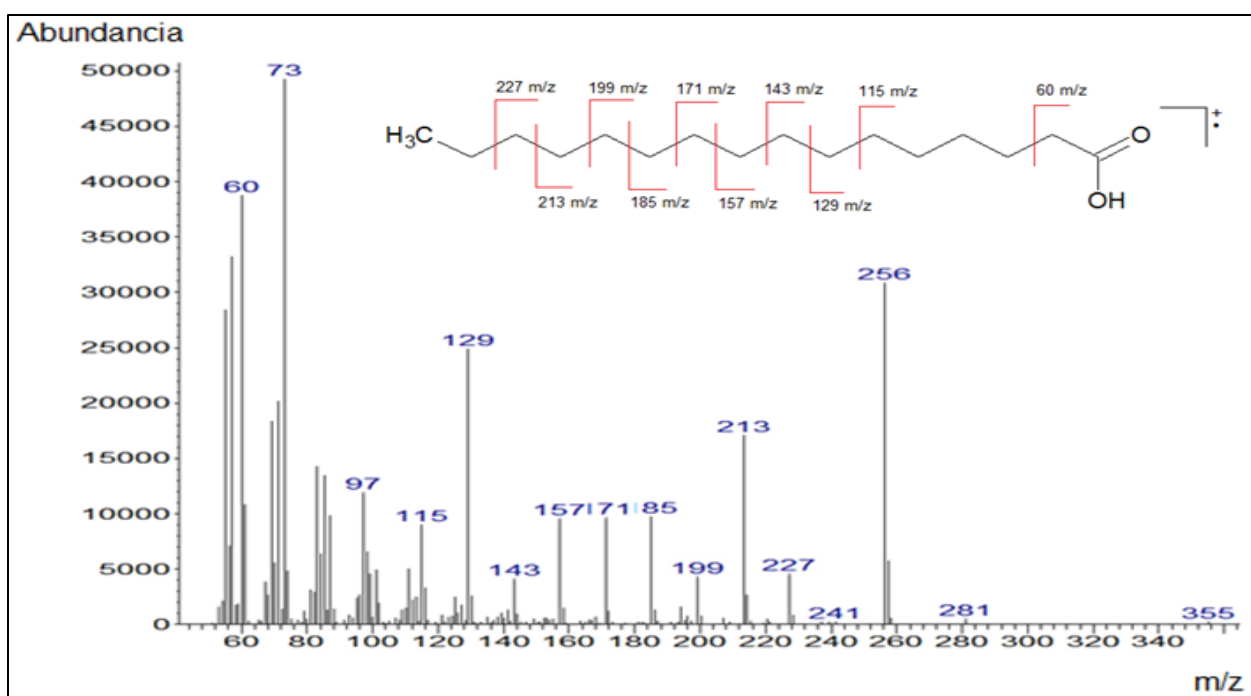


Espectro 6.3 DEPT 135, (0-60) ppm para el compuesto VI

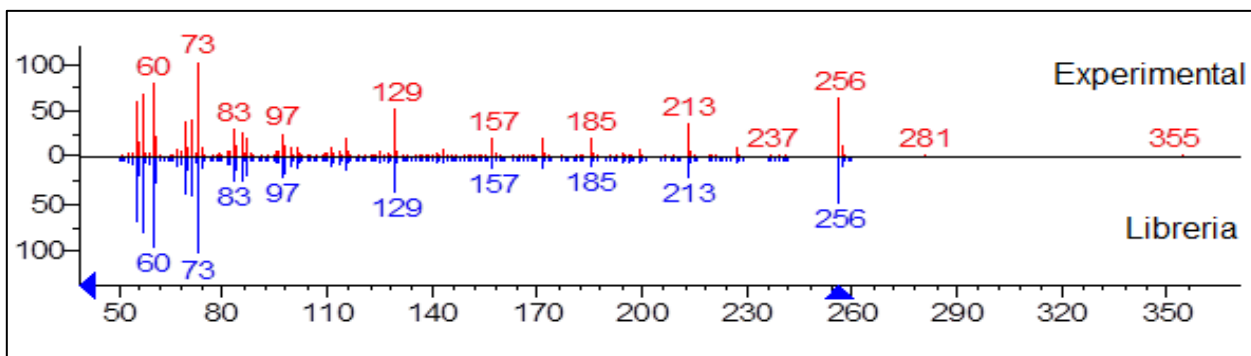


Espectro 6.4 de Infrarrojo para el compuesto VI

En el análisis del espectro 6.4 de infrarrojo, se observa una banda ancha e intensa, en $3414,8\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento O-H. Luego se observa un par de bandas agudas e intensas en $2922,7$ y $2852,5\text{ cm}^{-1}$ perteneciente a los estiramientos C-H de los Csp_3 . Banda aguda en $1734,6\text{ cm}^{-1}$ del estiramiento C=O del éster alifático y la banda más intensa en la zona de la huella dactilar $1072,0\text{ cm}^{-1}$, pertenece al enlace C-O en la molécula.



Espectro 6.5 de Masas para el compuesto VI

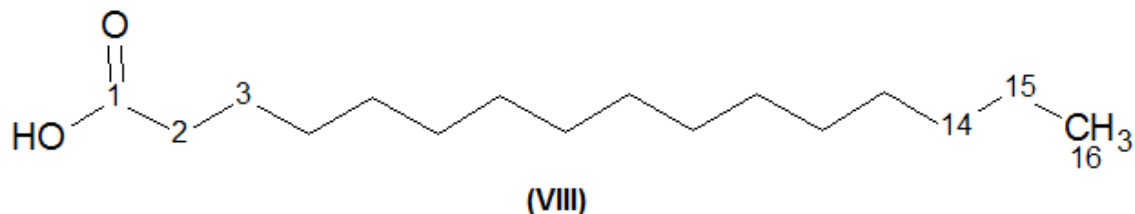


Espectro 6.6 de Masas para el compuesto VI comparado con la librería NIST

En el espectro de masas 6.5 y 6.6, mediante la técnica de impacto electrónico presento un M^+ de 256 uma y pico base de m/z 73 uma. La correlación realizada con la librería NIST, permitió la identificación de la cadena alifática saturada, para un ácido graso C16:0 identificado como ácido palmítico, correspondiente a una fórmula molecular de $C_{16}H_{32}O_2$. Estos datos sumados a los espectros de 1H , ^{13}C y DEPT 135 permitió la caracterización del compuesto **VI** como un glicolípido identificado: 1-palmitil-glicerol.

Los glicolípidos (compuestos **I-VI**) aislados son de gran importancia ya que diversas investigaciones demuestran la aplicabilidad de estos, en la bioremediación de los suelos contaminados, por compuestos químicos derivados de los hidrocarburos. ^[50] Además, los glicolípidos aislados en esta investigación, están clasificados como biosulfactantes. Estos poseen diversas propiedades físico-químicas que le permiten la formación y estabilización de emulsiones. Poseen ventajas sobre sus homólogos sintéticos, ya que son altamente biodegradables, poseen digestibilidad, baja toxicidad, son solubilizantes, humectantes, espumantes y anti adhesivos, siendo de gran valor para la industria alimenticia. ^{[51],[52]}

III. 7 Elucidación del compuesto VIII: Ácido palmítico



El compuesto **VIII** es un sólido blanco, soluble en CHCl_3 , aislado de las especies: *P. capitatus*, *P. lamourouxii* y *P. pyriformis* del extracto de CH_2Cl_2 . Los compuestos fueron comparados mediante CCF y eluidos en CH_2Cl_2 con un patrón puro de ácido palmítico ($R_f = 0,42$), observando igual frente de retención: *P. capitatus* ($R_f = 0,40$), *P. lamourouxii* ($R_f = 0,41$) y *P. pyriformis* ($R_f = 0,41$), por lo que se evidencia que podría tratarse del mismo compuesto. Por lo tanto, se estudió el compuesto VIII aislado del alga *P. capitatus* por poseer mayor masa. Los espectros de RMN (CDCl_3) de ^1H (Espectro 7.1) y ^{13}C (Espectro 7.2) conjuntamente con el DEPT 135 (Espectro 7.3), permitió la asignación de 3 grupos de señales en las tablas 30 y 31 que fueron comparados con lo citado en la literatura. ^[53]

Desplazamientos observados a campo alto ($\delta_c 14,2$), evidencia metilo terminal de la cadena alifática, mostrando un triplete que integra para 3 protones ($\delta_H 0,87$). Este metilo se encuentra enlazado a un grupo de metilenos ($\delta_c 22,9$; $\delta_c 32,0$; $\delta_c 29,1-29,7$) pertenecientes a la cadena alifática saturada, observándose así un multiplete en campo alto que integra para 22 protones ($\delta_H 1,23-1,30$). Finalmente, se observa un metileno en ($\delta_c 34,0$) y un triplete que integra para 2 protones ($\delta_H 2,36-2,30$) característico de metilenos desapantallados que se encuentra enlazado a un carbonilo del tipo carboxílico con desplazamiento a campo bajo ($\delta_c 179,2$).

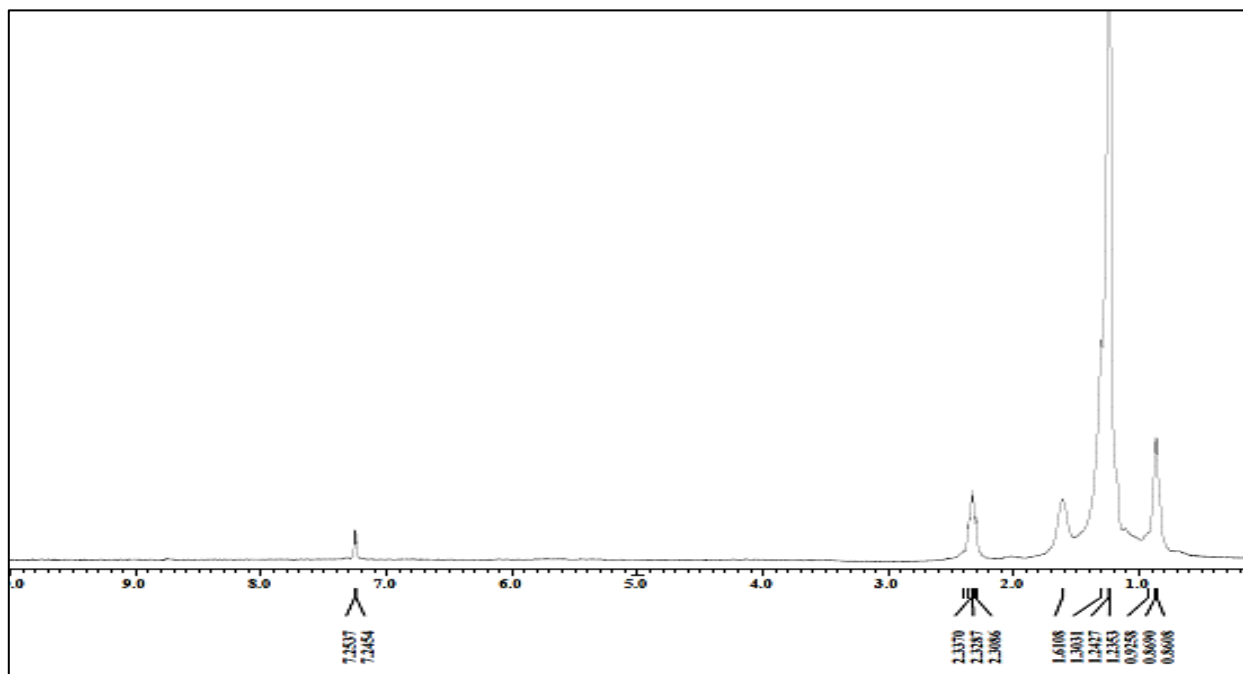
Tabla 30. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^1H para el compuesto **VIII**.

.Posición H	δ_{H} [CDCl_3] (Int., mult., J en Hz) ref. ^[53]	δ_{H} [CDCl_3] (Int., mult., J en Hz) exp.
2	2,29	2,36-2,30 (2H, m)
3	1,67	1,61 (2H, m)
4-15	1,43	1,23-1,30 (22H, m)
16	1,01	0,87 (3H, t, 6,42)

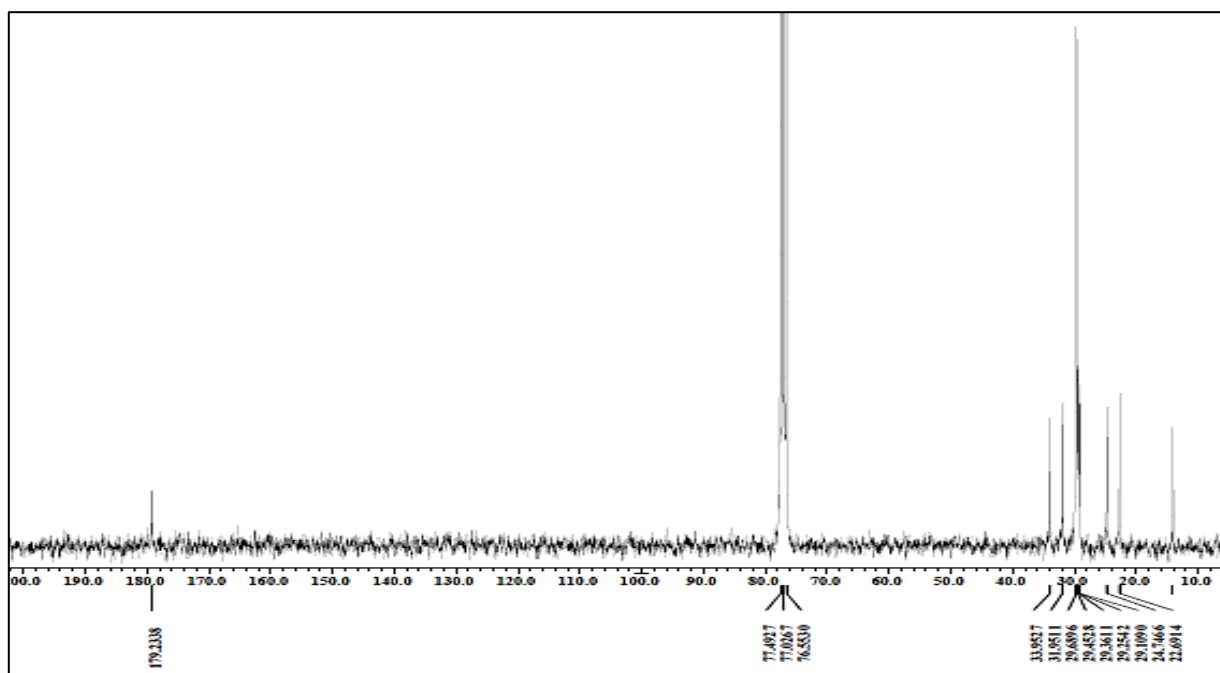
Tabla 31. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para los compuesto **VIII**.

Posición C	δ_{C} [CDCl_3] (mult) ref. ^[53]	δ_{C} [CDCl_3] (mult)^a exp.
1	186,1 (C)	179,2 (C)
2	40,7 (CH_2)	34,0 (CH_2)
3	29,1 (CH_2)	24,7 (CH_2)
4-13	32,7 (CH_2)	29,1-29,7 (CH_2)
14	34,7 (CH_2)	32,0 (CH_2)
15	25,3 (CH_2)	22,7 (CH_2)
16	16,5 (CH_3)	14,2 (CH_3)

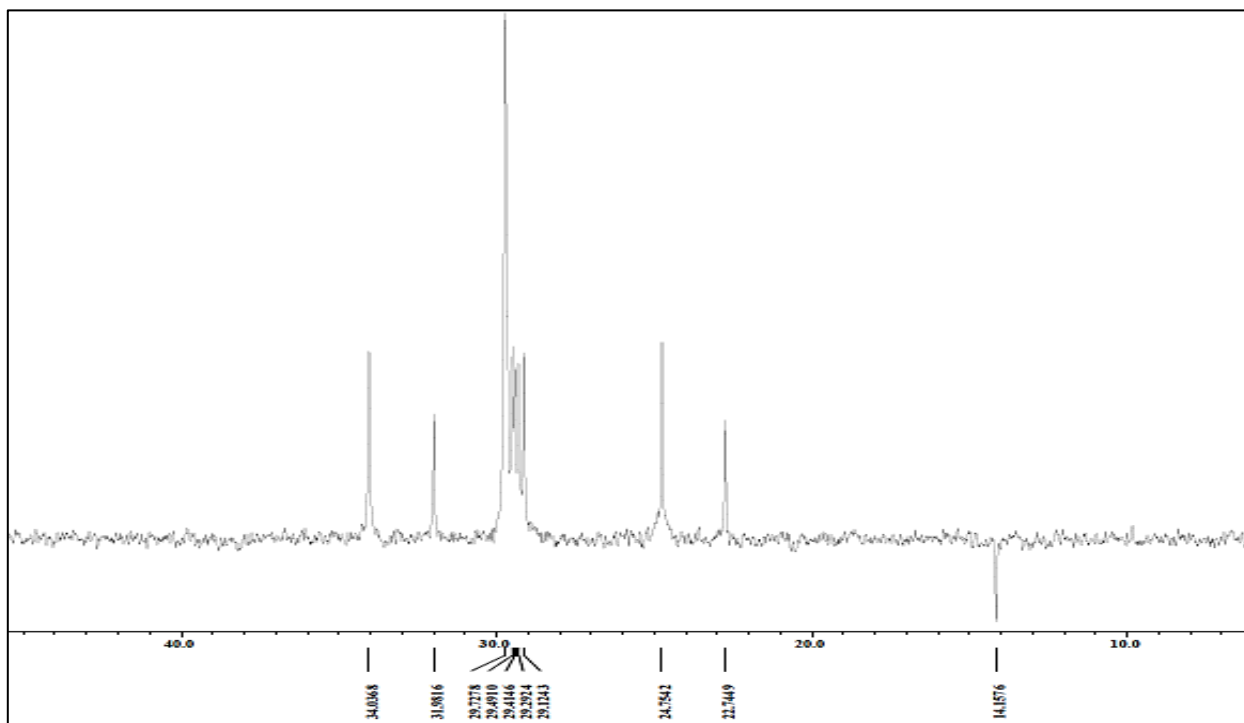
^aMultiplicidad asignada mediante DEPT 135.



Espectro 7.1 de ¹H, zona (0-10) ppm para los compuestos **VIII**



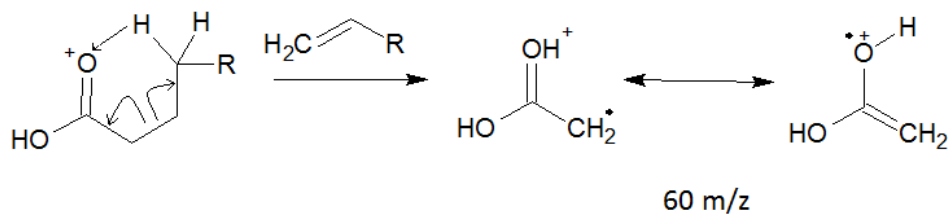
Espectro 7.2 de ¹³C, (0-200) ppm para los compuestos **VIII**

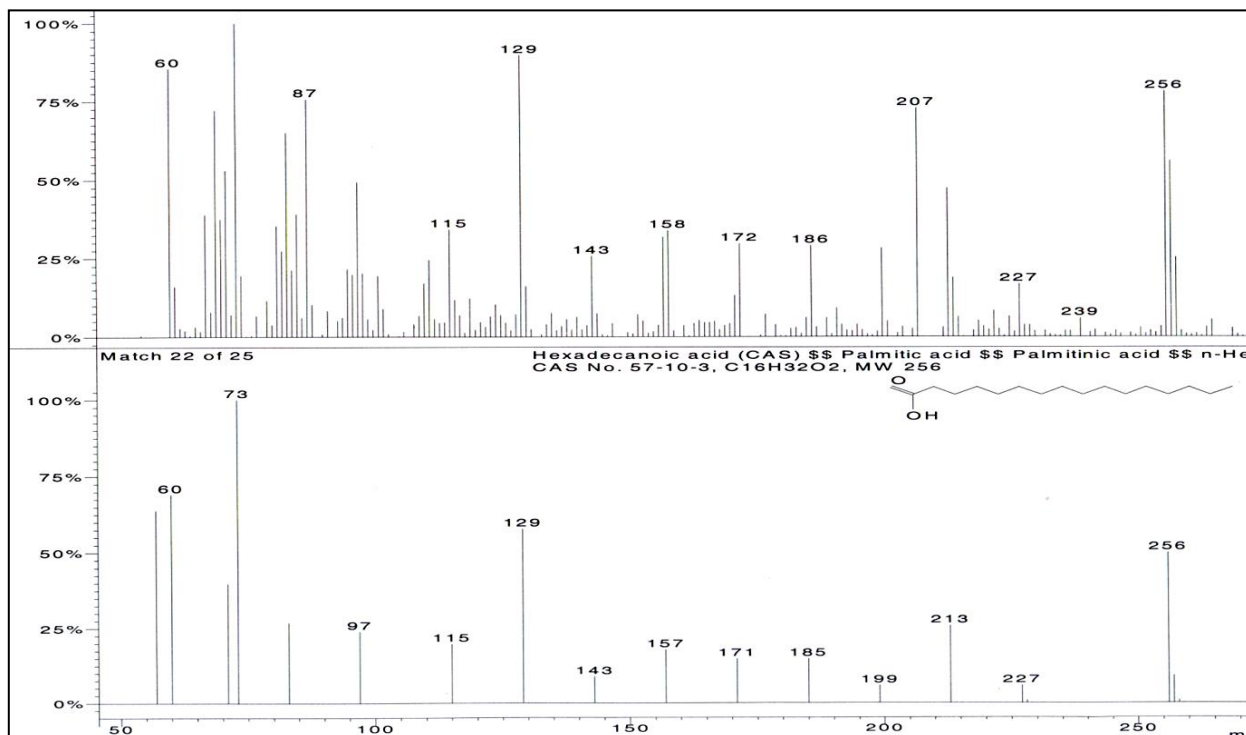


Espectro 7.3 de DEPT 135, (0-90) ppm para el compuesto **VIII**

En el espectro 7.4 de masas, mediante la técnica de impacto electrónico presento un M^+ de 256 uma con un 80% de intensidad, un pico base de m/z 73 y un pico de m/z 60 uma, correspondiente al arreglo de McLafferty. Además, se observó las pérdidas típicas de m/z 14 uma para cadenas alifáticas saturadas. El compuesto VIII muestra fórmula molecular de $C_{16}H_{32}O_2$ señalando una insaturación en la estructura. Estos datos sumados a los espectros de 1H y ^{13}C permitieron caracterizar al compuesto como un ácido graso identificado como: ácido hexadecanoico.

Arreglo de McLafferty





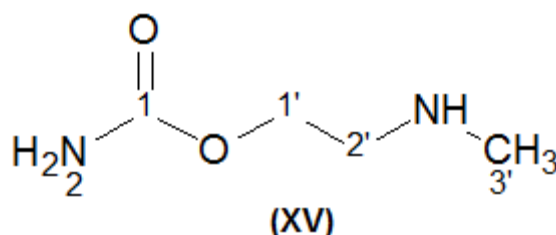
Espectro 7.4 de Masas para el compuesto **VIII**

El ácido palmítico ha sido aislado en otros estudios de la especie *Penicillus dumetosus*, junto con otra variedad de ácidos grasos poliinsaturados como: el ácido palmitoleico (C16:1), el ácido oleico (C18:1), omega-3 y omega-6. Estos extractos fueron ensayados a distintas concentraciones sobre 4 líneas celulares de cáncer: carcinoma cervical (SiHa), carcinoma cervico-uterino (HeLa), carcinoma epidermoide cepa humana (Hep-2) y células carcinoma nasofríngeo (KB) mostrando actividad anti proliferativa y apoptosis inducida. [54]

De igual forma, el ácido palmítico ha sido aislado de la planta *Pentanisia prunelloides*, mostrando actividad antibacterial contra las bacterias Gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y las bacterias Gram-negativa: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. [55]

Este metabolito también ha sido aislado del alga roja *Amphiroa zonata*, donde a concentraciones de 50 ppm, muestra toxicidad selectiva causando apoptosis en células leucémicas humanas de la línea MOLT-4, pero no muestra citotoxicidad en células humanas de fibroblastos dérmicos *in vitro*. Además, el ácido palmítico afecta en las células tumorales el ADN topoisomerasa I, sin embargo, de manera interesante, que no afecta a ADN topoisomerasa II, lo que sugiere que el ácido palmítico puede ser un compuesto líder de medicamentos contra el cáncer. ^[56]

III.8 Elucidación del compuesto **XV** del alga *P. pyriformis* (JGPPM): N-metiletilcarbamato.



El compuesto **XV** es un sólido laminar de colores blanco y beige, soluble en solvente polares como: H₂O, MeOH y DMSO. El análisis de los espectros RMN (MeOD) de ¹H (Espectro 8.1 y 8.2) y ¹³C junto al DEPT 135 (Espectro 8.3 y 8.4) permitió la asignación de señales en las tablas 32 y 33, que fueron comparados con un sólido aislado con similares características del alga *Penicillus capitatus*, extraído del extracto hidro-metanólico, identificado como un amino éster, trabajo de investigación realizado en el laboratorio de Síntesis y Productos Naturales Marinos (356), de la Escuela de Química de Facultad de Ciencias, UCV (Herrera, 2009).^[22]

Los desplazamientos para metilenos (δ_C 55,4, δ_H 3,51 y δ_C 46,6, δ_H 3,21) C-1' y C-2' respectivamente, se encuentran desapantallados por heteroátomos que carecen de protones para acoplarse. Se plantea un sistema X-CH₂CH₂-Y, donde X y Y indica distintos heteroátomos.

El carbono C-1' es vecino a un átomo de oxígeno mientras el C-2' esta enlazado a un átomo de nitrógeno. ^[39] ^[57] Los protones enlazados a los carbonos C-1' y C-2', se observan como un par de tripletes que se encuentran acoplados entre sí, lo que pone en evidencia el sistema X-CH₂CH₂-Y ideado. El metilo (δ_C 43,9, δ_H 2,93) desapantallado se encuentra unido a un átomo de nitrógeno, correspondiente al carbono C-3. El protón en campo bajo (δ_H 8,42), indica la presencia de carbonilo del tipo derivado de ácido carboxílico, planteándose presencia de amida primaria.

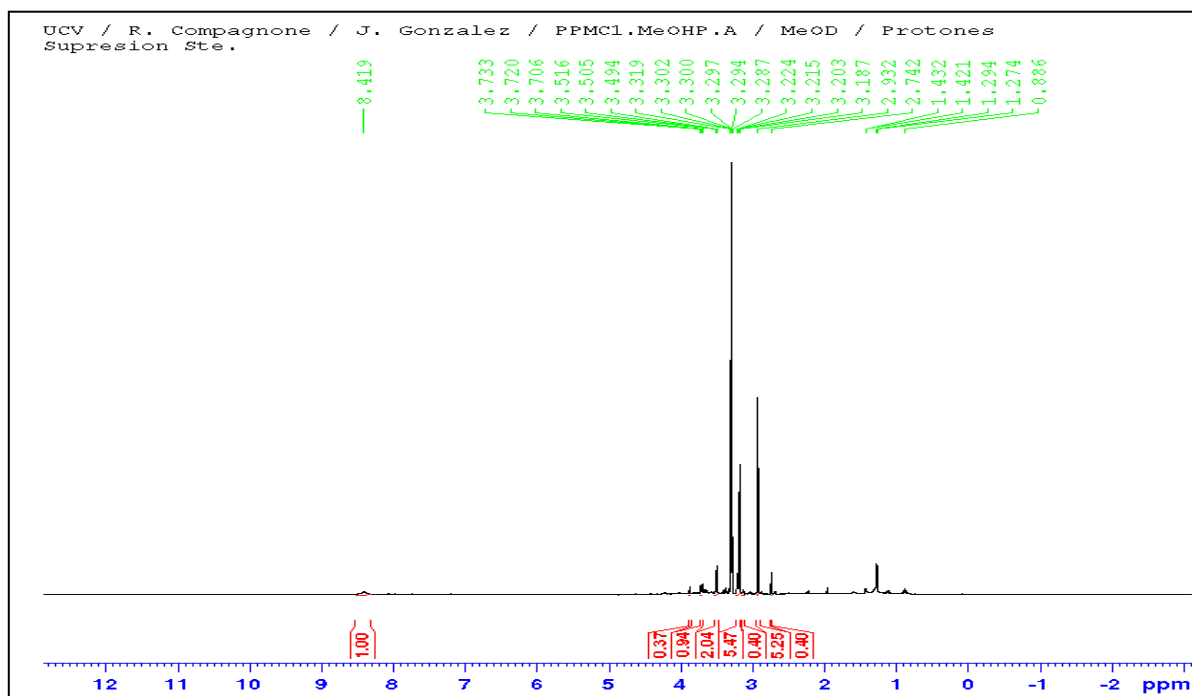
Tabla 32. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ¹H para el compuesto **XV** del alga *P. pyriformis* (JGPPM).

Posición H	δ_H [MeOD]	δ_H [MeOD]
	(Int., mult., J en Hz) ref. ^[22]	(Int., mult., J en Hz) exp.
2	1,91 (3H, s)	8,42 (1H, s)
1'	3,44 (2H, t, 6,97)	3,51 (2H, t, 5,70)
2'	3,25 (2H, t, 7,34)	3,21 (2H, t, 6,60)
3'	2,81 (3H, s)	2,93 (3H, s)

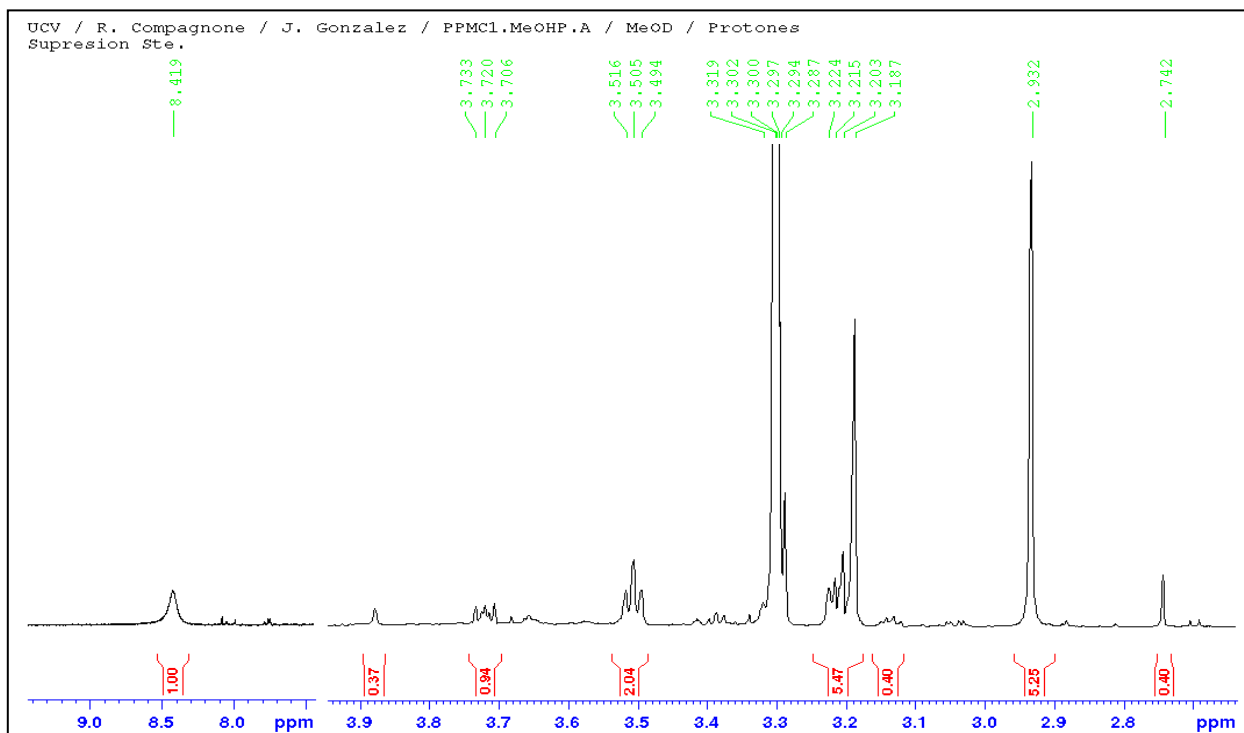
Tabla 33. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **XV** del alga *P. pyriformis* (JGPPM).

Posición C	δ_{C} [MeOD] (mult) ref. ^[22]	δ_{C} [MeOD] (mult) ^a exp.
1	179,7 (C)	-
2	22,6 (CH ₃)	-
1'	54,1 (CH ₂)	55,4 (CH ₂)
2'	46,0 (CH ₂)	46,6 (CH ₂)
3'	42,9 (CH ₃)	43,9 (CH ₃)

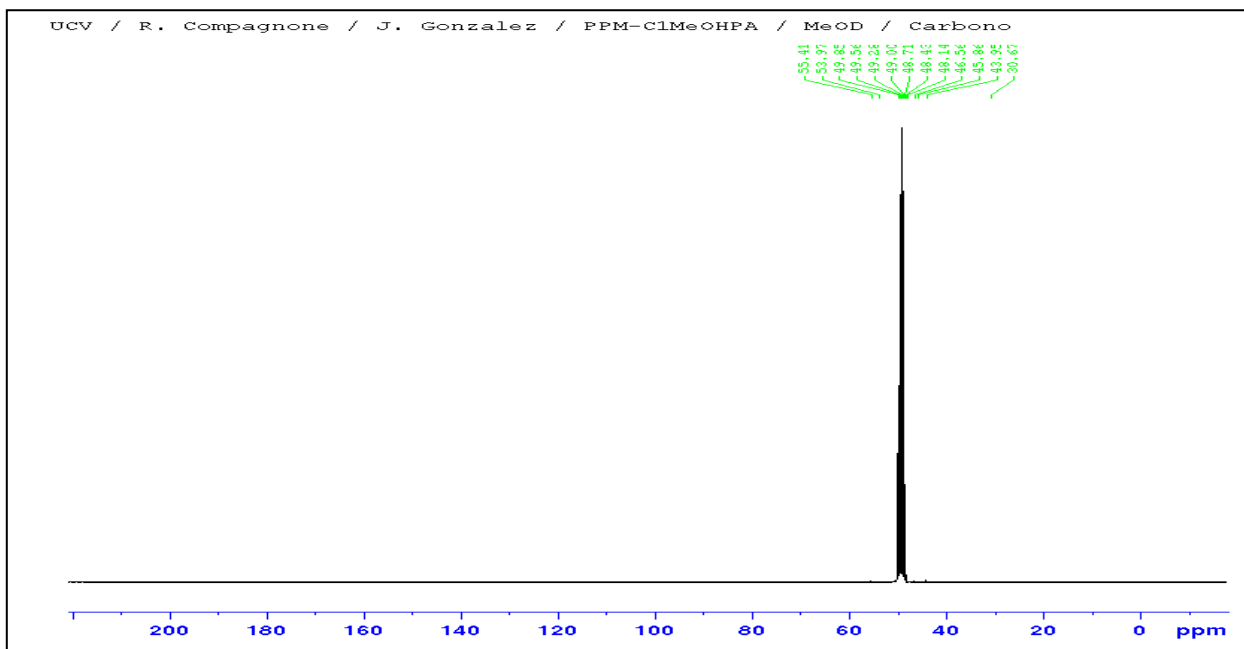
^aMultiplicidad asignada mediante DEPT 135



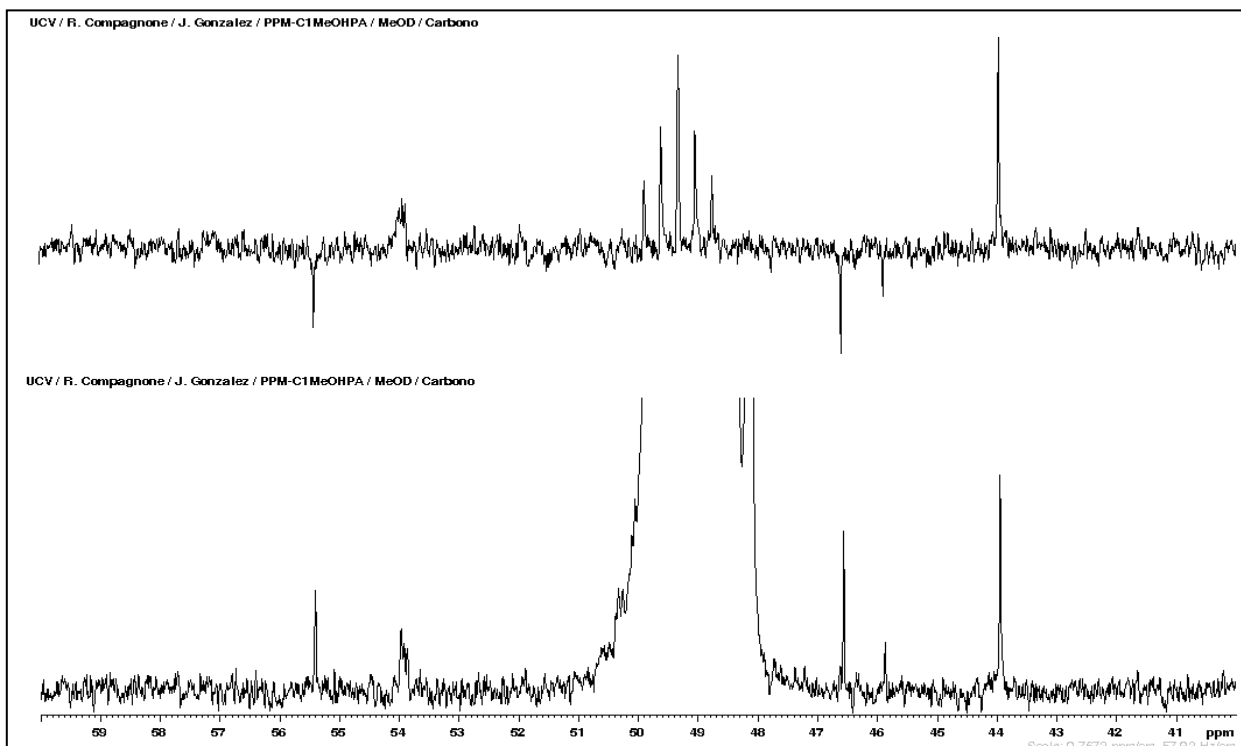
Espectro 8.1 de ^1H , (0-12) ppm para el compuesto **XV** del alga *P. pyriformis*.



Espectro 8.2 de ^1H , (2,70-9,0) ppm para el compuesto **XV** del alga *P. pyriformis*.



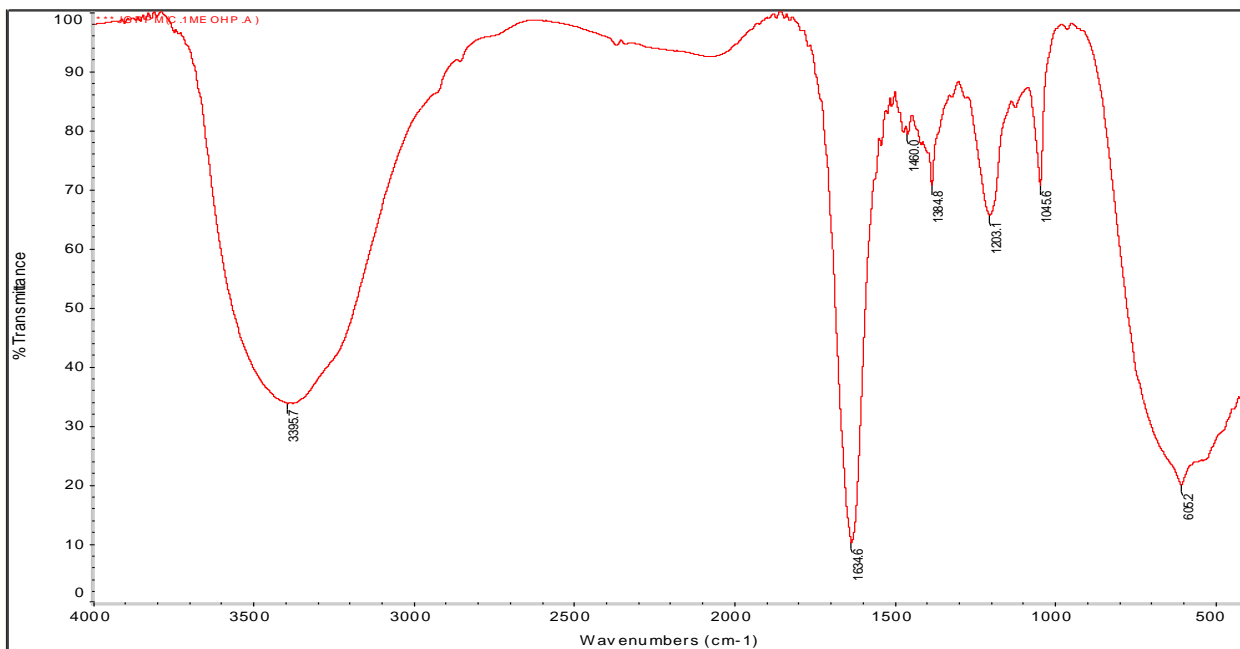
Espectro 8.3 de ^{13}C , (200-0) ppm para el compuesto **XV** del alga *P. pyriformis*.



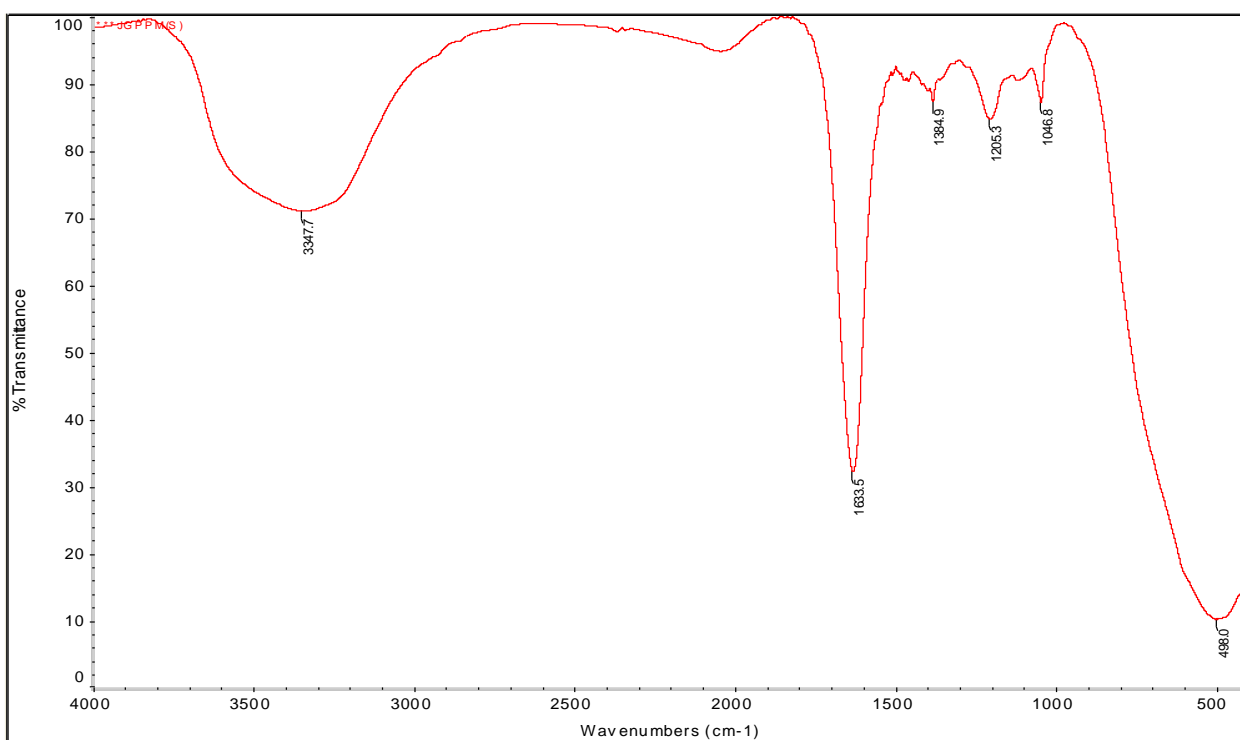
Espectro 8.4 comparación ^{13}C y DEPT 135, (40-60) ppm para la compuesto **XV** del alga *P. pyriformis*.

En el espectro 8.5 de infrarrojo, se observa una banda ancha de intensidad media, correspondiente al estiramiento simétrico N-H en 3395 cm^{-1} . Una banda aguda e intensa en 1634 cm^{-1} correspondiente a la vibración del enlace C=O de una amida primaria de cadena abierta. Luego se observa una banda aguda poco intensa en 1203 cm^{-1} de la flexión N-H interaccionando con el alargamiento C-N. En la zona de la huella dactilar, una banda ancha e intensa de la flexión fuera del plano del enlace N-H.

Se establece una comparación entre los espectros 8.5 y 8.6 de infrarrojo, para el compuesto purificado y sin purificar respectivamente, observando similitud en las bandas, lo que permite decir que se trata del mismo compuesto. Por lo tanto, la purificación mediante cromatografía de fase reversa no fue efectiva.



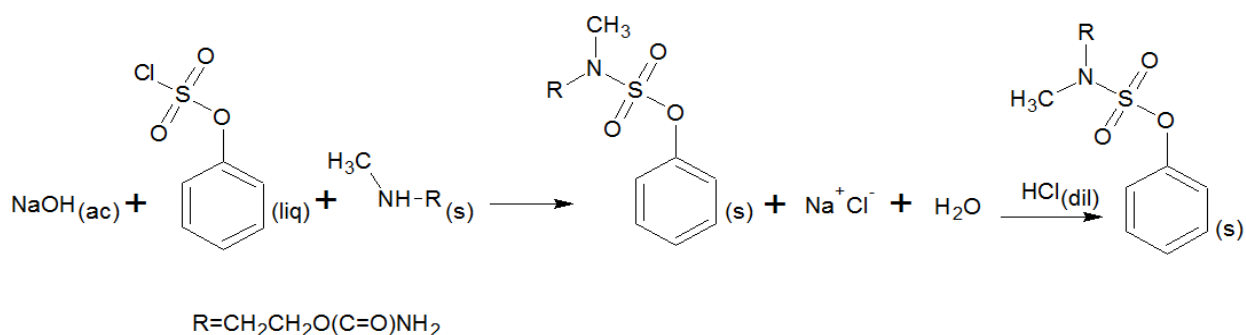
Espectro 8.5 de Infrarrojo para el compuesto **XV** purificado del alga *P. pyriformis*.



Espectro 8.6 de Infrarrojo para el compuesto **XV** sin purificar del alga *P. pyriformis*.

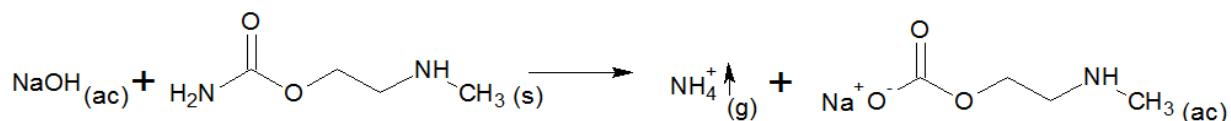
Los ensayos húmedos para establecer presencia de amida y amina en la molécula, mostraron resultados positivos. La prueba de Hinsberg fue positiva para aminas secundarias como se muestra en la reacción 1, donde ocurre el ataque nucleofílico del nitrógeno sobre el azufre, formándose un sólido que fue ensayado con gotas de HCl 10 %, hasta llevar la reacción a pH ácido, resultando que el sólido no fue soluble. [58]

Reacción 1.

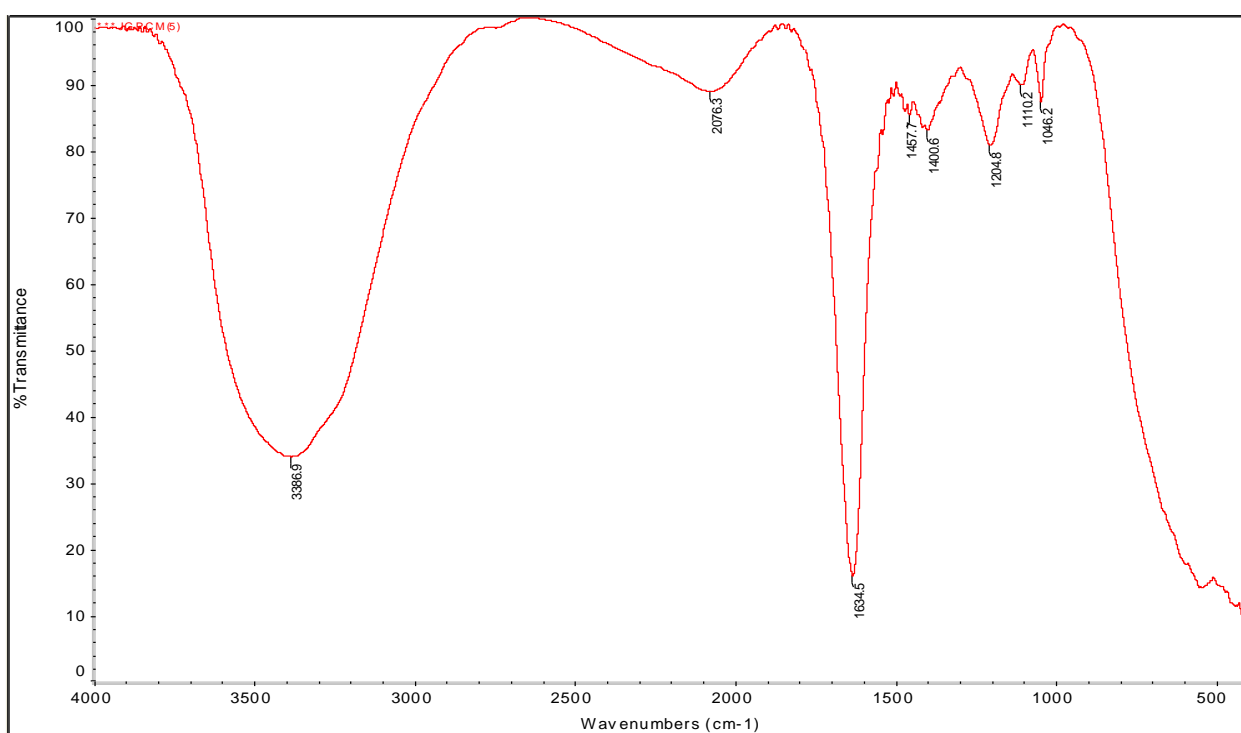


La hidrólisis en medio básico a temperatura ambiente, como se muestra en la reacción 2, generó la liberación de amoníaco en forma gaseosa, por el ataque nucleofílico del oxígeno sobre el acilo, que fue detectado por el cambio de coloración en el papel pH, indicando la presencia de una amida primaria. Por lo tanto, los ensayos de amida y amina que resultaron positivos sustentan la estructura propuesta para el compuesto **XV**. [58]

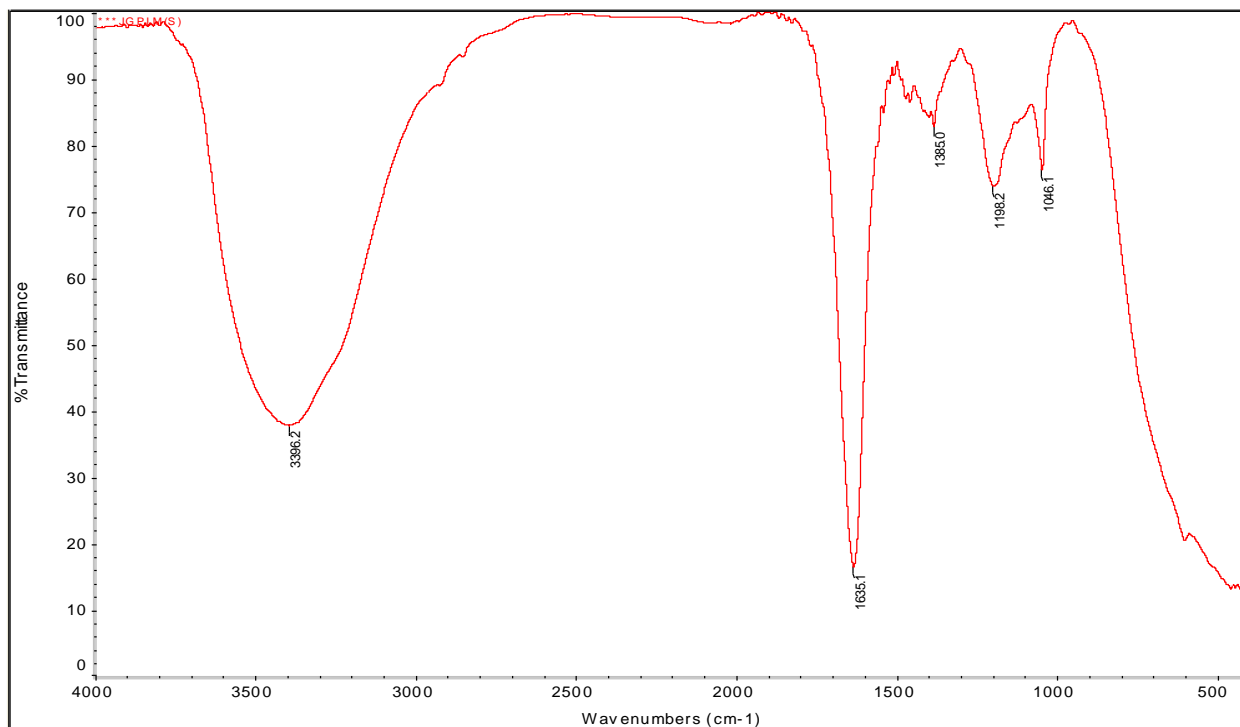
Reacción 2.



La estructura propuesta para el compuesto **XV**, fue comparada mediante espectrometría de infrarrojo, con los sólidos precipitados de las especies: *P. pyriformis* (JGPPM), compuesto **XV**, *P. capitatus* (JGPCM) compuesto **XV** y *P. lamourouxii* (JGPLM) compuesto **XV** que no fueron purificados (Espectros 8.6, 9.1 y 9.2 respectivamente), se observó similitud en las bandas del espectros, por lo tanto, se deduce que se trata del mismo compuesto.

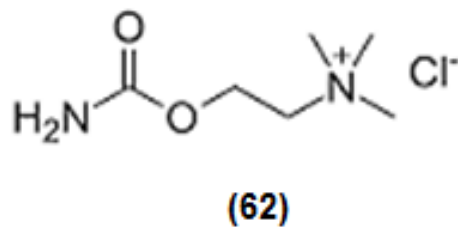


Espectro 9.1 de Infrarrojo para el compuesto **XV** sin purificar del alga *P. capitatus*.



Espectro 9.2 de Infrarrojo para el compuesto **XV** sin purificar del alga *P. lamourouxii*.

Una revisión echa en la literatura, no se encontró que este compuesto haya sido aislado en productos naturales, pero se encontró un compuesto similar al propuesto, llamado carbamilcolina (**62**), que difiere en la incorporación de 2 metilos más sobre la amina, convirtiéndola en una amina cuaternaria. La carbamilcolina es utilizada en oftalmología para el tratamiento de glaucoma, en intervenciones quirúrgicas, entre otros. ^[59]



III.9 Análisis quimiotaconómico

La presencia de glicolípidos polares (I, III, IV, VI) de cadenas saturadas e insaturadas, el sulfoquinovosil diacil glicerol (SQDG) (II) y el ácido graso saturado (VIII), aislados de las especies *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii* y *Penicillus pyriformis*, revelan un perfil ficoquímico común en las algas marinas. Los ácidos grasos han demostrado tener relación quimiotaconómica dentro de los diferentes filos, permitiendo diferenciar macroalgas en distintos niveles taxonómicos. ^[60] ^[61] En las tablas 34 y 35, se muestra el alcance filogénico de los glicolípidos aislados y del ácido palmítico, respectivamente; donde se muestran las especies de algas marinas de donde se ha aislado dichos compuestos y que además comparten las distintas clasificaciones según el género, familia, orden, clase y phylum, respecto a las algas del género *Penicillus* estudiadas.

Tabla 34. Alcance filogénico de los glicolípidos aislados. ^[22], ^[62], ^[63], ^[64], ^[65]

	Clasificación	Especie
Phylum	<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>
	<i>Chlorophyta</i>	<i>Entocladia viridis</i>
Clase	<i>Ulvophyceae</i>	<i>Ulva lactuca</i>
Orden	<i>Bryopsiales</i>	<i>Codium tomentosum</i>
Familia	<i>Udoteaceae</i>	<i>Avrainvillea nigricans</i>
Género	<i>Penicillus</i>	<i>Penicillus capitatus</i>

Tabla 35. Alcance filogénico del ácido palmítico aislado. [62], [63], [64], [66], [67]

	Clasificación	Especie
	<i>Heterokontophyta</i>	<i>Dictyota ciliolata</i>
Phylum	<i>Rhodophyta</i>	<i>Gracilaria dendroides</i>
	<i>Chlorophyta</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Clase	<i>Ulvophyceae</i>	<i>Ulva reticulata</i>
Orden	<i>Bryopsiales</i>	<i>Caulerpa occidentalis</i>
Familia	<i>Udoteaceae</i>	<i>Udotea Flabellum</i>
Género	<i>Penicillus</i>	<i>Penicillus dumetous</i>

Como resultado del análisis de las tablas 34 y 35, se tiene que los metabolitos aislados en esta investigación (los glicolípidos y el ácido palmítico C16:0), son considerados como marcadores quimiotaxonómicos para las especies del género *Penicillus* estudiadas. Mostrando además que estos marcadores poseen un alcance filogénico a todos los niveles taxonómicos para las algas marinas. El sulfoquinovosil diacil glicerol, se considera un marcador quimiotaxonómico para la especie *P. capitatus*.

III.10 Elucidación de los compuestos VII, IX, X, XI, XII, XIII y XIV.

Los compuestos aislados: **VII, IX, X, XI, XII, XIII y XIV**, se encuentran en proceso de análisis de espectroscopia de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT y espectrometría de masas e infrarrojo.

IV. CONCLUSIONES

- Se extrajeron 15 compuestos de los cuales, los compuestos **(I-VI, VIII)** son compuestos que pueden contribuir a la caracterización de las especies estudiadas del género *Penicillus*; mientras el resto de los compuestos se encuentran en proceso de identificación.
- Se aisló e identificó del extracto de hexano:
 - Del alga *Penicillus capitatus*: el compuesto **(I)**, un glicolípido de cadena saturada y el compuesto **(II)**, un sulfoquinovosil diacil glicerol.
 - Del alga *Penicillus lamourouxii*: los compuestos **(III y IV)**, dos glicolípidos de cadenas insaturadas y saturadas respectivamente.
 - Del alga *Penicillus pyriformis*: el compuesto **(V y VI)**, dos glicolípidos de cadena insaturada y saturada, respectivamente.
- Se aisló e identificó del extracto de CH₂Cl₂ el compuesto **(VIII)**, el ácido palmítico común en las especies estudiadas del género *Penicillus*.
- Se aisló e identificó del extracto hidro-metanólico el compuesto **(XV)**, compuesto propuesto del tipo amino carbamato, común para las especies estudiadas del género *Penicillus*.
- Se establece como marcadores quimiotaxonómicos para las especies del género *Penicillus*: los glicolípidos **(I, III, IV, V y VI)**, el ácido palmítico **(VIII)**.
- Se establece como marcador quimiotaxonómico el sulfoquinovosil diacil glicerol **(II)**, para la especie *P. capitatus*.

V. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio genético (análisis de PCR), ya que podría complementar el estudio quimiotaxonómico a las especies del género *Penicillus* (*capitatus*, *lamourouxii* y *pyriformis*) realizado en esta investigación.
- Realizar un estudio ficoquímico, partiendo con mayor cantidad de material algal, facilitaría el aislamiento de los compuestos mayoritarios.
- Antes de proceder al aislamiento de los metabolitos mayoritarios de los extractos de hexano y diclorometano, someterlos a una columna de carbón activado y celita, para separar las clorofilas presentes del resto del extracto, facilitando el aislamiento de los compuestos metabolitos secundarios que se encuentren en estos. ^[64]

VI. - BIBLIOGRAFÍA

- [1]Blunt, J.; Copp, B.; Hu, W.P.; Munro, M.; Northcote, P. y Prinsep, M. 2008. "Marine natural products". **R.S.C.**, 25: 35-94.
- [2]Curtis, H.; Schnek, A. 2008. **Biología**, Santiago de Chile, Chile, Editorial Medica Panamericana, 7^{ma} Edición, p. 1160.
- [3]Choi, H.; Pereira, A.; Gerwick, W. 2012. **Handbook of Marine Natural Products** (The Chemistry of Marine Algae and Cyanobacteria), San Diego, CA, USA, Springer, p. 55-152.
- [4]Barsanti, L.;Gualtieri, P. 2014. **Algae** (Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology), Boca Raton, FL, U.S.A., CRC Group Taylor & Francis Group, 2^{da} Edición, p. 361.
- [5]Rogers, K. 2011. **Fungi, algae and protists**. New York, USA. Encyclopeadia Britannica, p. 147-180.
- [6]Li,Y.; Ghasemi, F.; Garg, S.; Adarme-Vega, T.; Thurecht, K.; Ghafor, W.; Tannock, S.; Schenk, P. 2014. "A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research", **Microb. Cell Fact**, 13:14.
- [7]Smit, A. 2004. "Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products", **J. Appl. Phycol.**, 16: 245-262.
- [8]Edge, S. 2000. **Química Orgánica** (Estructura y Reactividad), Barcelona, España, Editorial Reverté, Tomo 2, p. 1178-1179.
- [9]Allinger, N. 1984. **Química Orgánica**, Barcelona, España, Editorial Reverté, 2^{da} Edición, p. 1080-1081.
- [10]Castells, X. 2012. **Reciclaje de residuos industriales** (Aprovechamiento de residuos agrícolas y forestales), Madrid, España, Ediciones Dias de Santos, p. 783.

- [11]Amsler, C. 2008. **Algal Chemical Ecology**. Alemania. Editorial Springer, p. 313.
- [12]Guiry, M.D.; Guiry, G.M. 2015. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; 13 May 2015.
- [13]Paul, V.; Fenical, W. 1987. "Natural Products Chemistry and Chemical Defense in Tropical Marine Algae of the Phylum Chlorophyta", **Bio-organic Marine Chemistry**, 1:1-27
- [14]Wynne, M. 2011. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic**, Stuttgart, Alemania, 3^{er} Edición, p. 166.
- [15]Vera, B.; Ardito, S. 1997. "Catálogo de las algas marinas del herbario nacional de Venezuela", **Acta Bot. Venez.**, Venezuela, Fundación Instituto Botánico de Venezuela, 20(2):25-108.
- [16]Brito, A.; Vera, B.; Ardito, S.; Farci, G. 2012. "*Penicillus dumentosus* (lamouroux) blainville f. *expansus* borgesén y *penicillus lamourouxii* decaisne (Chlorophyta, Udoteaceae) nuevos registros para la costa Venezolana", *Acta Científica Venezolana*, 63:1-4.
- [17]Borgesén, F. 1911. **The marine Algae of the Danish West Indies** (Chlorophyceae and Phaeophyceae), Copenhagen, Dinamarca, Bianco Luno, p. 228.
- [18]Cabrera, R.; Alfonso, Y. 2010. "Notas sobre el género *Penicillus*, (Udoteaceae, Chlorophyta) para Cuba", **Revista Jard. Bot. Nac.**, Cuba, 30-31: 239-244.
- [19]Pluglisi, M.; Tong, L.; Jensen, P.; Fenical, W. 2004. "Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thallasiae*", **Tetrahedron**, 60:7035-7039.
- [20]Li, X.; Jacob, M.; Ding, Y.; Agarwal, A.; Smillie, T.; Khan, S.; Nagle, D.; Ferreira, D.; Clark, A. 2006. "Capisterones A and B, which Enhance Fluconazole Activity in

Saccharomyces cerevisiae, from the Marine Green Alga *Penicillus capitatus*", **J. Nat. Prod.**, 69 (4):542-546.

[21]Paul, V.; Fenical, W. 1984. "Bioactive terpenoids from Caribbean marine algae of the genera *Penicillus* and *Udotea* (Chlorophyta)", **Tetrahedron**, 40(15):2913-2918.

[22]Herrera, A. 2009. **Estudio fitoquímico del alga *penicillus capitatus lamarck* y evaluación de su posible actividad antiinflamatoria**, [Tesis de Licenciatura en Química], Venezuela, Caracas. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias.

[23]Arata, P.; Quintana, I.; Canelón, D. J.; Vera, B.; Compagnone, R. S.; Ciancia, M. 2015. "Chemical structure and anticoagulant activity of highly pyruvylated sulfated galactans from tropical green seaweeds of the order Bryopsidales", **Carbohydr. Polym.** 122 (20): 376-386

[24]Erdtman, H. S.F. **Some aspects of Chemotaxnomy**, Institutioment för Organisk Kemi, KTH, Stockholm 70, Sverige, p. 679-708.

[25]Dominguez, X.1973. **Métodos de investigación fitoquímica**, D.F, México, Limusa, 1:67-76.

[26]Albornoz, A. 1980. **Productos naturales** (Sustancias y drogas extraídas de las plantas), Caracas, Venezuela, Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela, p. 129-133.

[27]Hasegawa, M.; Marcano, D. 1991. **Fitoquímica orgánica**, Caracas, Venezuela, Consejo de desarrollo científico y humanístico de la Universidad Central de Venezuela, p. 1-38.

[28]Rodríguez, P.; De Parisca, L.; Lindorf, H. 1999. **Botánica** (Clasificación-Estructura-Reproducción), Caracas, Venezuela, Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela, 2da edición, p. 584.

- [29]Karsten, U.; Görs S.; Eggert, A.; West, J. 2007. "Trehalose, digeneaside, and floridoside in the Florideophyceae (Rhodophyta) – a reevaluation of its chemotaxonomic value", **Phycologia**, 46(2): 143–150.
- [30]Gustavs, L.; Görs, M.; Karsten, U. 2011. "Polyolpatterns in biofilm-forming aero terrestrial green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)", **Phycologia**, 47: 533-537.
- [31]Kumari, P.; Bijo A.; Mantri, V.; Reddy, C.; Jha, B. 2013. "Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: An analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives", **Phytochemistry**, 86: 44-56.
- [32]Lopes, G.; Sousa, C.; Vanlentão, P.; Andrade, P. 2014. "Sterol in Algae and Health", **Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources**, Porto, Portugal, p. 783.
- [33]<https://www.google.co.ve/maps/place/Parque+Nacional+Morrocoy/>
- [34]Fon Quer, P. 1953. **Diccionario de Botánica**, Novagrafik, Polonia, Ediciones Peninsula, p. 1247.
- [35]Gunstone, F.; Seth, S.; Wolff, R. 1995. "The distribution of $\Delta 5$ polyene acids in some pine seed oils between the α - and β -chains by ^{13}C -NMR spectroscopy", **Chem. Phys. Lipids**, 78:89-96.
- [36]Tulloch, A.P.; Bergter, L. 1979. "Analysis of the conjugated trienoic acid containing oil from *Fevillea trilobata* by ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", **Lipids**, 14(12):996-1002.
- [37]Thanomsub, B.; Watcharachaipong, T.; Chotelersak, K.; Arunrattiyakorn, P.; Nitoda, T.; Kanzaki, H. 2004. "Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*", **J. Appl. Microbiol**, 96: 588–592.

- [38]Minh, C.V., Kiem, P. V., Huong, L. M.; Kim, Y. H. 2004. "Cytotoxic Constituents of *Diadema setosum*", **Arch. Pharm. Res.**, 27(7): 734-737.
- [39]Sasaki, G.L.; Gorin, P.; Tischer, C.A.; Iacomini, M. 2001. "Sulfonoglycolipids from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*: isolation NMR, and ESI-MS approaches", **Glycobiology**, 11(4): 345-351.
- [40]Cedergren, R. A. y Hollingsworth, R. I. 1994. "Occurrence of sulfoquinovosyl diacylglycerol in some members of the family Rhizobiaceae", **J. Lipid Res.** 35: 1452-1461.
- [41]Plouguerné, E. y col. 2014. "Glycolipids from seaweed and their potential biotechnological applications", **Front Cell Infect Microbiol.**, 4(174):1-5.
- [42]Ragona L.; Fogolari F.; Zetta L.; Pérez D.M.; Puyol P; De Kruif K.; Lohr F.; Ruterjans H.; Molinari H. 2000. "Bovine beta-lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid". **Protein Sci**, 9: 1347-1356.
- [43]Araki, S.; Sakurai, T.; Oohusa, T.; Kayama, M. y Sato, N. 1989. **Plant Cell Physiol.** 30(5): 775-781.
- [44]Plouguerné, E. y col. 2013. "Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian Brown Seaweed *Sargassum vulgare*", **Mar. Drugs**, 11: 4628-4640.
- [45]Silverstein, R.; Webster, F.; Kiemle, D. 2005. **Spectrometric identification of organic compounds**, Estados Unidos de America, 7^{ma} Edición, p. 502.
- [46]Okuyama, E.; Hasegawa, T.; Matsushita, T.; Fujimoto, H.; Ishibashi, M. y Yamazaki, M. 2001. "Analgesic Components of *Saposhnikovia* Root (*Saposhnikovia divaricata*)", **Chem. Pharm. Bull**, 49(2) 154-160.
- [48]Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. 2009. **Structure determination of organic compounds**, Berlin, Alemania, 4^{ta} Edición, p. 420.

- [49]Marcel, S.F.; Jie, K.L.; Mustafa, J. 1997. "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Applications to Fatty Acids and Triacylglycerols", **Lipids**, 32(10): 1019-1034.
- [50]Raiger, L. J. y López, N. I. 2009. "Los biosurfactantes y la industria petrolera", **Quimicaviva**, 3(8): 146-161.
- [51]Cortés, A.; Troconis I. G.; Jaramillo M. E. 2013. "Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión", **Biológicas**, 15(1): 16-23.
- [52]Ramos-García, M.L.; Bautista-Baños, S.; Barrera-Necha, L.L.; Bosquez-Molina, E.; Alia-Tejacal, I. y Estrada-Carrillo, M. 2010. "Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas", **Rev. Mex. Fitopatol.**, 28: 44-57.
- [53]Qi, S.; Zhang, S.; Huang, J.; Xiao, Z.; Wu, J.; Long, L. 2004. "Glycerol Derivatives and Sterols from *Sargassum parvivesiculosum*", **Chem. Pharm. Bull**, 52 (8): 986-988.
- [54]Moo-Puc R.; Robledo D.; Freile-Pelegrin, Y. 2011. "Improved Antitumoral Activity of Extracts Derived from Cultured *Penicillus dumetosus*", **Trop. J. Pharm. Res.**, 10 (2): 177-185
- [55]Yff, B.; Lindsey, K. L.; Taylor, M. B.; Erasmus, D. G.; Jäger, A. K. 2002. "The pharmacological screening of *Pentania prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid". **J. Ethnopharmacol.**, 79(1): 101-107.
- [56]Harada, H.; Yamashita, U.; Kurihara, H.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Kamei, Y.; 2002. "Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga". **Anticancer. Res.**, 22(5): 2587-2590.

[57]Gunstone, F. 1994. "High resolution ^{13}C NMR. A technique for the study of lipid structure and composition". **Prog. Lipid Res.** 33(1):19-28.

[60]Khotimchenko, S. V.; Klochkova, N. G.; Vaskovsky, V. E. 1990. "Polar lipids of marine macrophytic algae as chemotaxonomic markers", **Biochem Sys Ecol**, 18(2):93-101.

[58]Shriner, R.; Fuson R.; Curtin, D. 2001. **Identificación sistemática de compuestos orgánicos**. México. Editorial Limusa, p. 479.

[59]Wang G.Q.; Guo, L.; Du, L.M.; Fu, Y.L. 2013. "Competitive supramolecular interaction of carbachol and berberine with cucurbit[7]uril and its analytical application", **Microchem J.**, 110: 285–291.

[61]Kumari, P.; Bijo, A.J.; Mantri, V.A.; Reddy, C.R.K.; Jha, B. 2013. "Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: An analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives", **Phytochemistry**, 86:44-56.

[62]Guiry, M.D.; Guiry, G.M. 2016. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; 04 May 2016.

[63]Santos, S.; Vilela, C.; Freire, C.; Abreu, M.; Rocha, S. M.; Silvestre, A. 2015. "Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals", **Food. Chem.**, 183: 122–128.

[64]Khor, H.T. 1979. "Removal of chlorophyll pigments from plant neutral lipids", **J. Chromatogr.**, 179: 225-226.

[64]Dembitsky, V.M.; Pechenkina-Shubina, E. E.; Rozentsvet, O.A. 1991. "glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea", **Phytochemistry**, 30(7): 2279-2283.

[65]Williams, D.E.; Sturgeon, C.M; Roberge, M.; Andersen, R. J. 2007. "Nigricanosides A and B, Antimitotic Glycolipids Isolated from the Green Alga *Avrainvillea nigricans* Collected in Dominica", **J. Am. Chem. Soc.**, 129 (18): 5822–5823.

[66]Moo-Puc, R.; Robledo, D.; Freile-Pelegri, Y. 2011. "Enhanced Antitumoral Activity of Extracts Derived from Cultured *Udotea flabellum* (Chlorophyta)", **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, 1:1-7.

[67]Berry, J. 2011. **Herbicides and Environment** (Marine and Freshwater Microalgae as a Potential Source of Novel Herbicides), Rijeka, Croatia, InTech, p, 705-734.

VII. -GLOSARIO DE TÉRMINOS ^[34]

Aguzado: Que se vuelve agudo, un poco agudo.

Ápice: Punto culminante de cualquier cosa.

Utrículo: Cualquiera de las pequeñas vesículas constituidas por hojas o segmentos foliales en el gen.

Bifurcado: termino usual para referirse a órganos diversos de forma ahorquillada o dicótoma.

Bulboso: Engrosado inferiormente a manera de bulbo.

Capítulo: Proviene del latín *capitulum*, cabecita.

Cenocítico: Pertenece a lo relativo al cenócito: hongos, algas, *cenocíticos*.

Corticado: Provisto de corteza. El tallo es un órgano corticado. Aplicase también a otros órganos protegidos por estratos celulares que actúan a modo de corteza.

Dicótomo, ma: Ramificación que en el punto vegetativo se divide en dos equitativamente.

Distal: Alejado del punto que se toma como base u origen.

Ecorticado: Sin corteza.

Estípite: tronco, vara o rama-

Fusiforme: Ahusado, de forma de huso.

Laxo: Suelto, flojo, poco denso.

Oblongo: Más largo que ancho o excesivamente largo.

Ovado: De forma ovada pero con la parte ancha en el ápice.

Oval: Órganos laminares de figura de óvalo, de elipse poco excéntrica.

Piriforme: De forma parecida a la de una pera.

Rizoide: Semejante a una raíz, por su morfología o por la función que desempeña.

Sacciforme: En forma de saco.

Talo: Cuerpo vegetativo no diferenciado en un eje caulinar folioso y en raíces, unicelular, y en forma muy simple, filamentoso o laminar.