

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EXPLORACIÓN DEL PERFIL QUÍMICO DE LOS
EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL CORAL DE FUEGO
(*Millepora alcicornis*)"

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SUZAN ERENDIRA HERNANDEZ RAMOS

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2005.

No. Adq. H70753

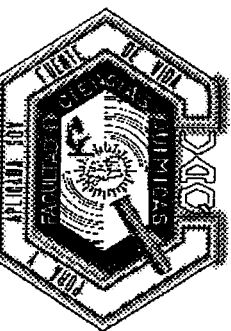
No. Título _____

Clas TS

578.7789

H557e

BIBLIOTECA CENTRAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EXPLORACIÓN DEL PERFIL QUÍMICO DE LOS
EXTRACTOS ORGÁNICOS DEL CORAL DE FUEGO
(*Millepora alcicornis*)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

SUZAN ERENDIRA HERNANDEZ RAMOS

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH
DIRECTOR

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA
SINODAL

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
SINODAL

Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA
SINODAL

DEDICATORIA

*Al Dios solo sabio, mi salvador.
Al Él sea la gloria y magnificencia,
Imperio y potencia, ahora y en todos los siglos.
Amén.*

*"Oh Jehová, tu me has examinado y conocido.
Tu has conocido mi sentarme y mi levantarme
Has entendido desde lejos mis pensamientos.
Mi senda y mi acostarme has rodeado,
Y estás impuesto en todos mis caminos.
Pues aún no está la palabra en mi lengua,
Y he aquí, oh Jehová, tu la sabes toda.
Detrás y delante me guardeciste,
Y sobre mí pusiste tu mano.
Más maravillosa es la ciencia que mi capacidad;
Alta es, no puedo comprenderla.
¿A dónde me iré de tu espíritu?
¿Y a dónde huiré de tu presencia?
Si subiere a los cielos, allí estás tú:
Y si en abismo hiciere mi estrado, he aquí allí tú estas.
Si tomare las alas del alba, y habitare en el fondo de la mar,
Aún allí me guiará tu mano, y me asirá tu diestra.
Si dijere: Ciertamente las tinieblas me encubrirán;
Aún la noche resplandecerá tocante a mí.
Aún las tinieblas no encubren de ti,
Y la noche resplandece como el día:
Lo mismo te son las tinieblas que la luz.
Porque tú poseíste mis riñones;
Cubristeme en el vientre de mi madre.
Te alabaré porque formidables, maravillosas son tus obras:
Estoy maravillado y mi alma lo conoce mucho."*

Salmos 139: 1-14

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios**. "Porque Jehová da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia" Proverbios 2:6

A mis **Padres**. Por darme todo el amor y el apoyo del mundo. Los amo y me siento orgullosa de ser su hija. Son el mejor ejemplo del amor de Dios para mí.

A mis **hermanos**. Por soportar todas mis rabietas. A mi **familia entera**, a mi abuelita, a mis tíos, tías y primos. Los amo y agradezco su confianza. A mis seres queridos que ya se fueron, a todos y cada uno de mi preciosa familia. Gracias.

A **Fernando**. Gracias por todo lo que haces por mí. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por ser mi apoyo, no hubiera logrado esto sin ti. Te amo.

Al **Dr. Moustapha Bah**. Gracias por ser el Director de esta tesis. Gracias por el apoyo, la paciencia y la confianza que me ha tenido. Gracias por no perder la fe en mí incluso cuando yo ya la había perdido. Gracias por celebrar mis logros y apoyarme en los momentos difíciles. Gracias por ser una gran inspiración, un gran ejemplo, un gran maestro y por ser como un padre para mí. Lo quiero mucho.

Al **M. en C. Gustavo Pedraza**. Gracias por las aportaciones y comentarios hechos a esta tesis. Gracias por hacer mi estancia en la Facultad de Química más ligera. Gracias por ser un buen maestro, un buen amigo, por darme todos los dulces que quería, porque claro que soy su alumna consentida y por permitirme ser como una más de sus hijas. Lo quiero mucho.

A la **Dra. Alejandra Rojas**. Por sus aportaciones y sugerencias que hicieron posible este trabajo.

A la **Dra. Dora M. Gutierrez**. Por las aportaciones y comentarios a este trabajo.

A todos los **maestros** que marcaron una diferencia en mi vida. Gracias por invertir su tiempo y esfuerzo en mi educación.

A **Alejandro G. Lex**, gracias por todo. Por tu ayuda en este trabajo, que por cierto fue mucha, por tus aportaciones técnicas pero sobre todo por tu apoyo y amistad. Ya sabes que eres mi mejor amigo. T.Q.M.

A **Angeles y Catalina**. Chicas, las quiero mucho, gracias por el apoyo que me han dado. Gracias por reír y llorar conmigo. Por las palabras de aliento las palabras de animo y la confianza que existe entre nosotras.

A mis demás amiguitos: **Cynthia, Florencia, Mary y Alma**. Gracias por permitirme entrar a sus vidas y hacerme sentir parté del grupo. Las quiero

mucho. **Rodrigo:** Gracias por cuidar de mi. T.Q.M. **Hugo:** Gracias por estar ahí cuando te he necesitado. **Tony:** Un placer haberte conocido. T.Q.M. **Cris:** Gracias por ser mi amiguito aún estando lejos.

A todos los demás que lograron que mi estancia en esta facultad fuera la mejor época de mi vida: **Jonathan Esquivel, Isidro, Iván, Josie, Janet, Gely, Gaby N., Jaime, Rafael, Adhylio** a todos Gracias.

RESUMEN

Millepora alcicornis es un hidrocoral que se encuentra comúnmente en el Caribe mexicano. Este organismo libera toxinas que al contacto con la piel humana causa quemaduras difíciles de sanar. Por ese efecto, es conocido como "coral de fuego". Algunas de las toxinas encontradas en la especie han sido identificadas como proteínas. Sin embargo, poco se conoce acerca de su contenido en metabolitos secundarios y de la toxicidad de éstos. Los organismos marinos en general han despertado en las últimas décadas un gran interés en la comunidad científica, debido al gran número de metabolitos bioactivos de diversas estructuras químicas aislados a partir de ellos y que presentan actividades farmacológicas o tóxicas, potentes y selectivas. La presente investigación se orientó al estudio del perfil del metabolismo secundario de *M. alcicornis*. Se preparó un extracto acuoso del cual se obtuvieron extractos orgánicos, utilizando como disolventes acetona, acetato de etilo y metanol. La cantidad de extracto obtenida en cada caso fue pobre. Se estudió el perfil químico de cada uno de los extractos, tratando de purificar algunos constituyentes individuales. Sin embargo, debido a la proporción reducida de los mismos, se llevó a cabo un análisis mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Ese análisis permitió determinar la presencia de más de sesenta compuestos en los extractos obtenidos. Se generaron los espectros de masas de 22 de los constituyentes, utilizando impacto electrónico. El análisis de esos espectros permitió determinar que varios de ellos consistían en ácidos grasos saturados de diferentes tamaños (C_{16} - C_{36}). También se detectó la presencia de anillos aromáticos en algunos de los constituyentes. Sin embargo, debido a los antecedentes químicos de especies de hidrocorales, no se descarta la posibilidad de que algunos de los metabolitos no identificados sean de naturaleza terpénica.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Importancia de los arrecifes de coral	3
II.2. Características del <i>phylum Cnidaria</i>	4
II.3. El <i>phylum Cnidaria</i> como fuente de moléculas con actividad biológica	6
II.4. Estudios realizados a especies del género <i>Millepora</i>	12
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS	17
General	17
Específicos	17
V. METODOLOGÍA	18
V.1. Materiales	18
V.1.1. Para la preparación y tratamiento de los extractos	18
V.1.2. Para análisis cromatográficos	18
V.1.3. Disolventes y reactivos para la preparación y tratamiento de los extractos	18
V.1.4. Disolventes y reactivos para los análisis cromatográficos	19
V.1.5. Equipos e instrumentos para la preparación y tratamiento de los extractos	19
V.1.6. Equipos e instrumentos para los análisis cromatográficos	19
V.2. Métodos	21
V.2.1. Preparación de los extractos orgánicos	21

V.2.2. Análisis de los extractos mediante CCF	24
V.2.3. Preparación de las soluciones reveladoras para cromatografía en capa fina.	24
V.2.4. Implementación de condiciones en HPLC	25
V.2.5. Fraccionamiento de los extractos y purificación de los compuestos	26
VI. RESULTADOS	27
VI.1. Purificación de las fracciones metanólicas	27
VI.2. Tratamiento de los extractos	27
VI.3. Fraccionamiento de los extractos mediante HPLC	44
VII. DISCUSIÓN	54
VII.1. Datos espectroscópicos de las sustancias orgánicas aisladas de <i>M. alcornis</i>	54
VII.1.1. Espectro Infrarrojo	54
VII.1.2. Cromatografía de gases-espectrometría de masas	55
VII.1.3. Resonancia magnética nuclear	58
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. BIBLIOGRAFÍA	60
X. ANEXO	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Aminas de importancia biológica aisladas de extractos etanólicos de especies marinas del <i>phylum Cnidaria</i>	8
2	Metabolitos secundarios aislados de hidroides marinos	10
3	Sistemas de elución utilizados en CCF	24
4	Fases móviles utilizadas para el fraccionamiento de los extractos en HPLC	26
5	Principales fragmentos de los componentes individuales del extracto acetónico de <i>Millepora alcicornis</i>	31
6	Intervalos de tiempos de retención y rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto MA-EA1	45
7	Intervalos de tiempos de retención y rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto MA-EA2-HEX	47
8	Tiempos de retención y rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto MA-EA2-MET	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografías subacuáticas de los hidrocorales más abundantes en el Caribe mexicano: A) <i>M. alcornis</i> , B) <i>M. complanata</i> y C) <i>M. squarrosa</i>	12
2	Procedimiento seguido para la obtención del extracto acuoso (EA) a partir de <i>M. alcornis</i>	21
3	Procedimiento seguido para la obtención del extracto metanólico (MA-EM) a partir del extracto acuoso (EA) y el extracto acetónico (MA-EA) a partir de MA-EM	22
4	Preparación de los extractos acetónico (MA-EA2) y de acetato de etilo (MA-Suz-1) a partir del extracto acuoso (EA)	23
5	Cromatograma obtenido del extracto MA-EA1	28
6	Espectro IR del extracto MA-EA1	29
7	Cromatograma de gases y espectros de masas de algunos de los componentes mayoritarios del extracto MA-EA1	32
8	Espectro RMN ^1H del extracto MA-EA1 (400 MHz)	34
9	Espectro RMN ^{13}C del extracto MA-EA1 (100 MHz)	35
10	Cromatograma de la porción MA-EA2-HEX.	37
11	Cromatograma de la porción MA-EA2-MET	38
12	Espectro IR del extracto MA-Suz-1	39
13	CG-EM del extracto MA-Suz-1	40
14	Espectro RMN ^1H (400 MHz) de la muestra MA-Suz-1	42
15	Espectro RMN ^{13}C (100 MHz) de la muestra MA-Suz-1	43
16	Esquema del fraccionamiento del extracto MA-EA1 mediante HPLC	44
17	Esquema del fraccionamiento de las dos porciones del extracto MA-EA2 mediante HPLC	46
18	Espectro IR del pico Suz-2	49

19	Espectro IR del pico Suz-4	50
20	Espectro RMN ^1H (400 MHz) de MA-Suz-2	51
21	Espectro RMN ^{13}C (100 MHz) de MA-Suz-2	52
22	Espectro RMN ^{13}C (DEPT) de MA-Suz-2	53
23	Mecanismo de rearrreglo de McLafferty	56
24	Esquema de fragmentación del ácido palmítico	56
25	Esquema de fragmentación del ácido 2-metil hexadecanoico	57

I. INTRODUCCIÓN

La constante necesidad del ser humano de encontrar más y mejores formas de curar sus enfermedades ha dado como resultado una creciente búsqueda de nuevos y mejores principios activos. Esta búsqueda se ha enfocado en los productos que ofrece la naturaleza, ya que los organismos vivos poseen numerosos metabolitos que pudieran poseer una actividad biológica útil para el tratamiento de enfermedades. La naturaleza ofrece un gran número de compuestos bioactivos, algunos de los cuales han sido utilizados como materia prima para la semisíntesis de fármacos y otros como modelos estructurales para síntesis de fármacos con mayor actividad biológica y/o con menor toxicidad. Tradicionalmente, la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas se había limitado a organismos de origen terrestre, principalmente plantas y algunos microorganismos. Sin embargo, en los últimos años, ha existido un creciente interés en productos naturales de origen marino, ya que éstos han proporcionado compuestos biológicamente activos con diferentes propiedades farmacológicas y/o toxicológicas, considerándolos por consiguiente como una fuente potencial de principios activos. De acuerdo con lo anterior, la posibilidad de encontrar dichos compuestos bioactivos útiles en el diagnóstico, tratamiento, prevención o investigación de padecimientos es grande debido a la gran biodiversidad encontrada en los mares mexicanos.

Desafortunadamente, el correcto aprovechamiento de estos recursos ha sido muy limitado, ya que no se han realizado suficientes estudios químicos, bioquímicos y farmacológicos de los organismos que habitan en las aguas territoriales de México.

Existen organismos marinos que pueden ser tóxicos al ingerirse y otros, como el hidrocoral *Millepora alcicornis*, que producen toxicidad simplemente por contacto. Ambos casos constituyen un fundamento para realizar estudios químicos y/o farmacológicos de esos organismos. *M. alcicornis* es una especie de hidrocoral muy común en los arrecifes del Caribe mexicano. Ese organismo produce quemaduras locales dolorosas al entrar en contacto con la piel del humano. Debido a su localización dentro de las zonas turísticas del Caribe mexicano, el coral de

fuego representa un riesgo de salud pública. La importancia de esta especie de hidrocoral radica en la abundancia de la misma en los arrecifes de coral dentro de los mares mexicanos, ya que dicho hidrocoral tiene un efecto biológico en el hombre.

Con base en lo anterior, se decidió realizar este trabajo de investigación, como un seguimiento de un proyecto interdisciplinario e interinstitucional, enfocado hacia la obtención de productos naturales bioactivos de origen marino con potencial farmacológico. Asimismo, se podrá obtener información útil para la mejor comprensión de estos organismos y contribuir de esta forma a su preservación y al mantenimiento del equilibrio de su entorno. Este proyecto comprende el estudio químico de las fracciones orgánicas obtenidas de *Millepora alcicornis*.

II. ANTECEDENTES

II.1. Importancia de los arrecifes de coral

Los arrecifes de coral son ecosistemas marinos tropicales formados por la acumulación de restos calcáreos de diferentes organismos. Los arrecifes de coral se encuentran entre los sistemas económicamente más productivos y mantienen una gran diversidad de formas de vida, comparable sólo con la de las selvas tropicales (Solomon y col., 1998). Consisten en grandes formaciones de carbonato de calcio en mares tropicales poco profundos, depositadas por organismos vivos durante miles de años; las plantas y los animales vivos están confinados a la capa superior del arrecife, donde añaden carbonato de calcio al depositado por sus predecesores. Los organismos más importantes que precipitan carbonato de calcio para formar los arrecifes son las escleractinias, los corales hermatípicos y las algas coralinas. Estas últimas no sólo contribuyen a la masa total de carbonato de calcio, sino que ayudan con la precipitación de ese material a mantener unido el arrecife (Hickman y col., 2003).

Muchas de las especies que se albergan en estos ecosistemas tienen valor comercial y pesquero al representar una atracción turística y al proporcionar peces y otros animales para la alimentación humana. Además, el coral noble (o blando) se utiliza en joyería y para adornos y las rocas coralinas sirven para realizar construcciones. Las medusas planctónicas pueden tener cierta importancia como alimento para peces con valor comercial (Hickman y col., 2003). Aunado a su importancia biológica y económica, el arrecife de coral protege a la costa contra el oleaje y las tormentas, contribuye a la formación de playas arenosas y caletas, previene la erosión de éstas, genera el desarrollo de ambientes asociados a él, tales como manglares y comunidades de pastos marinos y, además, actúa como segundo rompeolas y amortigua el régimen de las rompientes sobre la barrera coralina, lo que da como resultado una línea de costa estable, protegida y en buen estado de salud (Castillo y Capurro, 2000).

Al igual que como ocurrió con los organismos terrestres, el interés bioquímico por los animales marinos es objeto en años recientes de progreso, en cuanto a un estudio sistemático de todos los grupos y sus componentes a fin de aprovechar los que son económicamente importantes. Sin embargo, en contraste con los organismos terrestres, existen dificultades asociadas al estudio de las especies marinas, incluyendo problemas en la recolección y en la continuidad del abastecimiento del material (Evans, 1991).

De 1965 a 1996, ha habido un marcado incremento en el número de productos naturales marinos reportados anualmente, lo cual explica por qué los organismos marinos se consideran en la actualidad una rica fuente potencial de moléculas bioactivas. Sin embargo, de 1996 al 2001, los reportes de nuevos metabolitos aislados de productos marinos han disminuido (Blunt y col., 2003). En cuanto a metabolitos secundarios aislados de productos marinos, varios autores han reportado y revisado un gran número de compuestos con diversas características estructurales y actividades biológicas de interés farmacológico (Faulkner, 2002).

La proporción de metabolitos secundarios descubiertos en los tres grandes *phylum* hasta el año 2001 se reparte como sigue: esponjas: 38%, cnidarios: 21% y microorganismos y fitoplancton: 15% (Blunt y col., 2003). Los demás organismos (moluscos, tunicados, algas rojas, equinodermos, algas pardas y algas verdes) proporcionaron el 26% restante.

II.2. Características del *phylum Cnidaria*

Los cnidarios son eficaces depredadores, capaces de matar y devorar presas mucho más organizadas, más rápidas y más inteligentes. (Hickman y col, 2003).

El *phylum Cnidaria* es un grupo con más de 10000 especies. Toma su nombre de las células llamadas cnidocitos, que contienen los orgánulos urticantes (nematocistos) característicos de este *phylum*. Los cnidarios también se conocen como Celenterados (Barret y col., 1986).

Los cnidarios constituyen una parte significativa de la biomasa en algunos lugares. Están ampliamente distribuidos en los hábitats marinos poco profundos, especialmente en lugares con temperaturas cálidas y regiones tropicales y hay unos pocos de agua dulce. No hay especies terrestres (Solomon y col., 1998). Aunque la mayoría son sésiles, o a lo sumo, con movimientos o natación lentos, son eficaces depredadores (Alexander y col., 1992). Se reconocen cuatro clases de cnidarios: Hidrozoos (la clase más variable que incluye hidroides, corales de fuego, la fragata portuguesa y otros), Escifozoos (las verdaderas medusas), Cubozoos (cubomedusas) y Antozoos (la clase mayor, incluye anémonas, corales pétreos, corales blandos y otros) (Hickman y col., 2003).

Todas las formas de cnidarios se ajustan a uno de dos tipos morfológicos: un pólipo, o forma hidroide, que está adaptado a una vida sésil o sedentaria y una medusa que está adaptada para la flotación o una vida nadadora libre. La mayoría de los pólipos tienen cuerpos tubulares, con una boca rodeada por tentáculos en uno de sus extremos. Las medusas generalmente son nadadores libres y tienen cuerpos con forma de campana o paraguas (Curtís y Barnes, 1994).

Las anémonas y los corales (clase Antozoos) son pólipos. Las verdaderas medusas (clase Escifozoos) tienen forma medusoide. Los hidroides coloniales de la clase Hidrozoos tienen a veces ciclos vitales formados por la forma pólipo o hidroide y la forma medusa. Los hidroides coloniales se encuentran generalmente adheridos a conchas de moluscos, rocas, muelles y otros animales en aguas costeras poco profundas, aunque algunas especies se encuentran a grandes profundidades. Muchos Hidrozoos son polimórficos, con varios tipos de pólipos en la colonia (Alexander y col., 1992).

Dentro del cuerpo de estos organismos hay una cavidad gastrovascular con una sola abertura que tiene la función de boca y ano (Solomon y col., 1998). Todos los cnidarios son carnívoros y capturan a sus presas por medio de tentáculos que forman un círculo alrededor de la boca y que poseen células punzantes llamadas cnidocitos (Curtís y Barnes, 1994). Cada cnidocito contiene cápsulas filiformes llamadas nematocistos, los cuales están cargados de veneno y pueden ser pegajosos o provistos de púas, dependiendo de la especie. Los nematocistos se

descargan en respuesta a un estímulo químico o táctil. Así, cuando la presa se acerca a los tentáculos, se disparan los nematocistos que perforan a la presa y la paralizan por medio de la acción de las toxinas contenidas en esos nematocistos. Entonces, los tentáculos se llevan su presa a la boca (Hickman y col., 2003).

II.3. El *phylum Cnidaria* como fuente de moléculas con actividad biológica

En el mundo marino, existe una amplia variedad de toxinas, venenos y metabolitos secundarios tóxicos. Algunos son utilizados para capturar presas con la ayuda de orgánulos especiales como son los nematocistos. Otros son utilizados por los organismos marinos como un sistema de defensa. Sea cual sea la función de estos compuestos, los humanos han sufrido envenenamientos o intoxicaciones con los organismos que producen dichos compuestos de dos diferentes maneras: a través del contacto con los diferentes mecanismos de envenenamiento de estos animales, o comiendo estos organismos (Mebs, 2002).

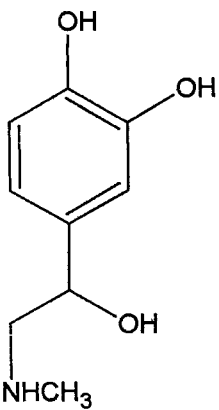
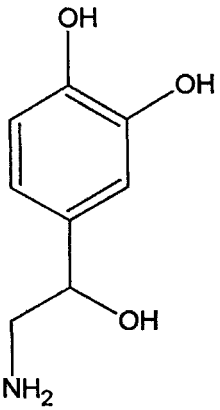
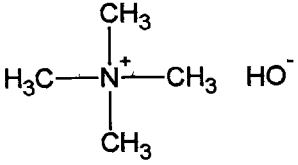
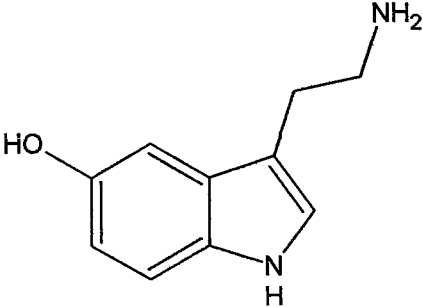
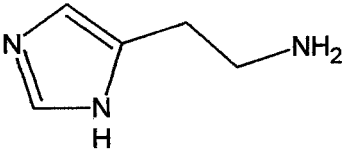
De las más de 10000 especies de cnidarios que se conocen en la actualidad, se ha reportado que aproximadamente 70 poseen la capacidad de causar intoxicación en humanos, ya sea por medio de estimulación por contacto o por ingestión de sus tejidos crudos (Hashimoto, 1979).

Entre los compuestos con actividad farmacológica aislados de cnidarios se encuentra una gran cantidad de péptidos y proteínas; la mayoría han sido aislados de anémonas y medusas. Se ha observado que los venenos de algunas medusas modifican la conductividad iónica membranal en diferentes modelos biológicos. Por ejemplo, *Carybdea rastonii* produce contracción, dependiente de calcio, del músculo liso arterial (Azuma y col., 1989); algunas toxinas de *Chrysaora sp.* abren canales catiónicos en fibras nerviosas desmielinizadas de rana (Dubois y col., 1983) y el extracto protéico de *Casiopea xamachana* incrementa la conductancia iónica de la membrana del ovocito de *Xenopus laevis* (Torres y col., 2001). Asimismo, también se ha descrito la presencia de péptidos y proteínas tóxicas en algunas especies de la clase Hydrozoa, principalmente de hidras marinas y de agua dulce (Klug y col., 1989). Por ejemplo, en un extracto preparado de nematocistos de *Hydra vulgaris*, se ha demostrado la presencia de una proteína

tóxica. Esta proteína posee actividad altamente hemolítica e induce espasmos en los animales analizados (Klug y Weber, 1991).

Entre el gran número de metabolitos secundarios que se han aislado de los cnidarios se encuentran muy pocos solubles en agua, ya que la mayoría de ellos son de naturaleza terpenoide y esteroidea (Blunt y col., 2003). Una de las principales razones de la inclinación hacia los compuestos lipofílicos y de polaridad intermedia es que el aislamiento y la purificación de compuestos hidrosolubles implica ciertas dificultades, porque requieren de un proceso de concentración muy prolongado de los extractos acuosos, además del riesgo de desarrollarse bacterias y hongos en estos extractos, aunque dichos compuestos también pueden poseer potentes efectos farmacológicos (Evans, 1991). Este tipo de problemas afortunadamente se han podido solucionar de manera parcial, en muchas ocasiones mediante el empleo de disolventes de alta polaridad, tales como el metanol, etanol y butanol (Shimizu, 1985). Por ejemplo, algunos ácidos orgánicos como los ácidos 2-aminoetilfosfónico, 2-metilaminoetilfosfónico y 2-trimetilaminoetilfosfónico han sido descritos en extractos etanólicos de varias anémonas marinas (Baslow, 1977). Algunas aminas de importancia biológica y naturaleza conocida también se han encontrado en extractos etanólicos y acuosos de especies del phylum *Cnidaria* (Cuadro 1). Por ejemplo, se han encontrado las catecolaminas adrenalina y noradrenalina en algunas anémonas marinas (Wood y Lentz, 1964), la tetramina en la anémona *Actinia equina* (Ackermann y col., 1923), la serotonina (5-HT) y la histamina en la especie *Anemonia sulcata* y en la medusa *Chrysaora quinquecirrha* (Mathias y col., 1958).

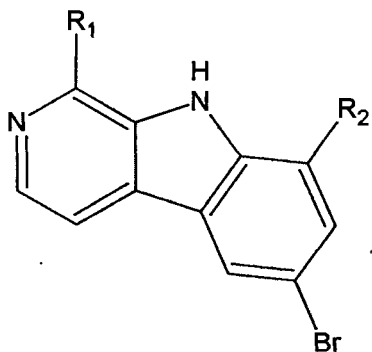
Cuadro 1. Aminas de importancia biológica aisladas de extractos etanólicos de especies marinas del *phylum Cnidaria*.

 <p>Adrenalina</p>	 <p>Noradrenalina</p>	 <p>Tetramina</p>
 <p>5-HT</p>	 <p>Histamina</p>	

La mayoría de los reportes de nuevos metabolitos secundarios que se han aislado de los cnidarios están enfocados en los miembros de la clase Alcyonaria, entre los que destacan: los corales blandos, las gorgonias y los corales verdaderos (Blunt y col., 2003). En comparación con éstos, los metabolitos secundarios que se han aislado de especies de la clase Hydrozoa (hidroides) son escasos. En el Cuadro 2 se muestran las estructuras de algunos metabolitos secundarios que se han aislado de hidroides marinos y sus estructuras fueron deducidas por análisis

espectroscópico. Tres β -carbolicinas bromadas fueron aisladas de un extracto lipofílico del hidroide marino *Aglaophenia pluma*; (Aiello y col., 1987). El hidralmanol A fue aislado del hidroide marino *Hydrallmania falcata*; (Pathirana y col., 1989). Las abietinarinas A y B fueron aisladas del hidroide marino del pacífico nororiental *Abietinaria sp.*, las cuales muestran citotoxicidad *in vitro* contra células L1210; (Pathirana y col., 1990). Las coridendraminas A y B fueron aisladas del hidroide marino *Corydendrium parasiticum*; ambas poseen la capacidad de inhibir la depredación por peces; (Lindquist y col., 2000). Del hidroide marino *Tridentata marginata* fueron aislados tres inusuales alcaloides aromáticos: los tridentatoles A, B y C. Solamente uno de ellos, el tridentatol A, destacó por ser un potente inhibidor de la depredación por peces (Lindquist y col., 1996). Recientemente, fueron aislados cinco metabolitos secundarios adicionales de *T. marginata*, los tridentatoles D-H. La estructura del tridentatol C fue establecida por cristalografía de rayos X (Lindquist, 2002); las estructuras de los demás tridentatoles fueron determinadas por análisis espectroscópicos (Lindquist y col., 1996; Lindquist, 2002). De manera adicional, los tridentatoles fueron identificados mediante análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia en nematocistos purificados de *T. marginata*, lo cual comprueba por primera vez la existencia de metabolitos no proteínicos en nematocistos de cnidarios (Lindquist, 2002). Recientemente, de diversas especies del coral *Sinularia scabra* se han aislado norditerpenoides llamados escabrólidas (Ahmed y col., 2004).

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de hidroides marinos.

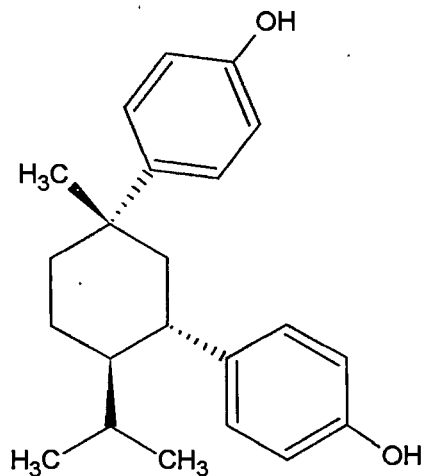


β -carbolinas bromadas

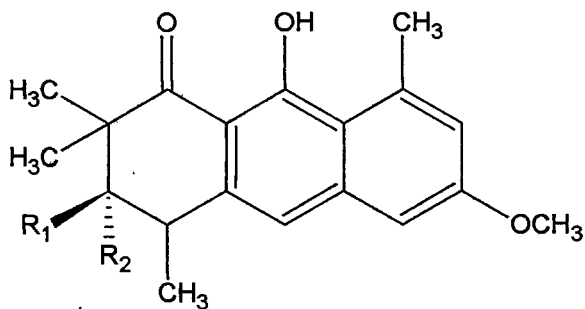
I, $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$

II, $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$

III, $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{Br}$



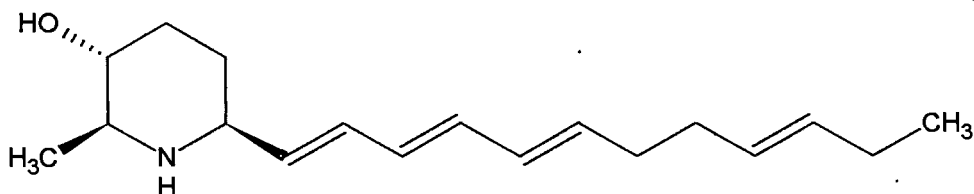
Hidralmanol A



Abietinarinas

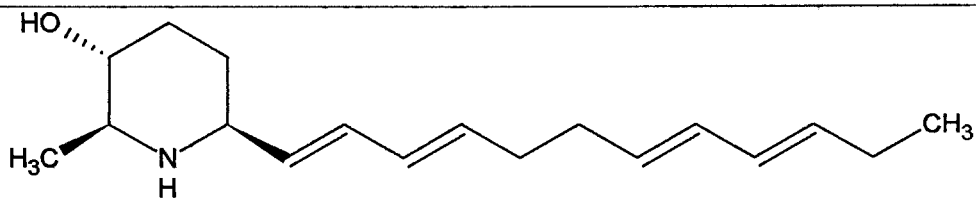
A, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

B, $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$

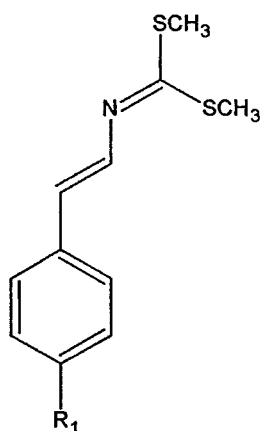


Coridendramina A

Cuadro 2. Metabolitos secundarios aislados de hidroides marinos (Continuación).

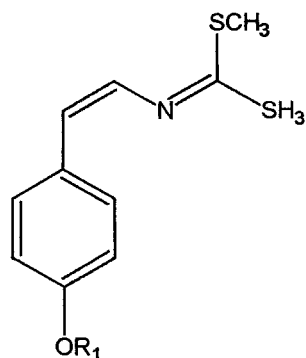


Coridendramina B



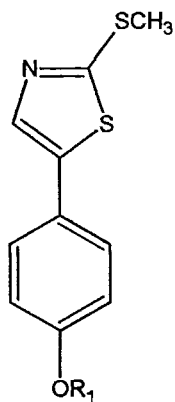
A, R₁ = H

E, R₁ = SO₃Na



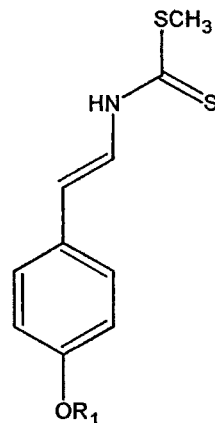
B, R₁ = H

F, R₁ = SO₃Na



C, R₁ = H

H, R₁ = SO₃Na



D, R₁ = H

G, R₁ = SO₃Na

Tridentatoles

II.4. Estudios realizados a especies del Género *Millepora*

El género *Millepora* (Reino: *Animalia*; *Phylum*: *Cnidaria*; Clase: *Hydrozoa*; Orden: *Capitata*; Superfamilia: *Zancleroidea*; Familia: *Milleporidae*) comprende 19 especies reconocidas actualmente (Grassé, 1993). Los pólipos de estos organismos forman esqueletos calcáreos, constituyendo una de las formas coralinas más comunes en los arrecifes. Se encuentran a profundidades que van desde menos de 1 metro hasta cerca de 40 metros en mares tropicales de todo el mundo, (Lewis, 1989). La forma de crecimiento de los hidrocorales presenta cierta plasticidad ante los movimientos de las aguas. Generalmente, las formas robustas y de cuchillas se encuentran en aguas turbulentas y las formas ramificadas son más comunes en aguas tranquilas (Davies y Montaggioni, 1985). En los arrecifes del Caribe mexicano predominan tres especies del género *Millepora*: *M. alcicornis*, que presenta una forma ramificada; *M. complanata*, cuyas colonias tienen forma de cuchillas y *M. squarrosa*, que posee una forma de caja, muy parecida a un panal de abejas (Figura 1) (Lewis, 1989).

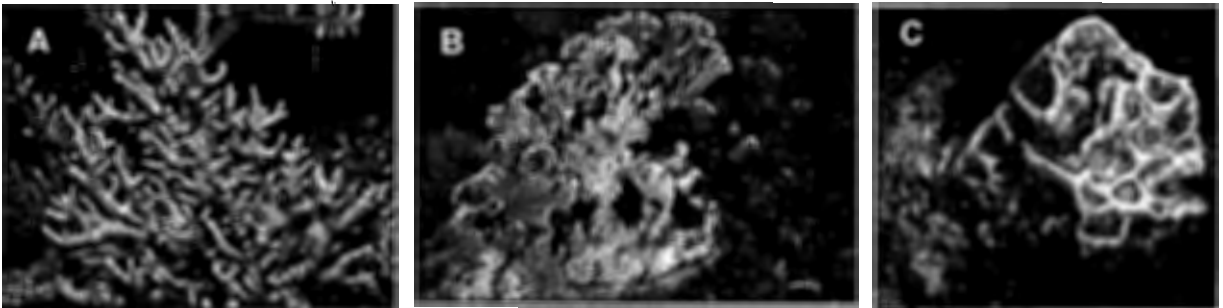


Figura 1. Fotografías subacuáticas de los hidrocorales más abundantes en el Caribe mexicano: A) *M. alcicornis*, B) *M. complanata* y C) *M. squarrosa*.

Al igual que los corales verdaderos, los hidrocorales poseen también zooxantelas simbiotes, razón por la cual también se ven afectados por el fenómeno de blanqueamiento de coral y algunos otros fenómenos climatológicos (Lewis, 1989).

El blanqueamiento de los arrecifes de coral o expulsión de las algas simbiotes zooxantelas se convirtió en el fenómeno más frecuente y severo en la década de los 80. Las zooxantelas proveen a los arrecifes de coral de la mayor parte de su carbono, le dan la habilidad de depositar carbonato de calcio, y le dan el color al coral. El blanqueamiento provoca que el coral se vuelva blanco o pálido, por la pérdida de pigmento y permitiendo así que el esqueleto calcáreo del coral sea visible a través de su tejido transparente. Este fenómeno de blanqueamiento masivo afecta a corales cercanos a la superficie y a corales profundos, a través de largas regiones (Glynn, 1991).

Muchas de las especies del género *Millepora* son inofensivas para los humanos. Sin embargo, los nematocistos de algunas de ellas son capaces de perforar la piel al ser estimulados por contacto y provocar intensas picaduras dolorosas con diferentes grados de intoxicación (Hashimoto, 1979; Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988). Estas picaduras pueden provocar reacciones cutáneas tales como eritema, ronchas, lesiones ulceronecroticas y lesiones papulares, entre otras (Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988). En cuanto a la sintomatología general, puede presentarse náusea, vómito, dolor abdominal, dificultad respiratoria y fiebre (Bianchini y col., 1988).

El nombre "coral de fuego" se debe a las lesiones que producen en los humanos algunas de las especies del género *Millepora* (Lewis, 1989). Debido a esto, en las clínicas situadas cerca de los mares tropicales cada año se reportan varios casos de quemaduras provocadas por contacto con los corales de fuego (Sagi y col., 1987).

A pesar de su abundancia, ubicación geográfica e importancia ecológica, se han realizado muy pocos estudios sobre los corales de fuego (Lewis, 1989). Se han realizado estudios toxicológicos con *M. tenera* y *M. alcicornis* demostrando que los extractos crudos de estas especies, obtenidos por maceración del hidrocoral en buffer Sørensen a un pH de 7 y una temperatura de 4 °C, poseen actividad hemolítica y dermonecrotica (Wittle y col., 1974).

En cuanto a la especie *M. alcicornis*, se ha visto que la toxicidad del material crudo no se reduce por liofilización. Sin embargo, al calentarlo a 60 °C, pierde su

actividad. La electroforesis en disco sugiere que el material crudo contiene al menos 22 componentes proteicos (Wittle y col., 1971). El extracto de *M. alcicornis* fue sometido a sucesivas cromatografías en DEAE-celulosa y Sephadex G-100, las cuales permitieron purificar parcialmente una proteína con un peso molecular aproximado de 100,000 Da y una actividad tóxica 14 veces mayor que el extracto original (Wittle y col., 1974). Por otra parte, el fraccionamiento cromatográfico en DEAE-celulosa del extracto de *M. tenera* permitió purificar parcialmente una fracción proteica 8 veces más activa que el extracto original (Middlebrook y col., 1971). Además, se demostró que las toxinas que se purificaron parcialmente a partir de ambos hidrocorales provenían de sus nematocistos. Sin embargo, no se descartó la posibilidad de que existieran otras toxinas provenientes de otros tejidos del hidrocoral o de sus organismos simbioses (Wittle y col., 1974).

Se realizó un estudio bioquímico y farmacológico de *M. complanata*, en el cual se evaluó el efecto de su extracto crudo sobre las contracciones espontáneas de íleon aislado de cobayo, a concentraciones de 0.001 a 1,000 μg de proteína/ml. El extracto causó una estimulación, dependiente de la concentración, de las contracciones espontáneas del íleon ($\text{CE}_{50} = 11.55 \pm 2.36 \mu\text{g/ml}$), siendo aproximadamente 12 veces menos potente que la ionomicina ($\text{CE}_{50} = 0.876 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$), que se empleó como control positivo. Este efecto se perdió cuando se incubó el extracto a 37 °C de 2 a 12 hrs. El fraccionamiento del extracto, mediante cromatografía de exclusión por FPLC, permitió obtener 12 fracciones primarias, de las cuales sólo las fracciones FV y FVIII mostraron efecto contráctil cuando se evaluaron en el íleon aislado de cobayo a la CE_{50} del extracto. Estas fracciones se sometieron a varios experimentos dirigidos hacia la caracterización parcial de su mecanismo de acción, mediante el modelo de íleon aislado de cobayo, encontrándose que el efecto contráctil de ambas fracciones podría deberse a un incremento en la permeabilidad de la membrana de las células musculares lisas al Ca^{2+} , a través de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Rojas y col., 2002).

Recientemente se realizó un estudio químico y farmacológico en un extracto acuoso de *M. alcicornis*. Se evaluó el efecto del extracto en el modelo biológico de íleon aislado de cobayo, encontrándose un efecto bifásico caracterizado por un efecto inhibitorio inicial, seguido de un incremento de las contracciones espontáneas del íleon. Se encontró que el extracto acuoso del hidrocoral *M. alcicornis* contiene metabolitos secundarios capaces de inducir inhibición del tono y de la amplitud de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. Además se llegó a la conclusión de que el extracto acuoso contiene péptidos y/o proteínas que junto con otros metabolitos secundarios presentes en el extracto son responsables de un efecto contráctil. Así mismo, se aislaron compuestos a partir de un extracto metanólico de *M. alcicornis* mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), los cuales constituyen dos de los principios activos responsables del efecto inhibitorio del extracto acuoso, pudiendo ser, de acuerdo a análisis espectroscópicos, polímeros de etilenglicol o sales orgánicas (García, 2004).

III. HIPÓTESIS

La fracción orgánica preparada a partir del extracto acuoso de *M. alcornis* contiene metabolitos secundarios que relajan la musculatura lisa intestinal.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Llevar a cabo el estudio químico de los extractos metanólico, acetónico y de acetato de etilo de *M. alcicornis* para el aislamiento y la posible caracterización de sus metabolitos secundarios.

ESPECÍFICOS

- Preparar los extractos orgánicos a partir del extracto acuoso, utilizando de manera separada metanol, acetato de etilo y acetona.
- Implementar las condiciones analíticas en la cromatografía de líquidos de alta resolución para la resolución de los constituyentes individuales de cada uno de los extractos orgánicos.
- Llevar a cabo un escalamiento a nivel preparativo para la purificación de los constituyentes individuales.
- Obtener los datos espectroscópicos de los principios aislados y establecer su estructura química.
- Corroborar la actividad espasmolítica de los metabolitos aislados cuando las cantidades disponibles lo permitan.

V. METODOLOGÍA

V.1. Materiales

V.1.1. Para la preparación y tratamiento de los extractos

- Cristalería: embudos, matraces Enlermeyer, matraces bola, probetas y vasos de precipitado de diferentes capacidades.
- Papel filtro Wattman 40.

V.1.2. Para análisis cromatográficos

- Cromatofolios recubiertos de gel de sílice (silica gel 60 F₂₅₄, Merck).
- Tubos capilares, cámaras para cromatografía en capa fina de diversos tamaños y rociadores de vidrio.
- Membranas de nylon y polipropileno hidrofílico para filtración de disolventes (47 mm de diámetro y 0.45 µm de poro).
- Jeringas micrométricas de vidrio de 100 y 150 µl para inyección de muestras.
- Jeringa de purga de 10 ml.
- Loops (líneas de inyección) para inyector de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de 10, 20 y 50 µl.

V.1.3. Disolventes y reactivos para la preparación y tratamiento de los extractos

- Metanol grado HPLC de la marca Mallinckrodt.
- Acetona grado HPLC de la marca J. T. Baker.
- Acetato de etilo grado HPLC de la marca J. T. Baker.

V.1.4. Disolventes y reactivos para los análisis cromatográficos

- Metanol, hexano y acetonitrilo grado reactivo (J. T. Baker).
- Cloroformo y acetona grado reactivo de la marca J. T. Baker.
- Agua destilada Grado HPLC de la marca J. T. Baker.
- Diclorometano y hexano grado HPLC de la marca Caledon.
- Metanol grado HPLC de la marca Mallinckrodt.
- Reactivos para la preparación de la solución reveladora de Dragendorff: subcarbonato de Bismuto (Aldrich Chemical Company Inc.), yoduro de sodio, ácido acético glacial y acetato de etilo de la marca J. T. Baker.
- Reactivos para la preparación de la solución reveladora de sulfato cérico: sulfato cérico amoniacal (J. T. Baker) y ácido sulfúrico concentrado (J.T.Baker).
- Cafeína.

V.1.5. Equipos e instrumentos para la preparación y el tratamiento de los extractos

- Balanza Analítica marca Ohaus (0.00001-250.0 g).
- Rotaevaporador Büchi.
- Bomba de alto vacío para rotaevaporador 0.1 mm Hg, motor ¼ HP.
- Bomba recirculadora de agua.

V.1.6. Equipos e instrumentos para los análisis cromatográficos

- Parrilla eléctrica.
- Balanza analítica marca Ohaus (0.00001-250.0 g).
- Lámpara ultravioleta Spectroline modelo CL-50 con gabinete, con longitudes de onda de 254 y 366 nm.

- Aparato para punto de fusión Fisher-Johns provisto de un termómetro de 300 °C de alcance.
- Sistema Cromatográfico de la marca Waters equipado con una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, un detector de índice de refracción Waters modelo 2410, un detector de arreglo de diodos Waters modelo 996, un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizarán utilizando el programa Millennium³² (Waters).
- Columnas analíticas PrepNova-Pak HR C18 (3.9 x 300 mm, μ Bondapak), aminopropilo (NH₂) (3.9 x 300 mm) y μ Porasil (125 Å, 10 μ m, 3.9 x 300 mm).
- Espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5985B conectado a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5840, con una columna de metilsilicón de 25 mm de longitud y 0.23 mm de diámetro. Los espectros se midieron con un voltaje de ionización de 70 eV y una temperatura de la fuente iónica de 260 °C.
- Espectrómetro IR de rejillas Perkin-Elmer, modelo 599.
- Espectrómetro RMN Varian Unity-400 (RMN-¹H a 400 MHz, ¹³C a 100 MHz).

V.2. Métodos

V.2.1. Preparación de los extractos orgánicos

Para la realización de este experimento, se recurrió a un extracto acuoso previamente obtenido de *M. alcicornis* proveniente de los arrecifes coralinos ubicados en Cozumel y Cancún. La recolección de estos especímenes fue realizada en la Estación Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM en el estado de Quintana Roo. Los especímenes fueron transportados al Laboratorio de Bioquímica Analítica y Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro, lugar donde se preparó el extracto acuoso. La obtención del extracto acuoso de *M. alcicornis* se encuentra esquematizada en la Figura 2.

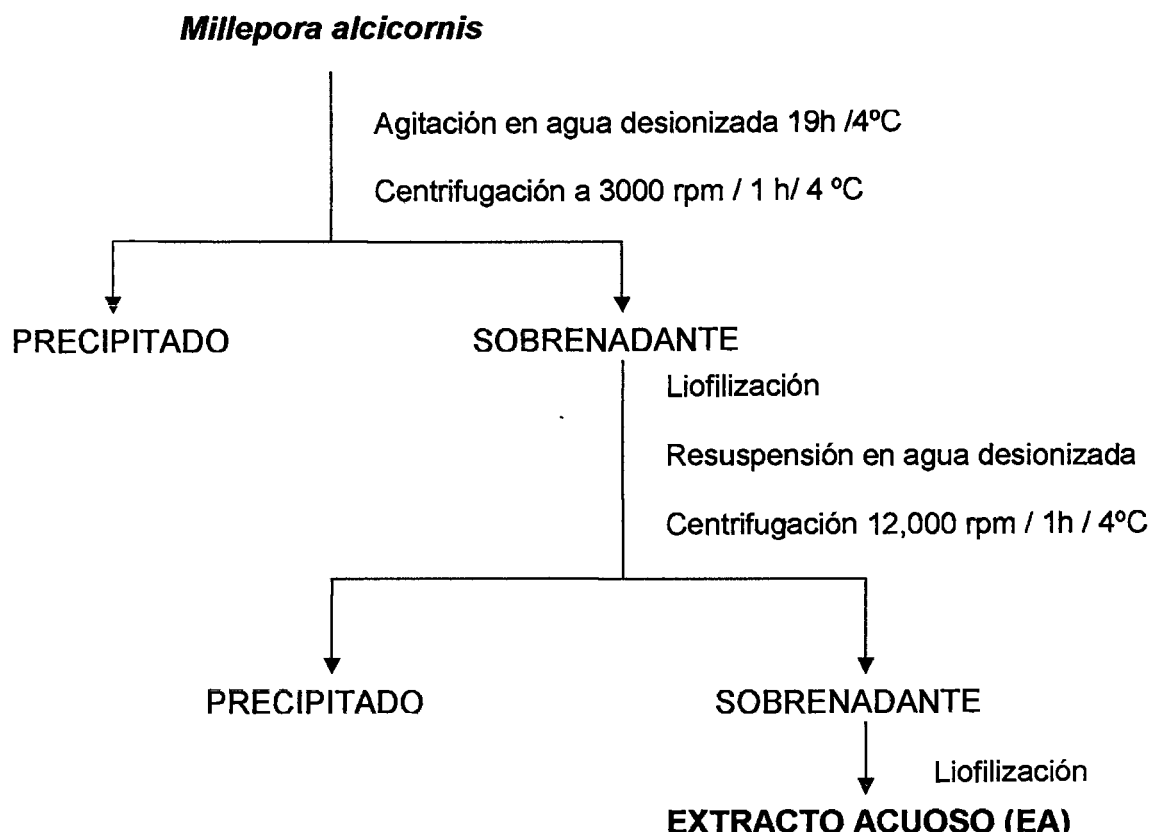


Figura 2. Procedimiento seguido para la obtención del extracto acuoso (EA) a partir de *M. alcicornis*.

Para la obtención del extracto metanólico a partir del extracto acuoso, se procedió como se muestra en la Figura 3. El extracto acuoso se sometió a una extracción por triplicado con metanol grado HPLC. Cada extracción se realizó con un volumen de 50 ml de metanol por cada gramo de extracto por un tiempo de 72 horas. Se filtró y el filtrado se concentró a sequedad con la ayuda de un rotaevaporador acoplado a una bomba de alto vacío a una temperatura no mayor de 50 °C.

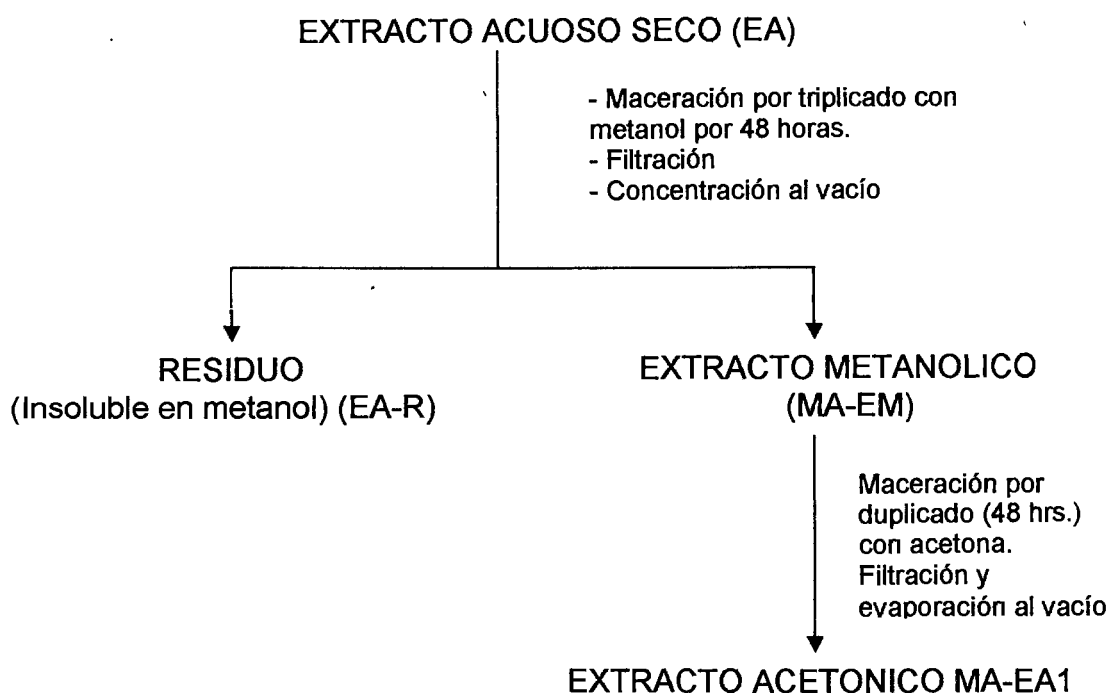


Figura 3. Procedimiento seguido para la obtención del extracto metanólico (MA-EM) a partir del extracto acuoso (EA) y el extracto acetónico (MA-EA) a partir de MA-EM.

Para la obtención del extracto acetónico y el de acetato de etilo (AcOEt), se procedió de manera similar a la marcha seguida para la preparación del extracto metanólico (Figura 4). Se realizó la extracción por triplicado con volúmenes apropiados de acetona y acetato de etilo respectivamente. Se dejaron macerar las

mezclas en cada caso durante tres días. Los residuos obtenidos se sometieron a análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) para determinar su complejidad y la probable fase móvil que se utilizaría durante los análisis en HPLC.

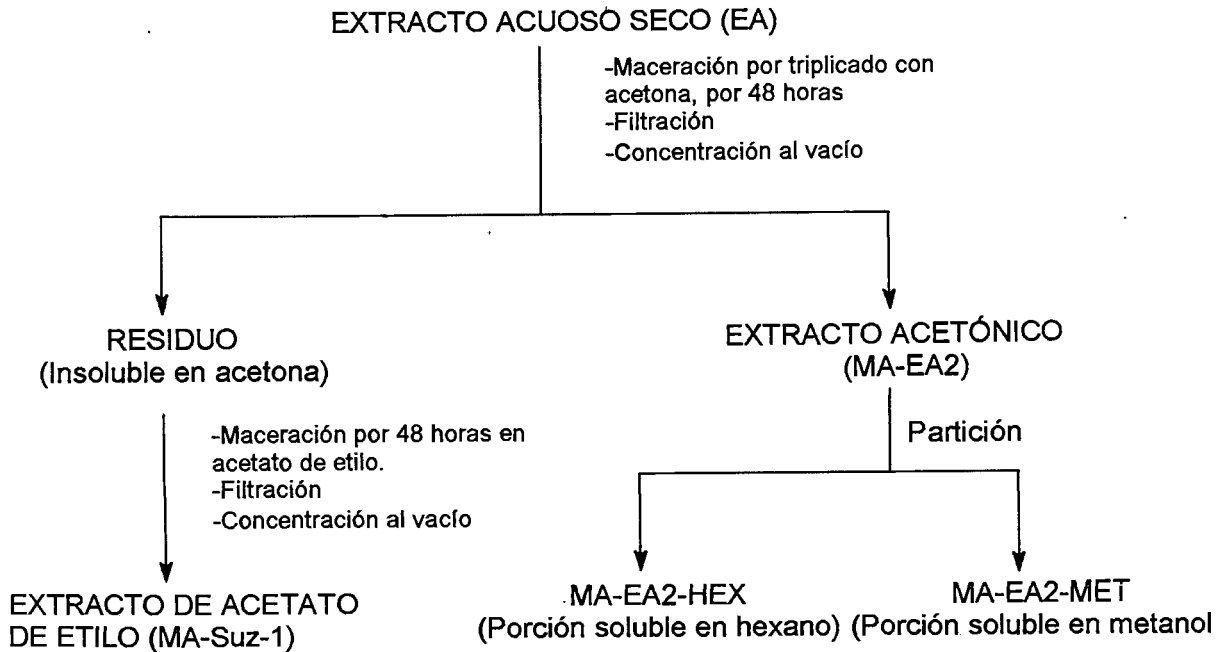


Figura 4. Preparación de los extractos acetónico (MA-EA2) y de acetato de etilo (MA-Suz-1) a partir del Extracto Acuoso (EA).

Se utilizaron además de los extractos anteriormente mencionados, las fracciones metanólicas provenientes de un extracto acuoso de *Millepora alcicornis* denominadas en dicho proyecto como MA-7 y MA-8 del estudio previo llamado "Caracterización química y farmacológica del extracto acuoso de *Millepora alcicornis*" (García, 2004).

V.2.2. Análisis de los extractos mediante CCF

Con el fin de determinar la complejidad de los extractos MA-EA1, MA-EA2 y EA-R, así como facilitar la elección de los sistemas de elución, se recurrió a la CCF. Se hicieron cromatografías en las cuales se emplearon cromatofolios recubiertos de gel de sílice (silica gel 60 F₂₅₄, Merck). Los sistemas de elución para todos los extractos se muestran en el Cuadro 3. Una pequeña cantidad de cada extracto disuelto en cloroformo fue aplicada en los cromatofolios utilizando capilares de vidrio. Posteriormente se introdujeron dentro de la cámara para cromatografía con el respectivo sistema eluyente.

Para detectar la presencia de los constituyentes de los extractos en las placas cromatográficas, se dejó evaporar el eluyente de la placa y se expuso a la luz de una lámpara con emisión de luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm). Se marcaron las zonas que presentaron fluorescencia y finalmente, las placas se revelaron con sulfato cérico. También se reveló una placa con el reactivo de Dragendorff y utilizando como control positivo el alcaloide cafeína.

Cuadro 3. Sistemas de elución utilizados en CCF.

SISTEMAS DE ELUCIÓN UTILIZADOS EN CCF
Cloroformo
Cloroformo-Acetona (7:3)
Acetona
Cloroformo-Hexano (1:1)
Cloroformo-Hexano (4:6)

V.2.3. Preparación de las soluciones reveladoras para CCF

Sulfato cérico: Para preparar esta solución se adicionaron lentamente 12 g de sulfato cérico amoniacal y 22.5 ml de ácido sulfúrico concentrado a 350 g de hielo picado, agitando lentamente hasta formar una solución homogénea.

Reactivo de Dragendorff. Primero, se preparó una solución stock de la siguiente manera: se disolvieron 2.6 g de subcarbonato de bismuto y 7 g de yoduro de sodio en 25 ml de ácido acético glacial. La mezcla se calentó en baño maría; se dejó reposar durante 12 horas y el precipitado de acetato de sodio se filtró. A 20 ml del filtrado se le adicionaron 8 ml de acetato de etilo, se mezcló y se almacenó en frasco ámbar. Para preparar la solución reveladora de Dragendorff, se adicionaron 25 ml de ácido acético glacial y 60 ml de acetato de etilo a 10 ml de la solución stock.

V.2.4. Implementación de condiciones en HPLC

Para poder fraccionar adecuadamente los extractos a analizar, fue necesario investigar las condiciones óptimas de análisis mediante HPLC. Los parámetros a definir fueron las fases estacionarias, fases móviles, modo de elución (isocrático o gradiente), detector, carga máxima, flujo, etc. Para el fraccionamiento del extracto MA-EA1, así como para la purificación de sus fracciones, se utilizó la columna μ Porasil (3.9 x 300 mm, 125 Å, 10 μ m). La fase móvil fue elegida de acuerdo a la solubilidad del extracto en disolventes poco polares como el diclorometano y hexano. En el caso del análisis del extracto MA-EA2 fueron utilizadas las columnas μ Porasil (3.9 x 300 mm, 125 Å, 10 μ m) para la porción soluble en diclorometano (MA-EA2-HEX) y la μ Bondapak C18 (3.9 x 300 mm, 125 Å, 10 μ m) para la porción del extracto soluble en metanol (MA-EA2-MET). La fase móvil para la porción soluble en diclorometano fue la misma utilizada para el extracto MA-EA1. En cambio, para la porción del extracto soluble en metanol, se utilizó como fase móvil una mezcla de disolventes polares, tales como agua y metanol. Las condiciones de inyección para las fracciones metanólicas a purificar fueron las mismas implementadas en el estudio anterior (García, 2004). Se utilizó la columna aminopropilo (NH_2) (3.9 x 300 mm) y como fase móvil, se utilizaron mezclas de disolventes polares como agua y acetonitrilo, con un flujo de 1 ml/min y un volumen de inyección de 50 μ l. Las mezclas de disolventes implementadas en cada caso se detallan en el Cuadro 4. El flujo y el volumen de inyección fueron los mismos para

los extractos MA-EA1 y para ambas porciones del extracto MA-EA2. Se utilizó un flujo de 0.5 ml/min y un volumen de inyección de 50 µl. En todos los casos, se utilizó un detector de índice de refracción (Waters modelo 2410) y uno de arreglo de diodos (Waters modelo 996) a la λ de 254 nm.

Los tiempos adecuados para una resolución aceptable fueron diferentes en cada caso. Para los extractos poco polares, el tiempo máximo de inyección fue de 50 minutos. En el caso de las fracciones metanólicas y de la porción soluble en metanol de MA-EA2 los tiempos de inyección fueron de 25 minutos.

Cuadro 4. Fases móviles utilizadas para el fraccionamiento de los extractos en HPLC.

EXTRACTO/FRACCIÓN	FASE MÓVIL ELEGIDA
MA-EA1	Hexano - diclorometano (1:1:)
MA-EA2-HEX Porción soluble en diclorometano	Hexano - diclorometano (1:1:)
MA-EA2-MET Porción soluble en metanol	Metanol - agua (7:3)
Fracciones metanólicas MA-7 y MA-8	Acetonitrilo - agua (8:2)

V.2.5. Fraccionamiento de los extractos y purificación de los compuestos

Una vez determinadas las condiciones óptimas de máxima resolución de los constituyentes, se procedió a llevar a cabo un escalamiento a nivel preparativo para la purificación final de los mismos. De manera que el procedimiento realizado repetidas veces permitió el fraccionamiento de los extractos y la purificación de algunos de sus componentes. Todas las fracciones obtenidas a partir de los diferentes extractos se llevaron a sequedad con ayuda del rotaevaporador a temperaturas no mayores de 50 °C, evitando así la posibilidad de descomposición de compuestos termolábiles.

VI. RESULTADOS

Para la realización del presente estudio, se partió de 6.1404 g de extracto acuoso (EA). Los extractos orgánicos se prepararon como se describió anteriormente. Se obtuvieron 2.005 g de extracto metanólico (MA-EM) y un total de 29.99 mg de extracto acetónico (MA-EA1) (Figura 3). El peso del extracto MA-EA2 (Figura 4) proveniente directamente del extracto acuoso EA fue de 41.4 mg. Finalmente, el peso del extracto de acetato de etilo (MA-Suz-1) fue de 23.94 mg (Figura 4).

VI.1. Purificación de las fracciones metanólicas

Para la purificación de las fracciones metanólicas MA-7 Y MA-8 (ver punto V.4.1) se dispusieron de 20.99 mg de MA-7 y de 14.69 mg de MA-8. Ambas fracciones metanólicas fueron inyectadas repetidas veces en el cromatógrafo de líquidos con el objetivo de purificar sus constituyentes individuales.

VI.2. Tratamiento de los extractos

Los extractos fueron analizados mediante CCF en los diferentes sistemas de elución y posteriormente se revelaron con sulfato cérico. Asimismo, se realizó la prueba de alcaloides a todos los extractos orgánicos obtenidos, utilizando el revelador de Dragendorff.

El análisis mediante HPLC del extracto acetónico MA-EA1 generó el cromatograma de la Figura 5. Su espectro infrarrojo (IR) registrado se muestra en la Figura 6.

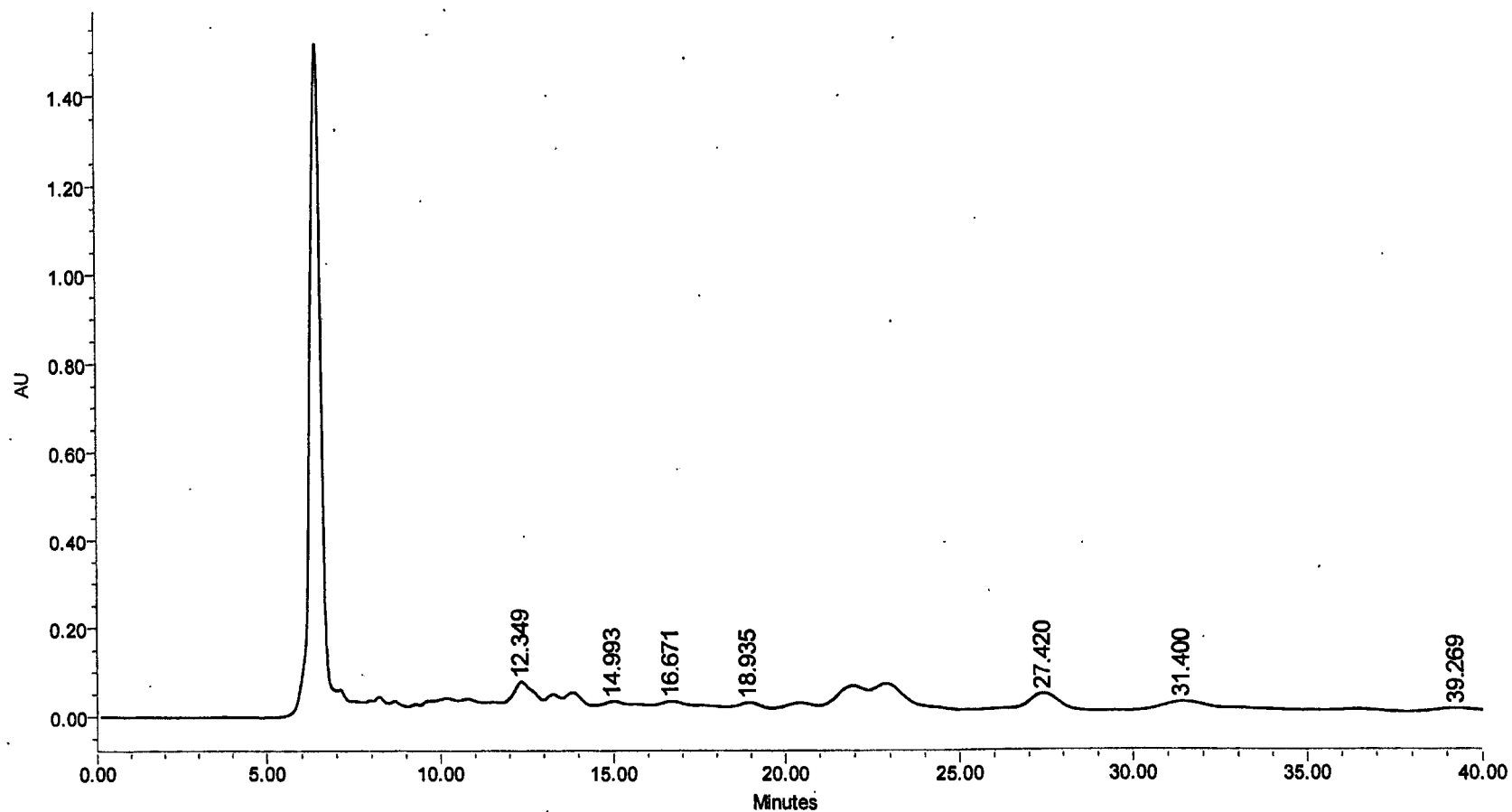


Figura 5. Cromatograma obtenido del extracto MA-EA1. Condiciones de análisis: Columna, Microporasil; fase móvil: Hexano-diclorometano 1:1; flujo, 0.5 ml/min; detector, UV-visible 486, a $\lambda = 254$ nm.

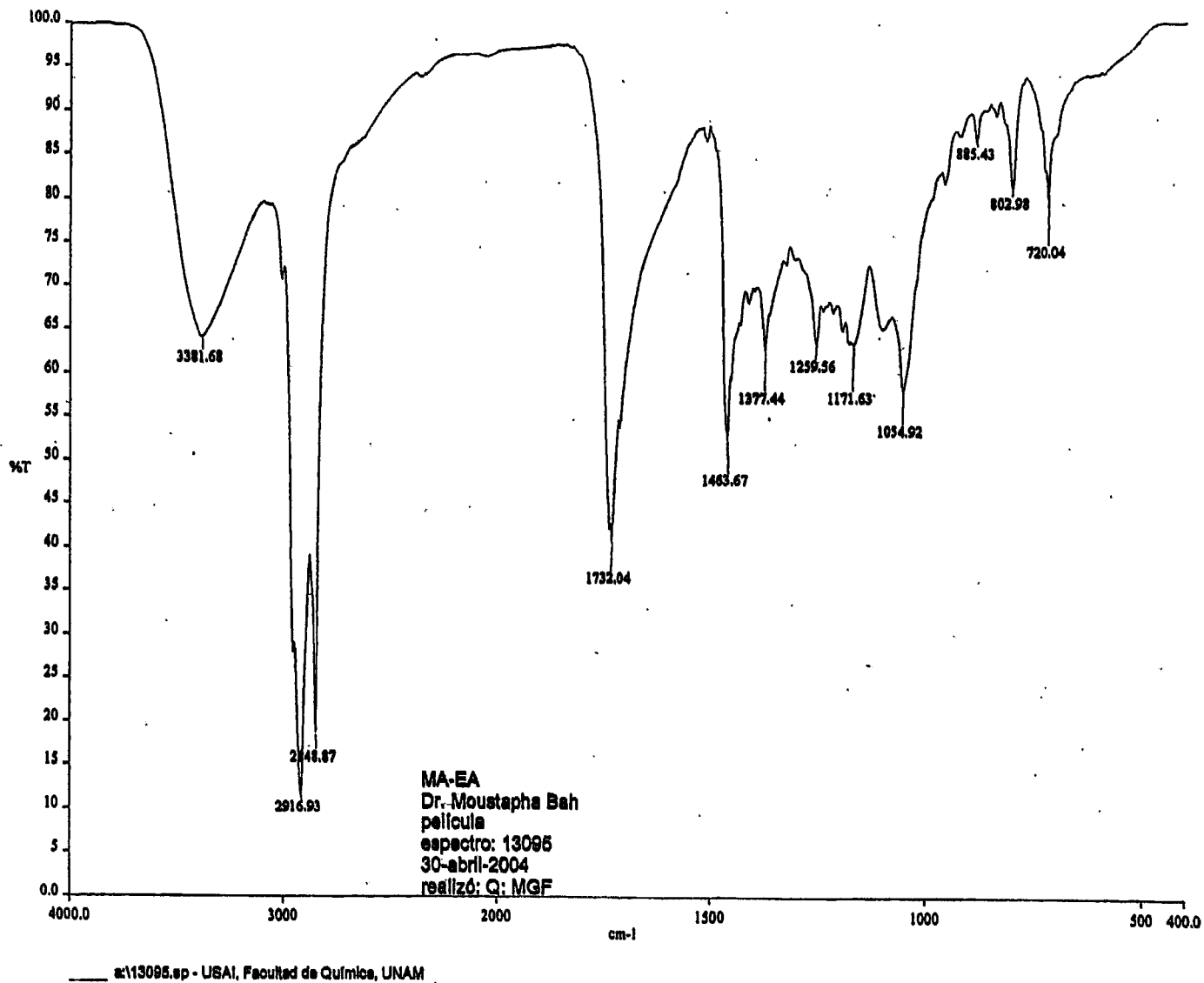


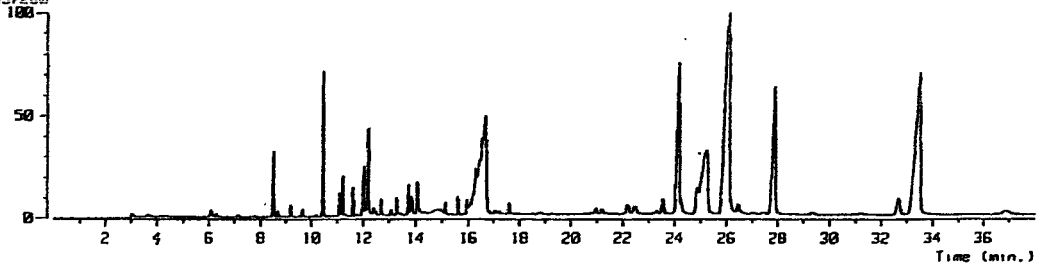
Figura 6. Espectro IR del extracto MA-EA1.

Se llevó a cabo un análisis mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) del extracto acetónico MA-EA1. Los diferentes fragmentos generados en los espectros de masas (ver Figura 7 y ANEXO) obtenidos por impacto electrónico para algunos de los constituyentes individuales se resumen en el Cuadro 5, de acuerdo a sus tiempos de retención (Rt) y los correspondientes fragmentos de masa/carga (m/z) generados por cada constituyente. El pico base (100% de abundancia) se indica entre paréntesis. También se le registraron sus espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H , 400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz) (Figuras 8 y 9).

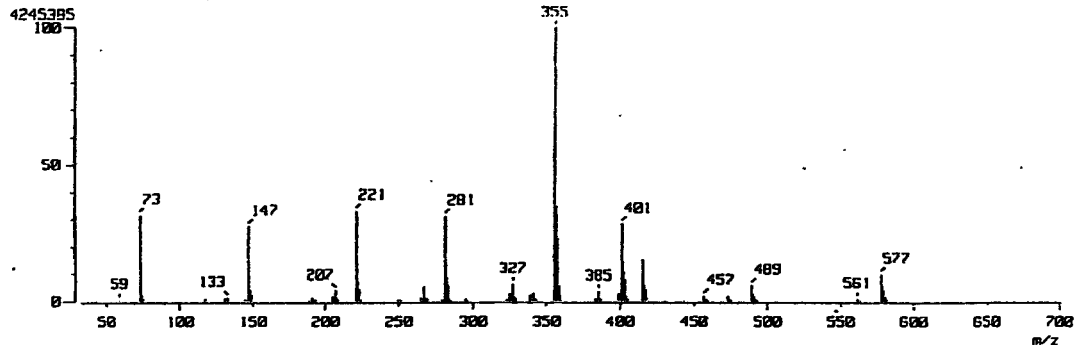
Cuadro 5. Principales fragmentos de los componentes individuales del extracto acetónico de *Millepora alcicornis* (ver también Figura 7).

Rt = 8.49 min: <i>m/z</i> 59, 73, 133, 147, 207, 221, 281, 327, 355 (100%), 385, 401, 429, 457, 489, 561, 577	Rt = 10.46 min: <i>m/z</i> 59, 73, 133, 147, 207, 221, 281, 327, 341, 355, 401, 429 (100%), 459, 475, 531, 563, 635, 651
Rt = 11.10: <i>m/z</i> 43, 57, 69, 83, 97, 111, 125, 139, 149 (100%), 167, 196, 223	Rt = 11.21: <i>m/z</i> 91, 133, 135, 156, 187, 195, 239, 253, 267, 297, 311, 327, 342, 375, 389, 405 (100%)
Rt = 11.61 min: <i>m/z</i> 43, 57, 69, 74 (100%), 87, 129, 143, 171, 185, 199, 239, 270	Rt = 12.17 min: <i>m/z</i> 57, 73, 133, 147, 207, 221, 267, 281, 341, 355, 401, 415, 429, 461, 503 (100%), 565, 637, 725
Rt = 13.79 min: <i>m/z</i> 43, 73, 143, 147, 185, 207, 221, 281, 295, 341, 355 (100%), 401, 415, 429, 461, 503, 535, 577	Rt = 14.07 min: <i>m/z</i> 43, 57, 60, 73, 85, 129, 171, 185, 199, 227, 241, 284 (100%) (2 CH ₂ más que el componente de M ⁺ = 256)
Rt = 16.66 min: <i>m/z</i> 43, 57, 71, 83, 85, 97, 111, 125, 139, 196, 224, 257, 285 (100%), 312, 508	Rt = 24.13 min: <i>m/z</i> 43, 57, 81, 95, 107, 145, 161, 213, 231, 255, 275, 301, 368, 386 (100%)
Rt = 25.13 min: <i>m/z</i> 43, 57, 69, 71, 83, 85, 97, 111, 125, 129, 139, 224, 252, 284, 285 (100%), 313, 340, 381, 536	Rt = 25.81 min: <i>m/z</i> 55, 69, 81, 83, 105, 107, 145, 213, 229, 255, 271, 300, 314 (100%), 365, 383, 398
Rt = 26.07: <i>m/z</i> 43, 81, 95, 107, 145, 159, 213, 231, 255, 273, 289, 315, 367, 382, 400 (100%)	Rt = 27.86 min: <i>m/z</i> 43, 57, 69, 71, 83, 85, 97, 111, 196, 224, 256, 257 (100%), 285, 312, 480
Rt = 32.66 min: <i>m/z</i> 43, 55, 69, 82, 83, 97, 111, 180, 222, 239, 250, 264 (100%), 331, 415, 429, 503, 506	Rt = 33.47 min: <i>m/z</i> 43, 57, 69, 83, 97, 111, 125, 139, 196, 224, 239, 257, 285 (100%), 312, 340, 508

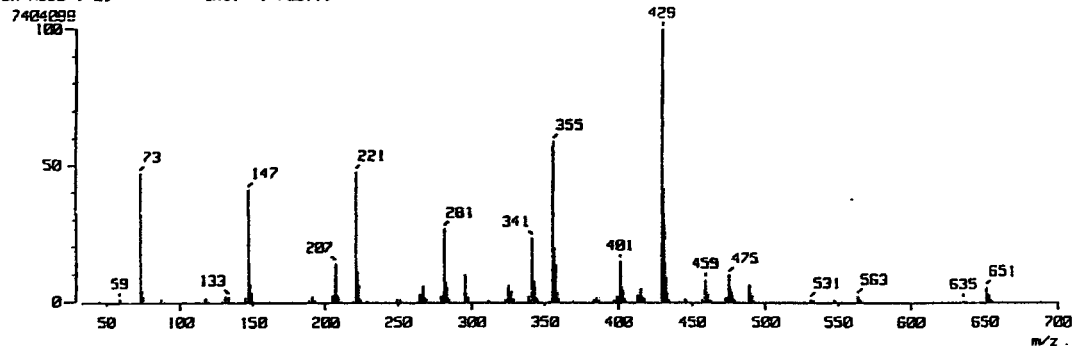
[TIC]
 Data : OT0234_MA-EA_002 Date : 04-May-2004 16:06
 Sample:
 Note :
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 8.00 to 38.00 min
 !!5897288



[Mass Spectrum]
 RT : 8.49 min Scan# : (599,603)-k((563,577))[k=1.0]
 Ion Mode : EI+ Int. : 404.87



[Mass Spectrum]
 RT : 10.46 min Scan# : (739,741)-k((753,770))[k=1.0]
 Ion Mode : EI+ Int. : 785.11



[Mass Spectrum]
 RT : 11.10 min Scan# : (784,787)-k((800,809)+(757,764))[k=1.0]
 Ion Mode : EI+ Int. : 137.56

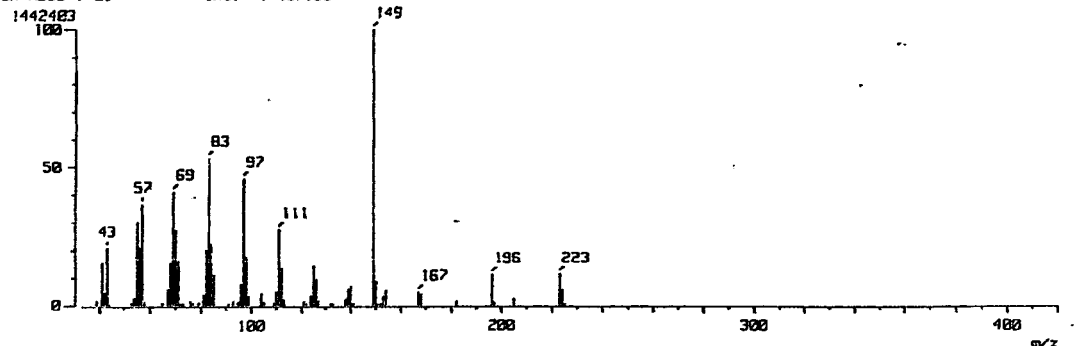


Figura 7. Cromatograma de gases y espectros de masas de algunos de los componentes mayoritarios del extracto MA-EA1.

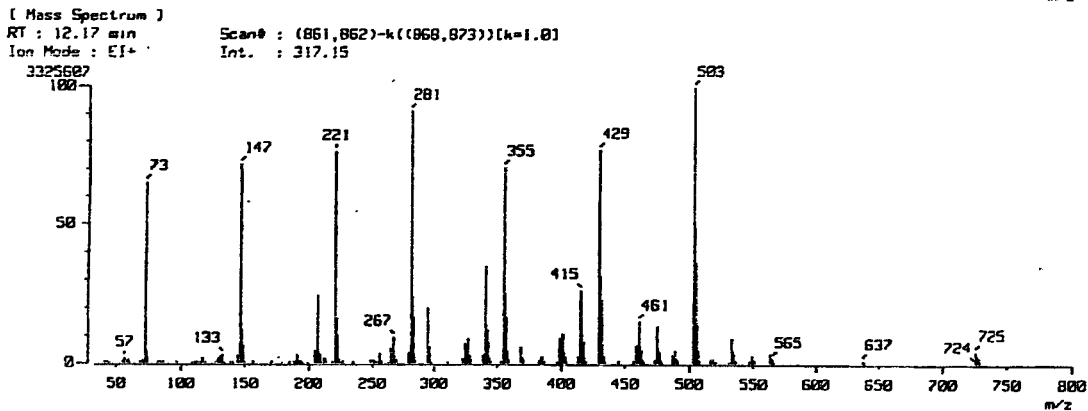
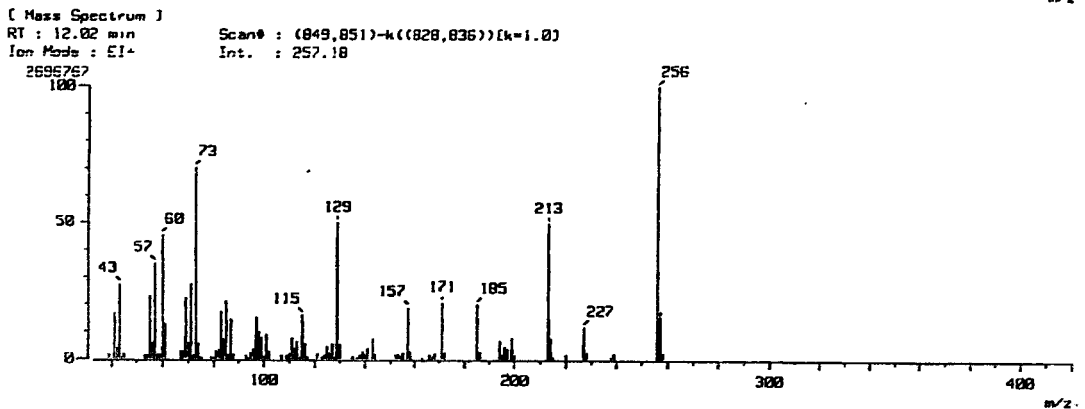
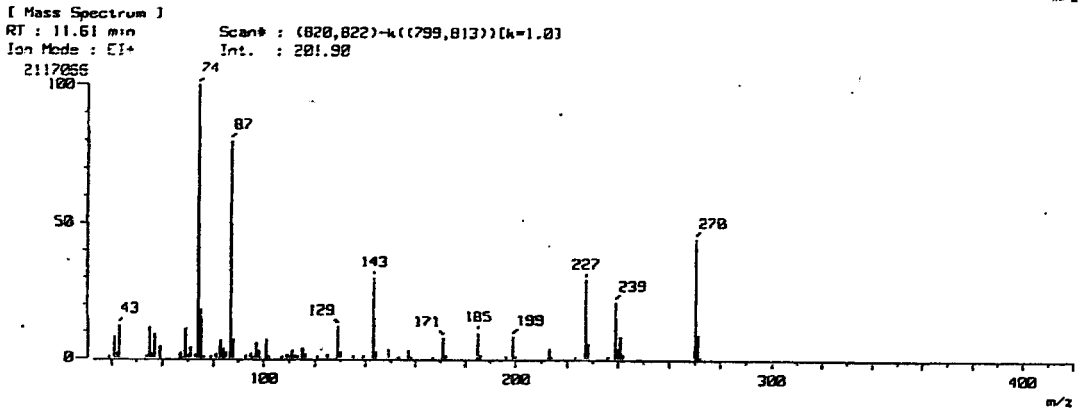
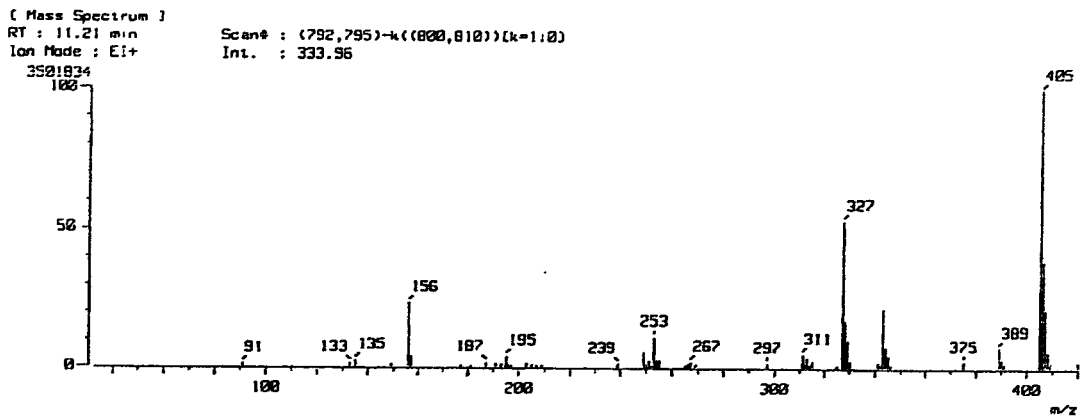


Figura 7. Cromatograma de gases y espectros de masas de algunos de los componentes mayoritarios del extracto MA-EA1 (continuación).

Ref. CDCl₃ 7.26 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: zgpg30

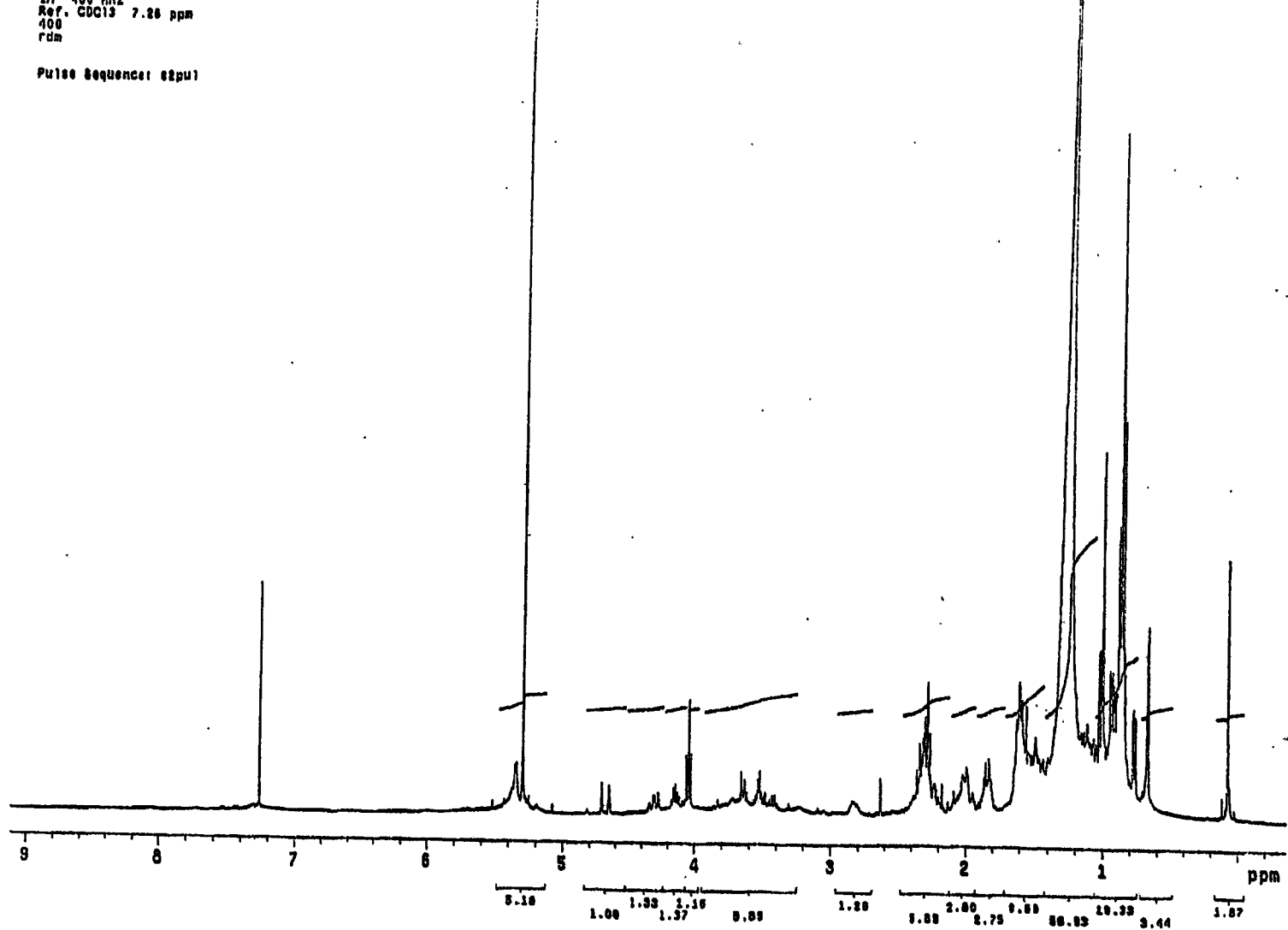


Figura 8. Espectro RMN ¹H del extracto MA-EA1 (400 MHz).

11/MAY0/2004
Dr. Rogelio Pereda / MAbel Fragoso
MA-EA / CDCl₃
13C 100 MHz
Ref. CDCl₃ 77 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: s2pu1

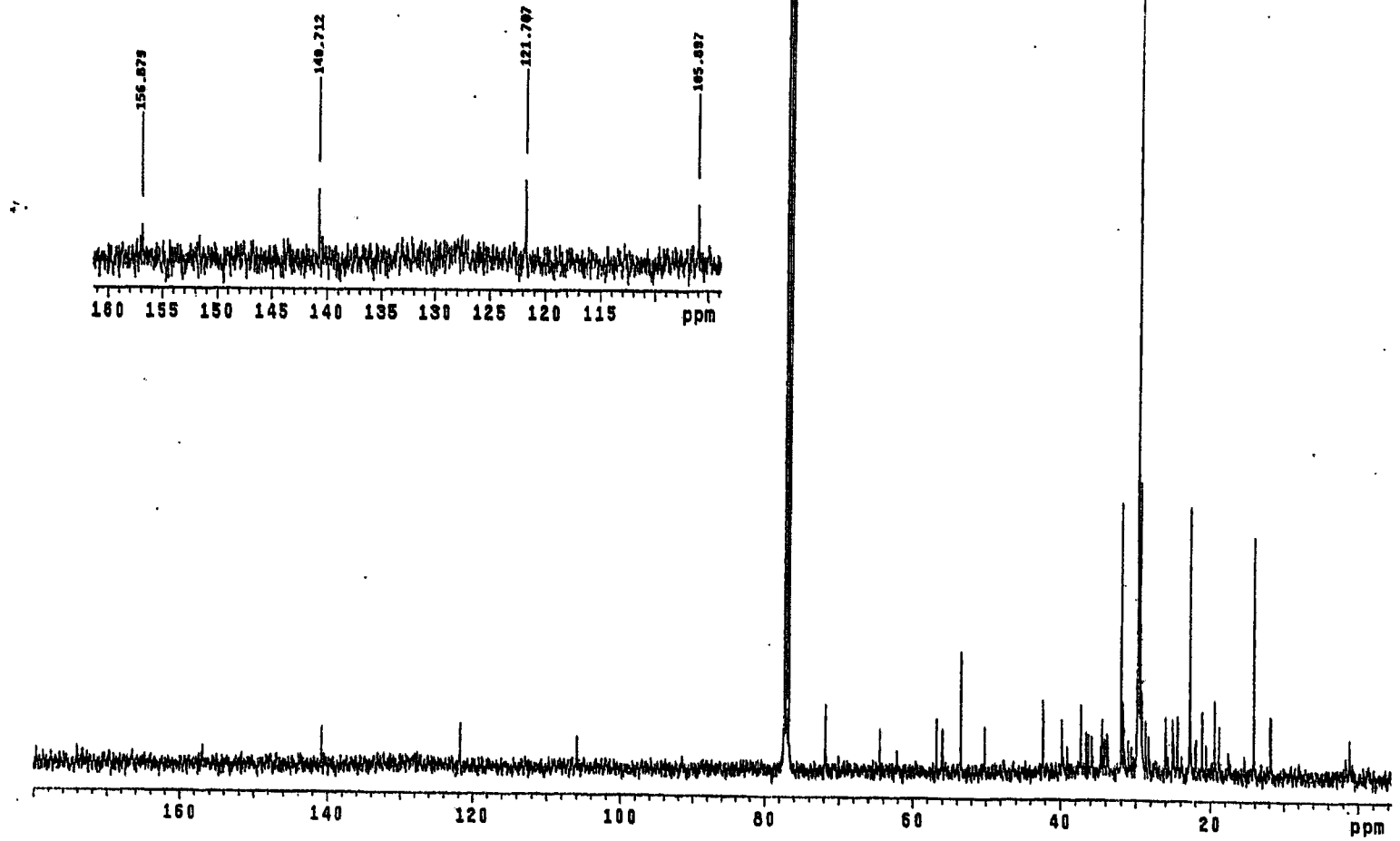


Figura 9. Espectro RMN ¹³C del extracto MA-EA1 (100 MHz).

Debido a que el extracto MA-EA2 constaba de dos porciones, una soluble en hexano (MA-EA2-HEX) y la otra en metanol (MA-EA2-MET), se obtuvieron dos cromatogramas en el análisis mediante HPLC, los cuales se presentan en las Figuras 10 y 11 respectivamente.

En cuanto al extracto MA-Suz-1, éste fue analizado por espectroscopía infrarroja (Figura 12). En la Figura 13 se muestra el espectro de masas del extracto y en las Figuras 14y 15 los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C .

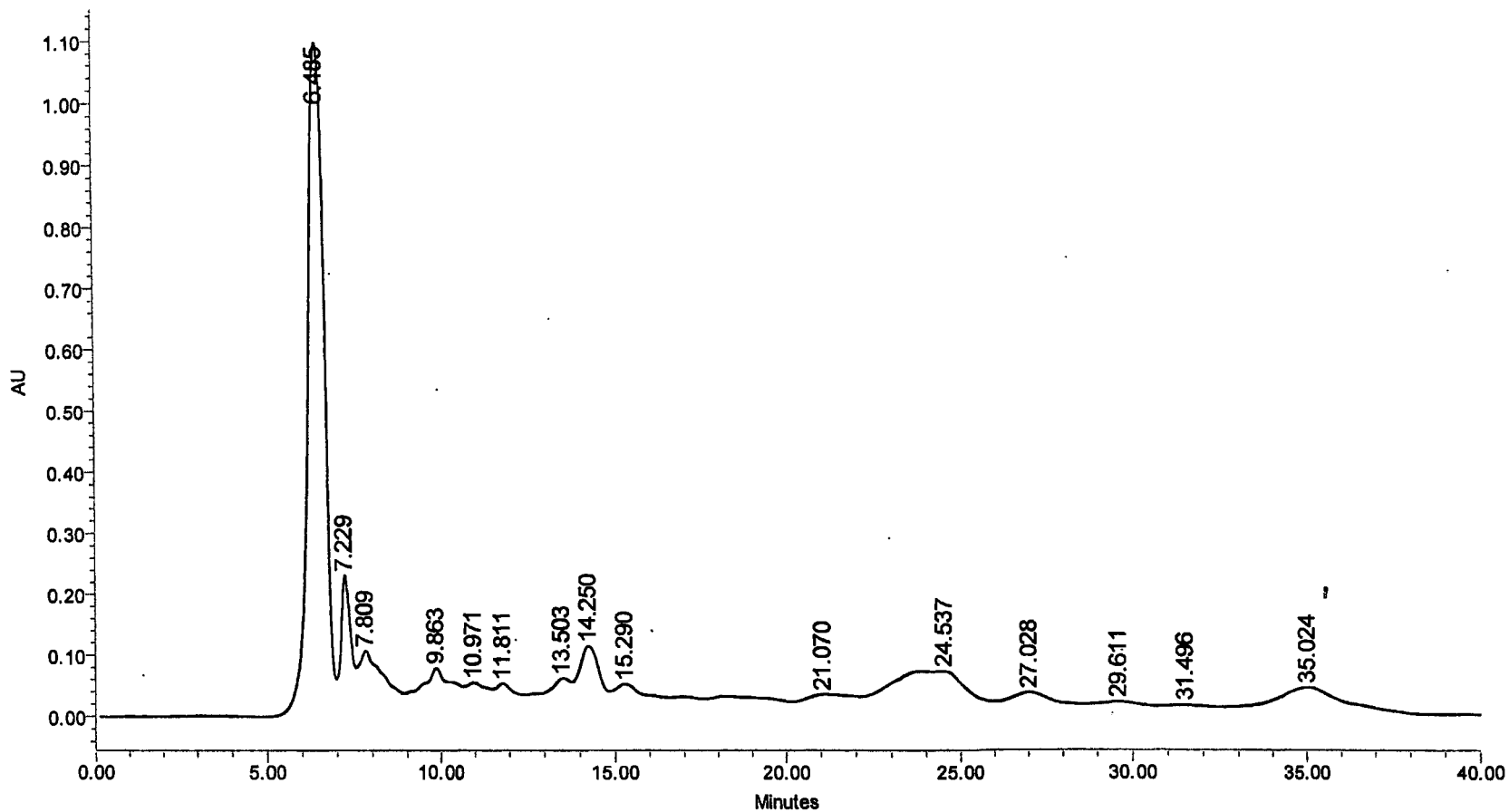


Figura 10. Cromatograma de la porción MA-EA2-HEX. Condiciones de análisis: Columna, Microporasil; fase móvil: Hexano-diclorometano 1:1; flujo, 0.5 ml/min; detector, UV-visible 486, a $\lambda = 254$ nm.

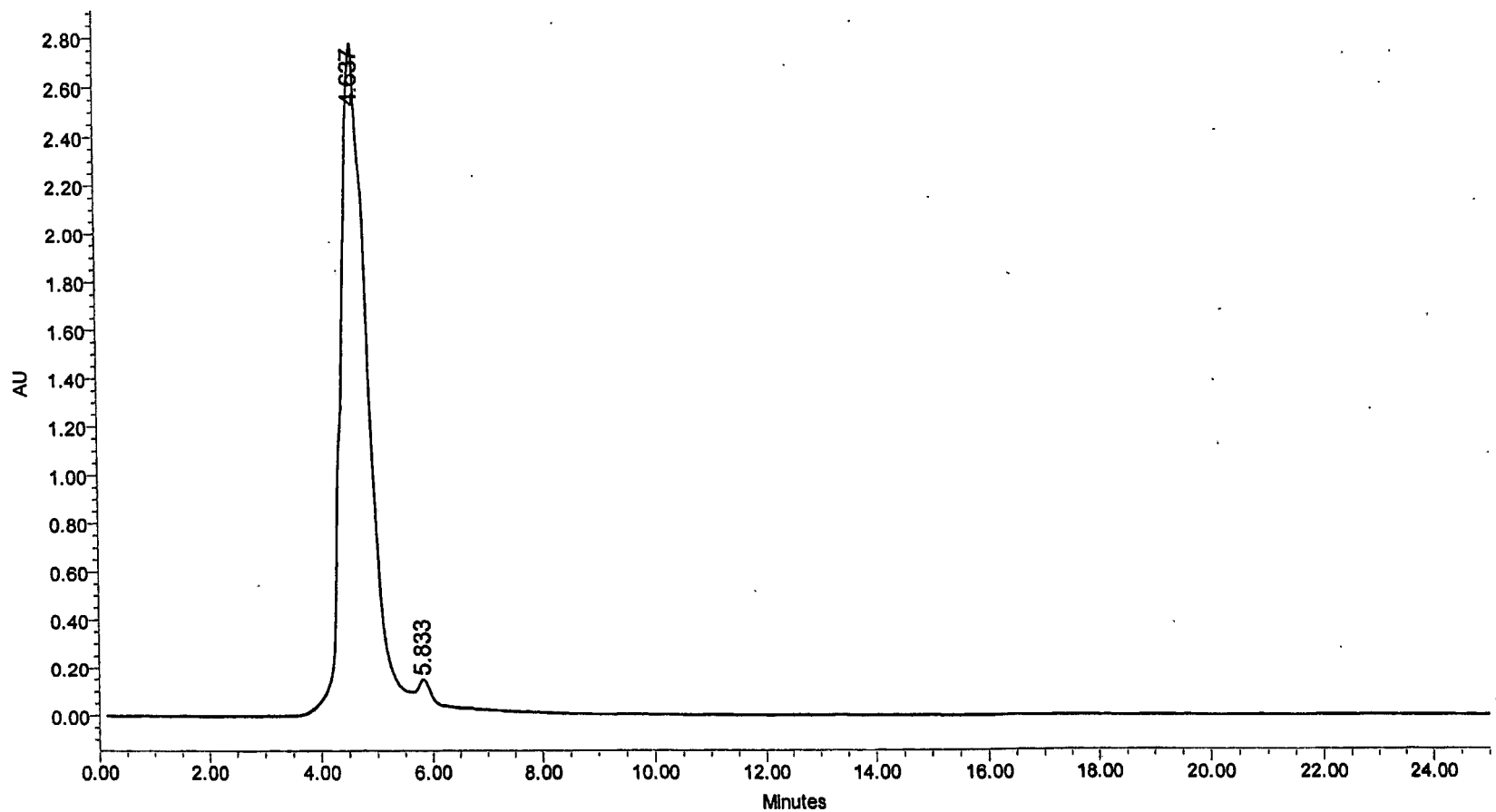


Figura 11. Cromatograma de la porción MA-EA2-MET. Condiciones de análisis: Columna, Nova-Pak C-18; fase móvil: MeOH-H₂O 7:3; flujo, 0.5 ml/min; detector, UV-visible 486, a $\lambda = 254$ nm.

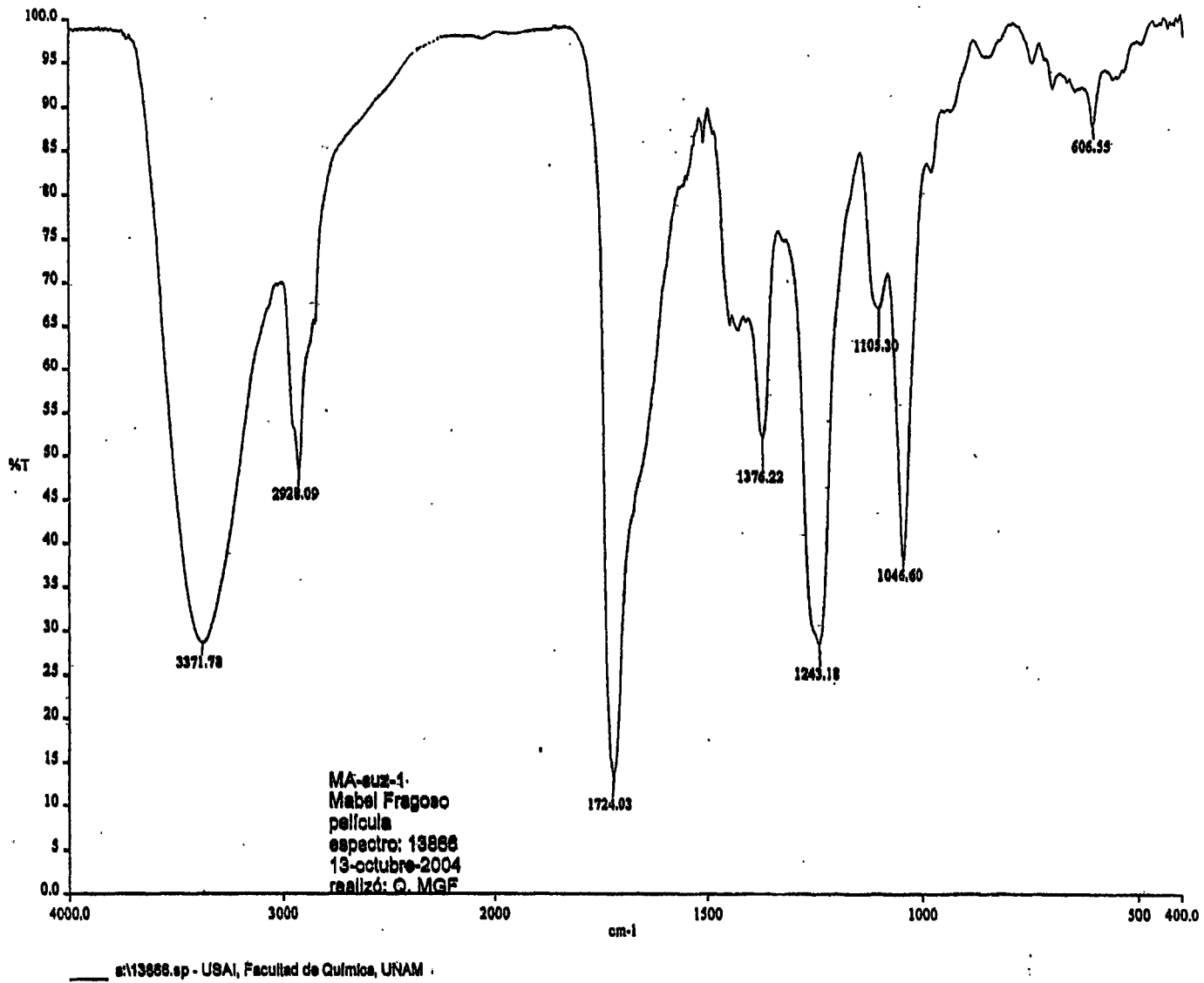
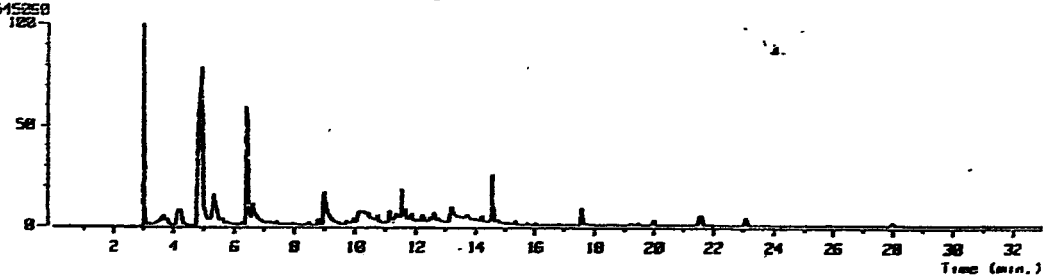


Figura 12. Espectro IR del extracto MA.Suz-1.

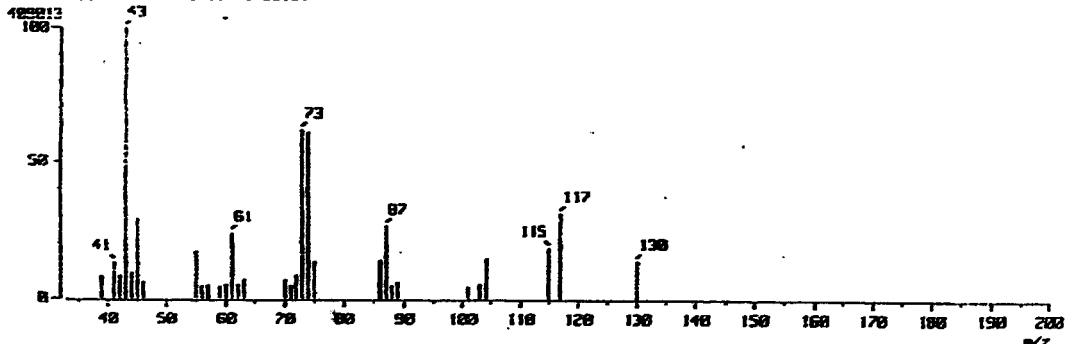
[TIC]
 Data : 019426_FF-SUZ-1_002 Date : 18-Jan-2005 15:10
 Sample : -
 Note : -
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 32.97 min
 14545250



[Mass Spectrum]
 RT : 4.80 min Scan# : (177,180)-k((211,220))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 412.79



[Mass Spectrum]
 RT : 5.32 min Scan# : 194-k((210,220))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 39.01



[Mass Spectrum]
 RT : 6.43 min Scan# : (234,235)-k((263,276))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 374.31

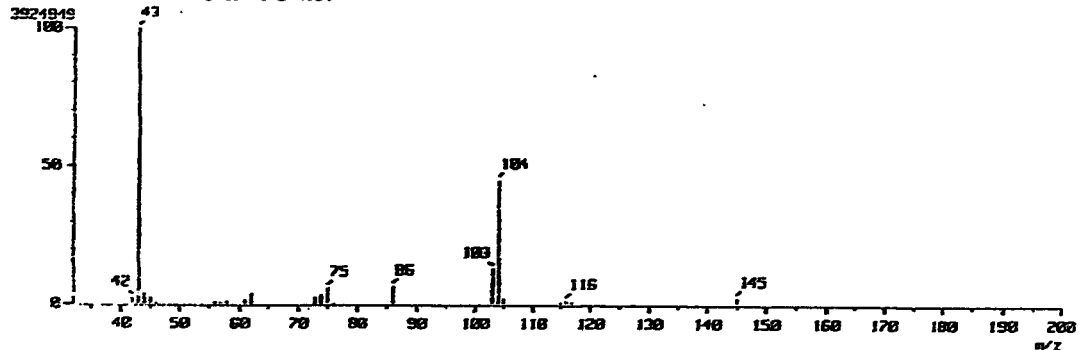


Figura 13. CG-EM del extracto MA-Suz-1.

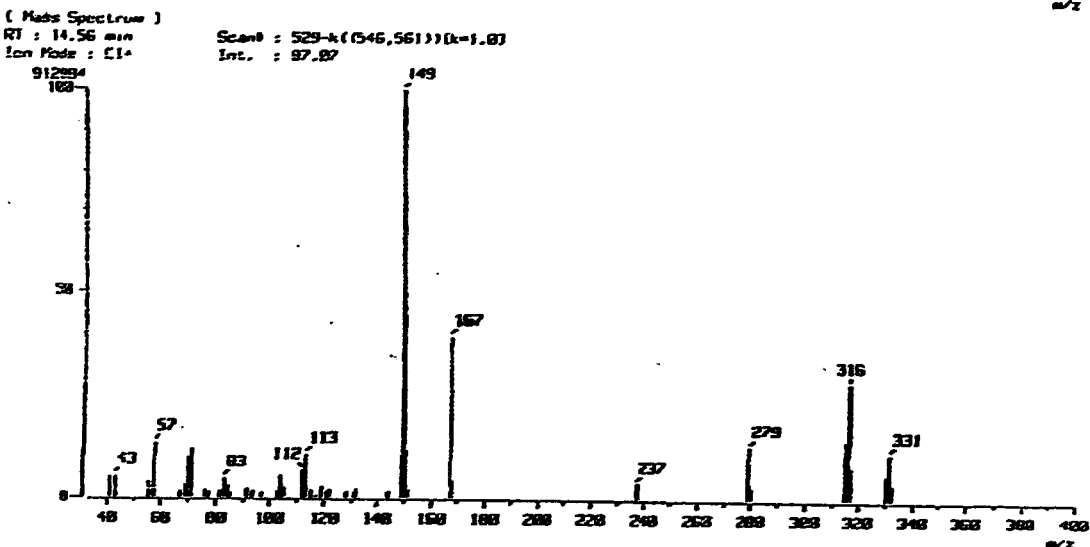
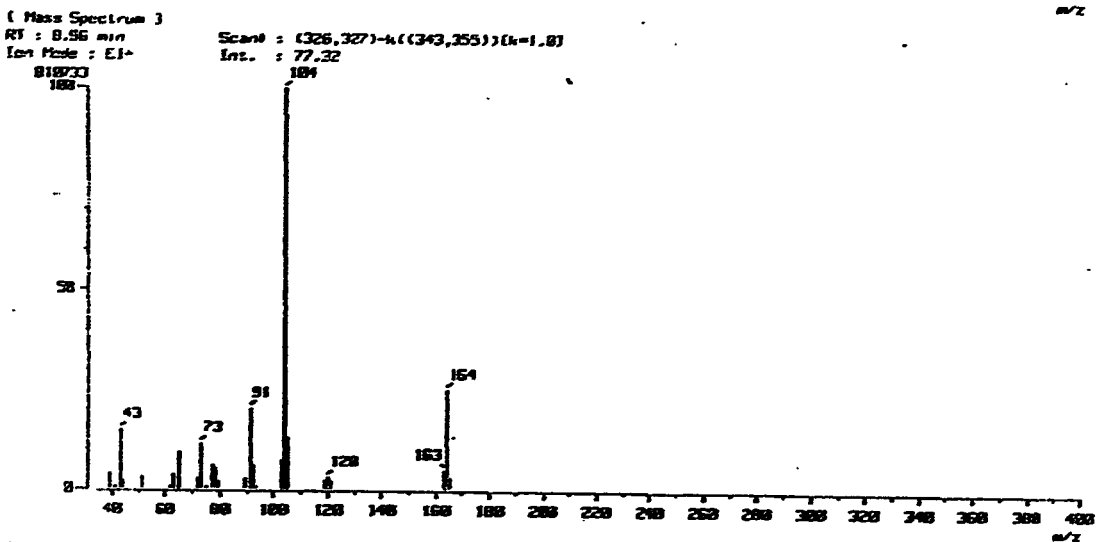
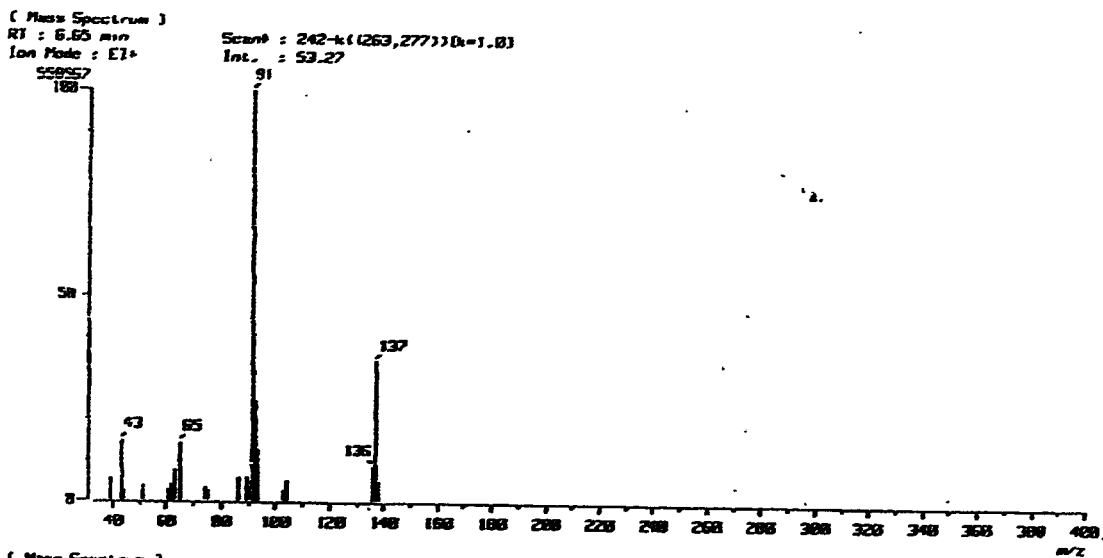


Figura 13. CG-EM del extracto MA-Suz-1 (continuación).

Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso
MA-Suz-1 / CD300
400 MHz
Ref. CD300 3.3 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: zgpg30

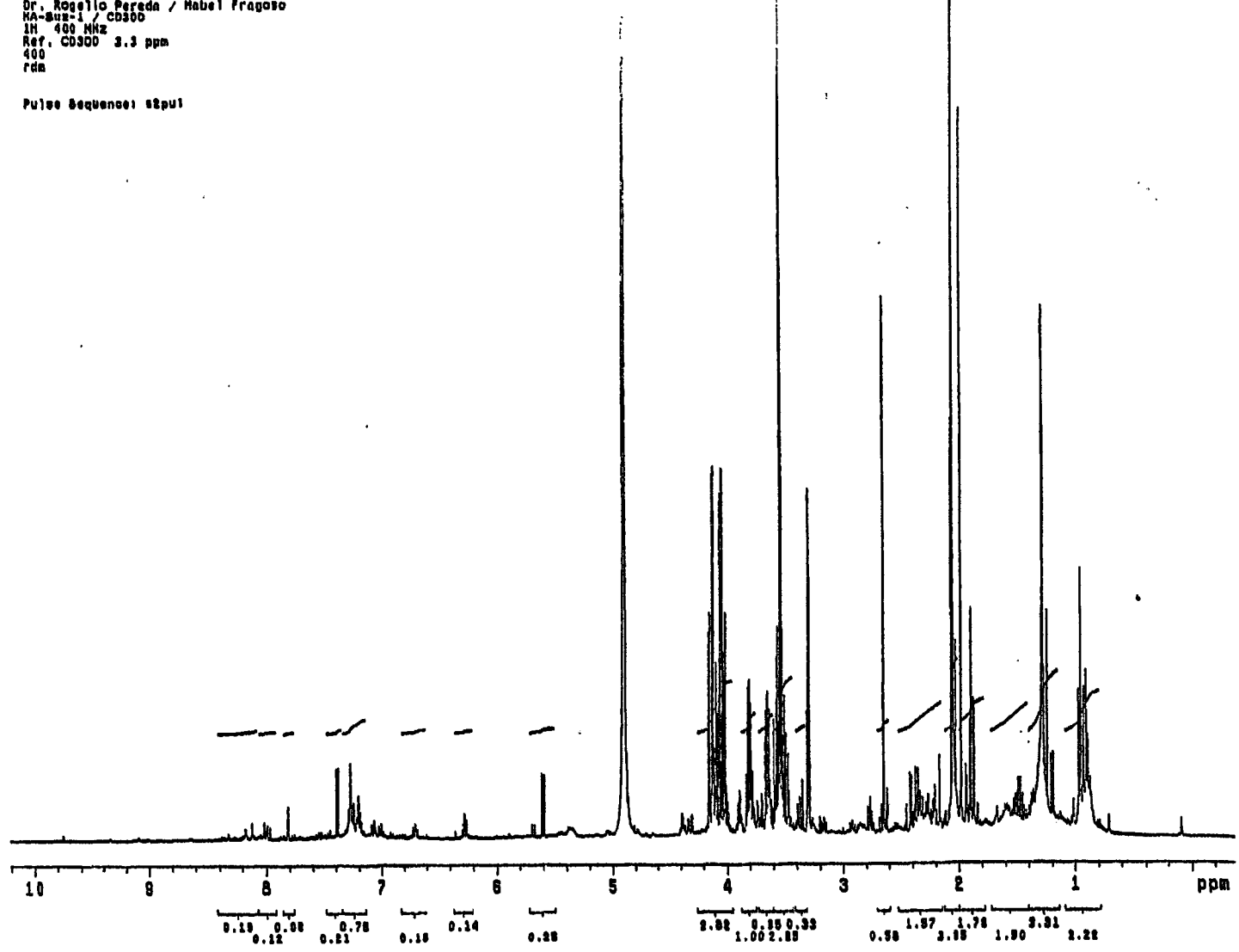


Figura 14. Espectro RMN ¹H (400 MHz) de la muestra MA-Suz-1.

USAI
Dr. Rogelio Parada / Mabel Fragoso
MA-Suz-1 / CD3OD
13C 100 MHz
Ref. CD3OD 49 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: zgpg1

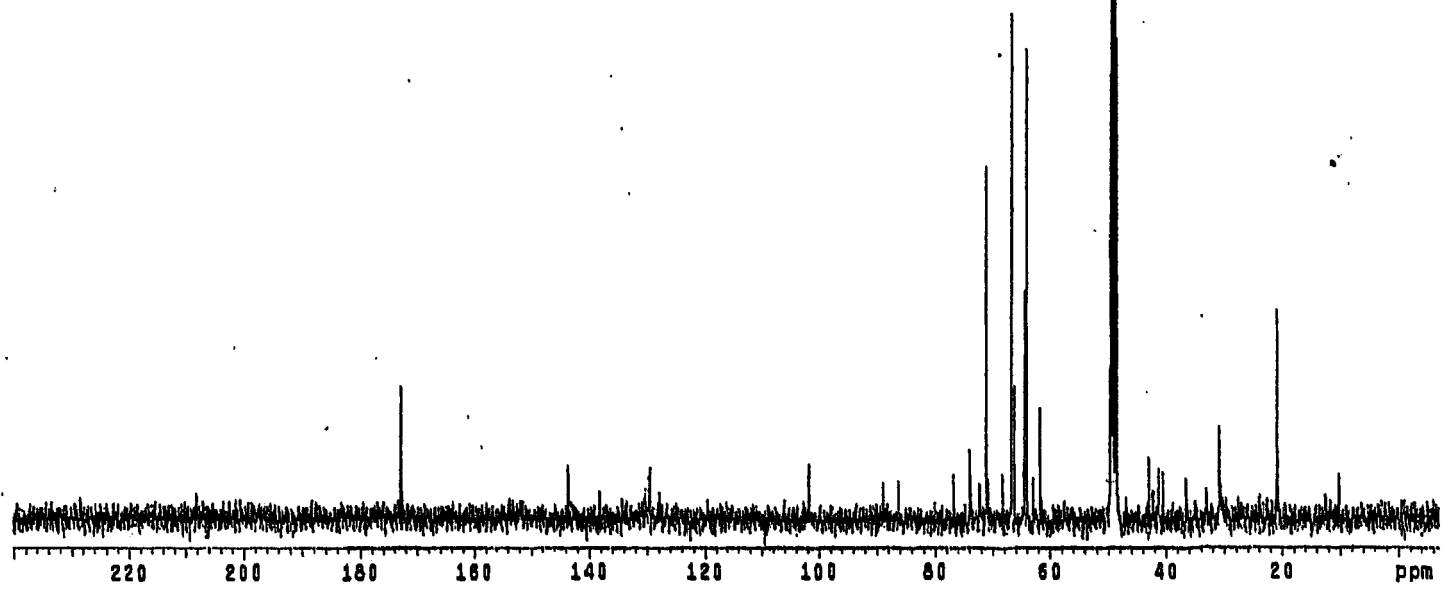


Figura 15. Espectro RMN ¹³C (100 MHz) de la muestra MA-Suz-1.

VI.3. Fraccionamiento de los extractos mediante HPLC

Con la finalidad de obtener algún compuesto puro de los extractos, se recurrió a la cromatografía HPLC. El extracto MA-EA1 (25 mg) se disolvió en hexano y se inyectó repetidas veces a las condiciones anteriormente mencionadas (Sección V.4.4). El extracto MA-EA1 dio como resultado un cromatograma muy complejo (Figura 5). Dada la complejidad del extracto MA-EA1, solo se pudo fraccionar en 9 bandas (1A – 9A). A la parte de ese extracto no detectada en el HPLC, se le denominó como RA (4.35 mg). El procedimiento para el fraccionamiento mediante HPLC del extracto MA-EA1 se resume en la Figura 16. Las fracciones obtenidas fueron llevadas a sequedad y pesadas. El Cuadro 6 muestra los rendimientos de las diferentes fracciones.

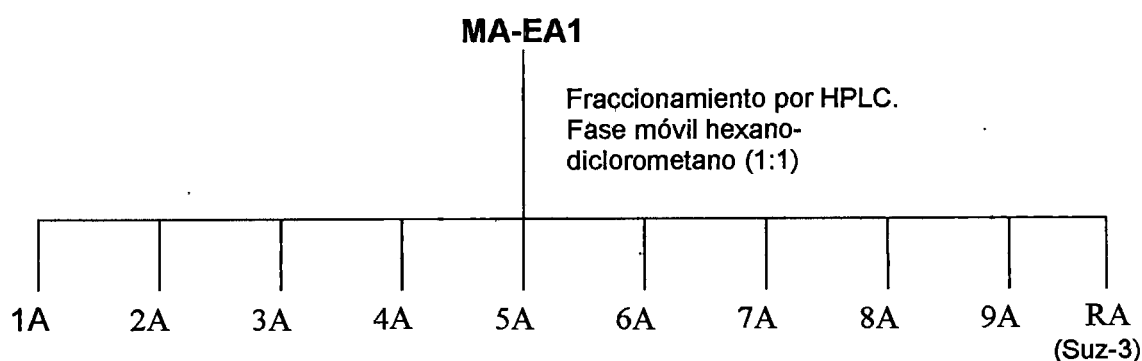


Figura 16. Esquema del fraccionamiento del extracto MA-EA1 mediante HPLC.

Cuadro 6. Intervalos de tiempos de retención y rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto MA-EA1.

DENOMINACION DE LAS FRACCIONES	INTERVALOS DE TIEMPO DE RETENCIÓN	PESOS (mg) DE LAS FRACCIONES RECOLECTADAS
Fr. 1A	5.558 – 7.139	4.66 mg
Fr. 2A	7.498 – 11.479	0.26 mg
Fr. 3A	11.698 – 14.275	4.19 mg
Fr. 4A	14.475 – 17.804	3.54 mg
Fr. 5A	18.126 – 20.954	1.34 mg
Fr. 6A	20.954 – 24.404	0.73 mg
Fr. 7A	25.913 – 29.122	0.63 mg
Fr. 8A	30.206 – 33.052	1.36 mg
Fr. 9A	35.358 – 45.106	0.62 mg

El fraccionamiento del extracto MA-EA2 se realizó como se esquematiza en la Figura 17. El extracto se dividió en dos porciones, una soluble en hexano (MA-EA2-HEX) y la otra en metanol (MA-EA2-MET). Posteriormente se inyectaron las dos porciones de manera independiente.

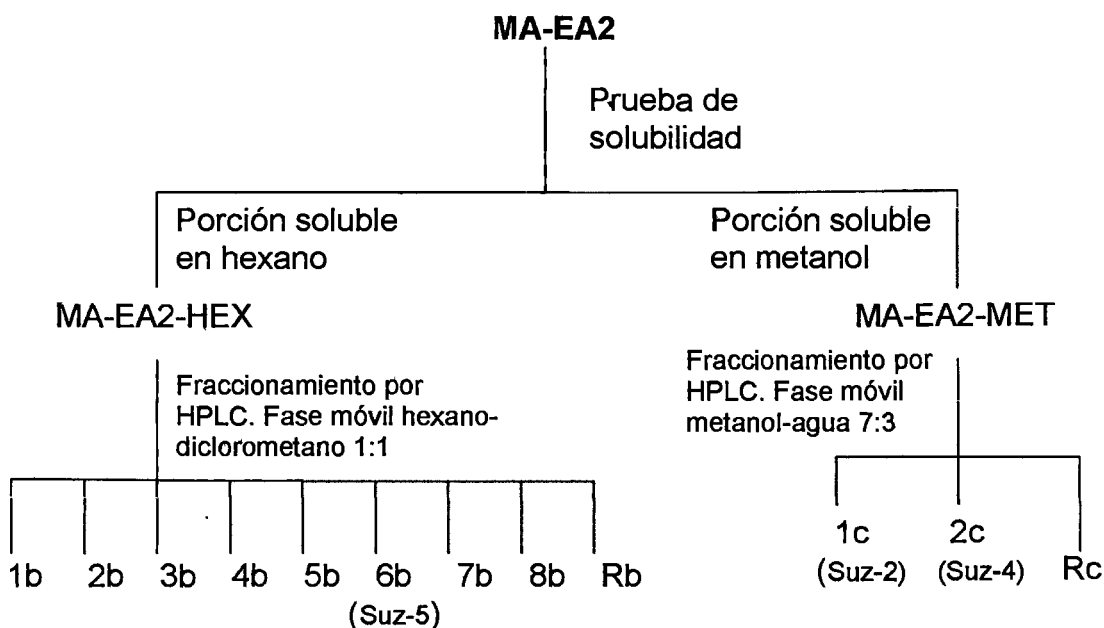


Figura 17. Esquema del fraccionamiento de las dos porciones del extracto MA-EA2 mediante HPLC.

El fraccionamiento de la porción MA-EA2-HEX (soluble en hexano) dio resultados similares al extracto MA-EA1, ya que debido a la complejidad del extracto, solamente se pudo fraccionar en bandas y por lo tanto no se obtuvieron picos puros. En el Cuadro 7 se muestran los intervalos de tiempo de retención, así como los pesos obtenidos para esta porción de extracto acetónico.

Cuadro 7. Intervalos de tiempos de retención y rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto MA-EA2-HEX

DENOMINACION DE LAS FRACCIONES	TIEMPOS DE RETENCIÓN	RENDIMIENTO (mg)
Fr. 1b	5.114 – 6.951	0.27 mg
Fr. 2b	6.951 – 7.507	0.77 mg
Fr. 3b	7.616 – 12.013	3.04 mg
Fr. 4b	13.018 – 14.687	2.31 mg
Fr. 5b	14.687 – 15.687	1.02 mg
Fr. 6b (Suz-5)	21.867 – 25.762	2.97 mg
Fr. 7b	26.205 – 27.988	2.53 mg
Fr. 8b	35.498 – 36.059	0.69 mg

El fraccionamiento de la porción del extracto acetónico MA-EA2-MET dio como resultado dos picos, cuyos tiempos de retención y pesos se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Tiempos de retención y rendimientos de los picos obtenidos del extracto MA-EA2-MET.

PICOS	RENDIMIENTO (mg)	TIEMPO DE RETENCIÓN
Fr. 1c (Suz-2)	8.84 mg.	4.637 min.
Fr. 2c (suz-4)	3.50 mg.	5.833 min.

A los dos picos se les asignaron claves diferentes para los análisis de espectroscopía infrarroja, RMN y de Masas. Así, Suz-2 para el pico 1c y Suz-4 para el pico 2c. Las Figuras 18 y 19 muestran los espectros infrarrojos de los picos Suz-2 y Suz-4 y las Figuras 20, 21 y 22 los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del constituyente MA-Suz-2.

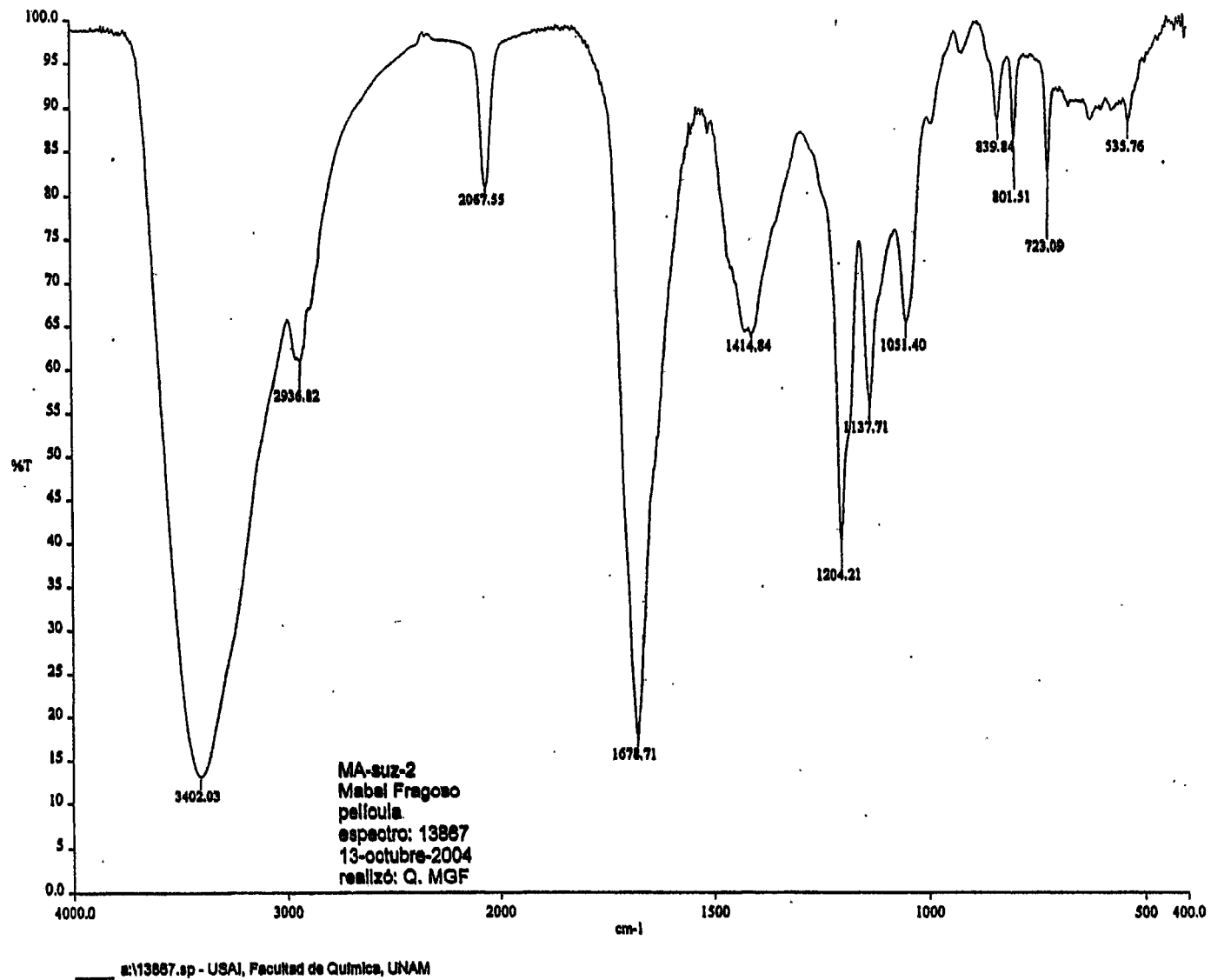
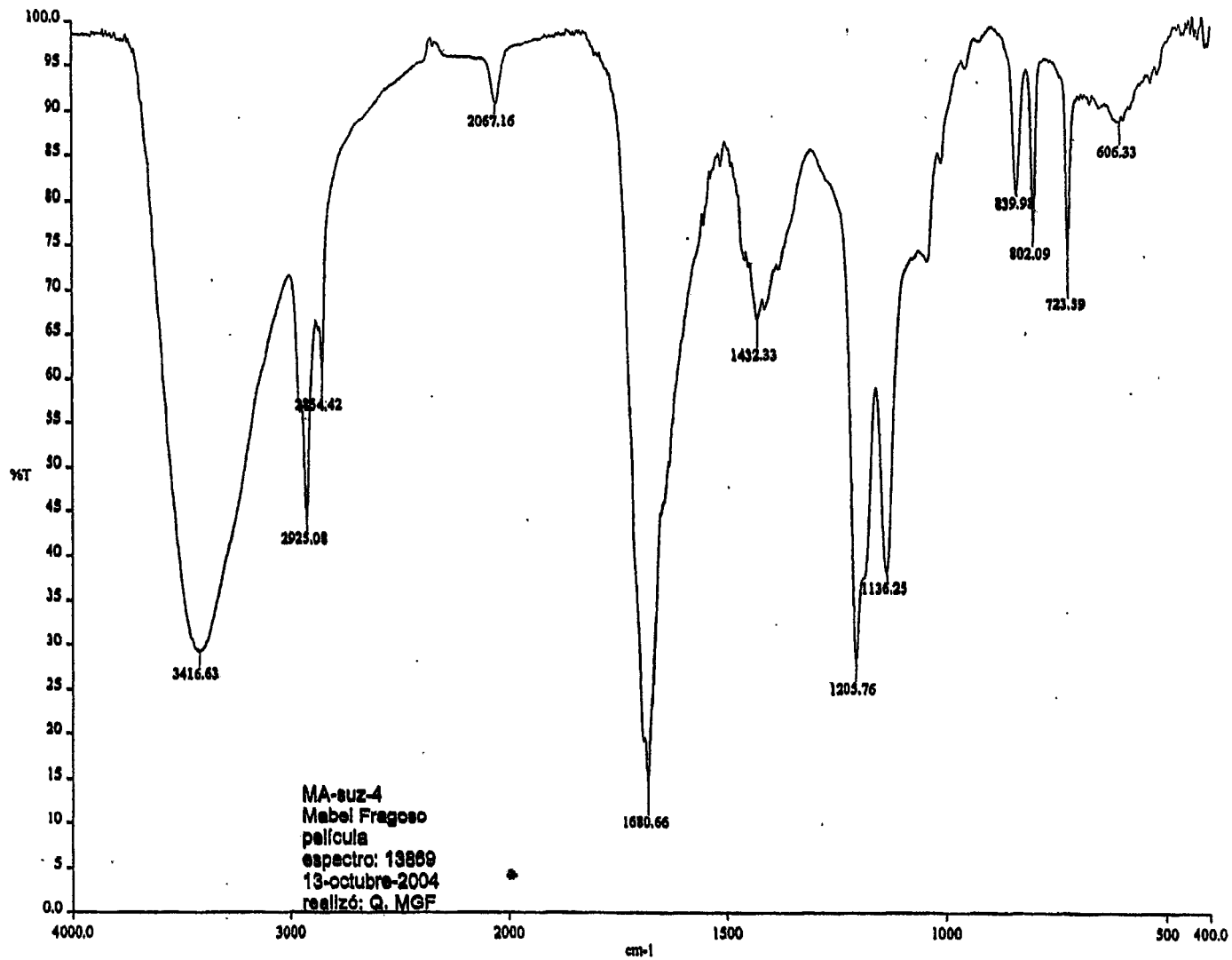


Figura 18. Espectro IR del pico Suz-2.



MA-suz-4
 Mabel Fragozo
 película
 espectro: 13889
 13-octubre-2004
 realizó: Q. MGF

c:\pel_data\spectra\arith.001 - USAI, Facultad de Química, UNAM

Figura 19. Espectro IR del pico Suz-4.

MA-Suz-2 / CD3OD
IH 400 MHz
Ref. CD3OD 3.3 ppm
400
Fid

Pulse Sequence: s2pu1

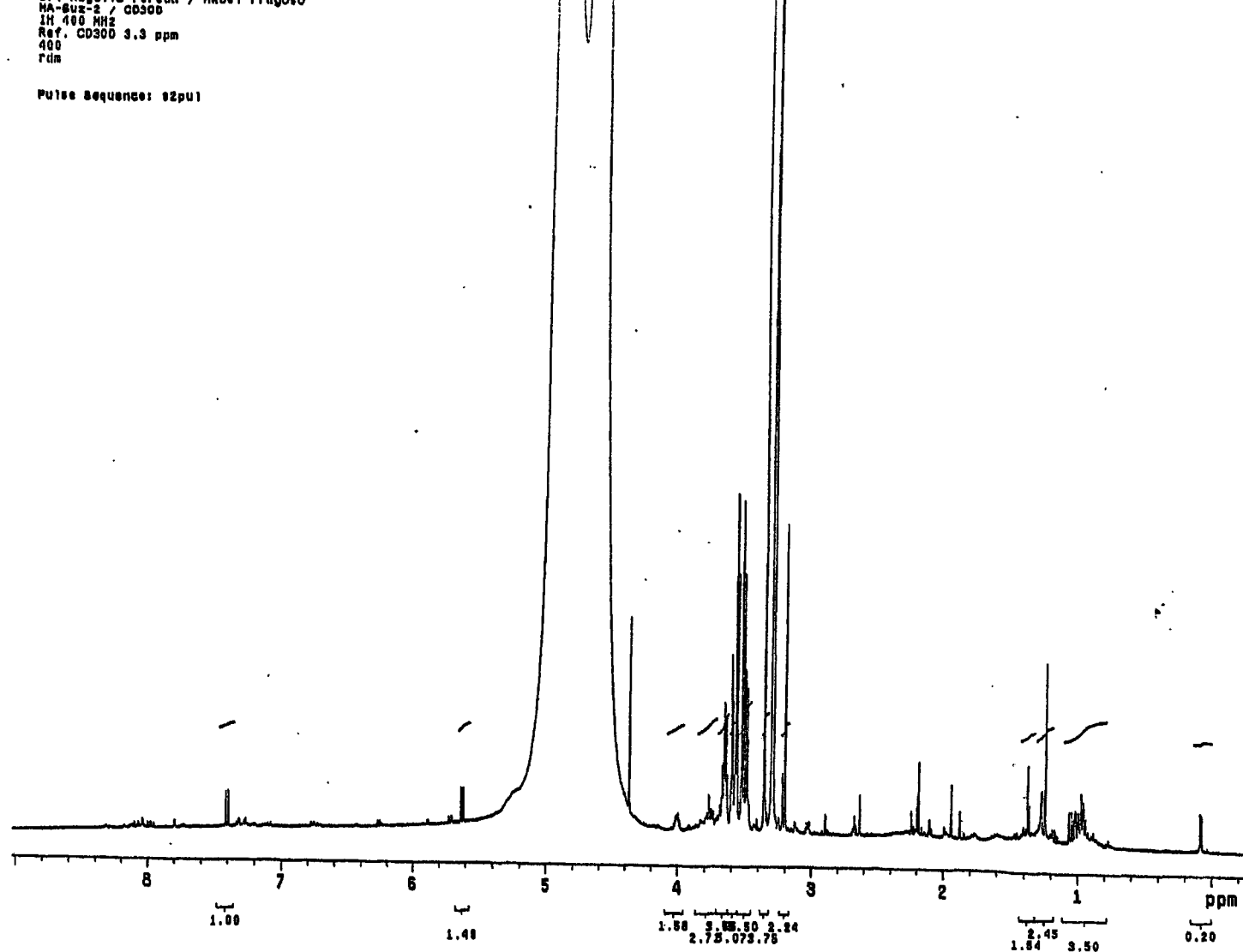


Figura 20. Espectro RMN ^1H (400 MHz) de MA-Suz-2.

25/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Parada / Habael Fragoso
MA-Suz-2 / CD3OD
13C 100 MHz
Ref. CD3OD 48 ppm
400
rdm

Pulse Sequence: s2pu1

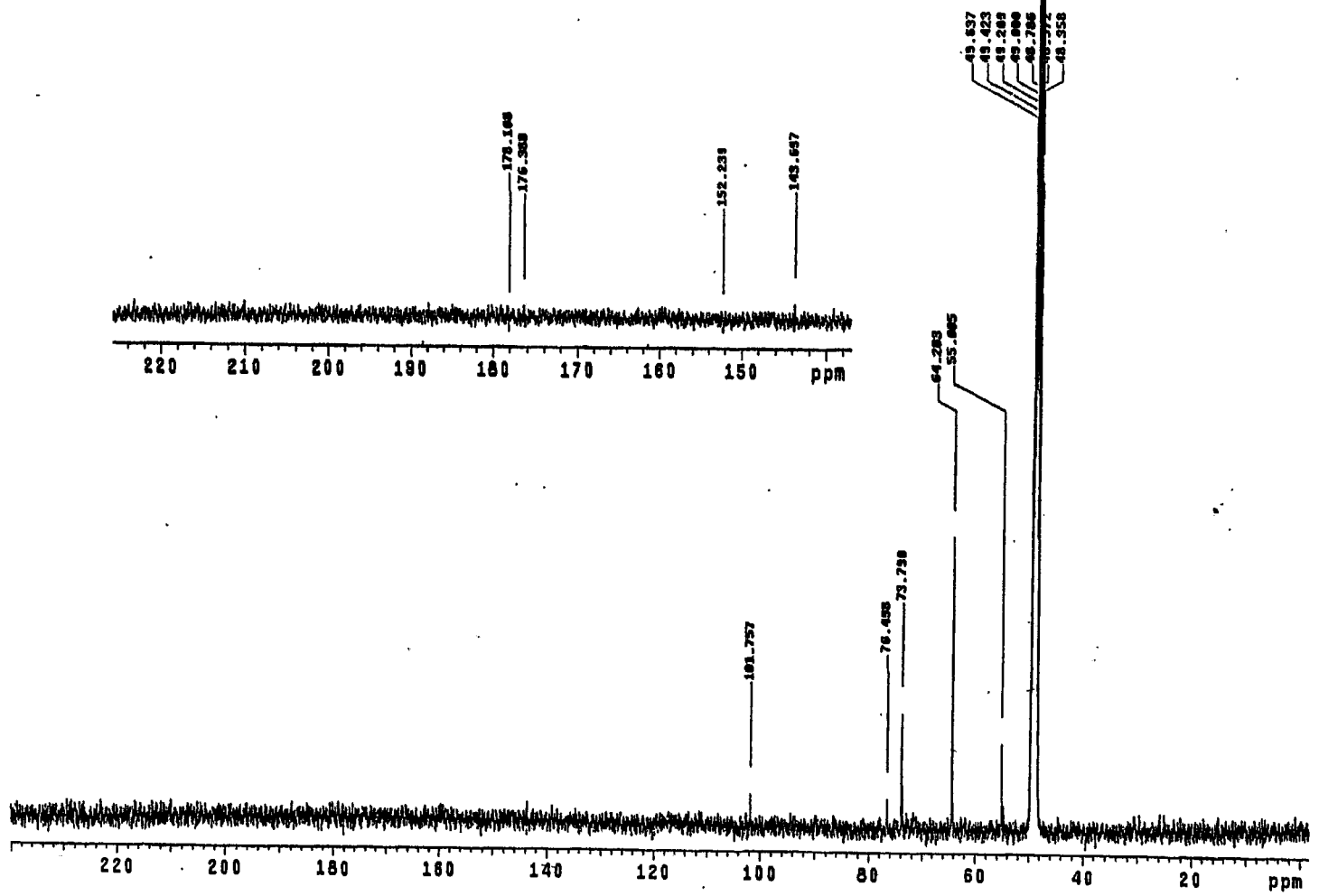


Figura 21. Espectro RMN ^{13}C (100 MHz) de MA-Suz-2.

USAI
25/FEBRERO/2005
Dr. Rogelio Pereda / Manuel Fragozo
MA-Suz-2 / CD30D
13C 100 MHz
Ref. CD30D 43 ppm
100
rdm

Pulse Sequence: dept

CH3 carbons



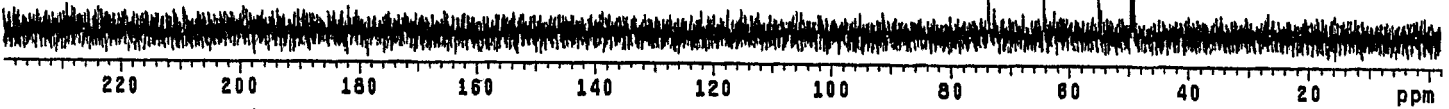
CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons



220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

Figura 22. Espectro RMN ^{13}C (DEPT) de MA-Suz-2.

VII. DISCUSIÓN

El análisis mediante CCF de los diferentes extractos preparados utilizando diferentes disolventes para la búsqueda de alcaloides no reveló la presencia de esos metabolitos en los extractos. Tampoco fue posible encontrar condiciones óptimas de resolución de sus constituyentes individuales a pesar de numerosos intentos.

VII.1. Datos espectroscópicos de las sustancias orgánicas aisladas de *M. alcicornis*

VII.1.1. Espectros Infrarrojo

El espectro infrarrojo de la porción de extracto soluble en acetona (MA-EA1) (ver Figura 6) muestra una banda a 3381 cm^{-1} característica de grupos OH, los cuales han de pertenecer a un ácido carboxílico debido a la existencia de una banda para un carbonilo en 1732 cm^{-1} . También se observan bandas intensas a 2917 y 2849 cm^{-1} , atribuibles respectivamente a $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ y $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ de una larga cadena carbonada. La presencia de los metilenos se comprueba mediante las bandas en 1463 ($\delta_{\text{s}}\text{CH}_2$) y 720 (ρCH_2) cm^{-1} . Se aprecia en esta zona $\delta_{\text{s}}\text{CH}_3$ en 1377 cm^{-1} . Asimismo, la banda en 1055 cm^{-1} comprueba la presencia del grupo CO ($\nu\text{C-O}$). Los compuestos purificados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y denominados como MA-suz-2, (Rt 4.64 min) y MA-suz-4 (Rt 5.83 min) mostraron esencialmente las mismas bandas que su fracción madre y consisten sin lugar a dudas en dos isómeros. Para MA-suz-2 (ver Figura 18), las bandas se sitúan en 3402 , 2936 , 2067 , 1678 , 1414 , 1204 , 1137 , 1051 y 723 cm^{-1} , mientras que para MA-suz-4 (ver Figura 19), las bandas se encuentran en 3416 , 2925 , 2854 , 1680 (intensa), 1432 , 1205 , 1136 y 723 cm^{-1} . La banda intensa en 1680 cm^{-1} debe corresponder a la $\nu\text{C=O}$ conjugado a un enlace doble C=C . Para ambos compuestos, se observa una banda adicional a 2067 cm^{-1} , la cual es atribuible a un enlace $\text{C}\equiv\text{C}$ ($\nu\text{C}\equiv\text{C}$ no conjugado al C=O). Es importante notar que

esta última banda es apenas perceptible en el espectro IR del extracto que dio origen a estos picos, quizás debido a la baja concentración relativa de los dos constituyentes en la mezcla. Los espectros de las muestras semipurificadas denominadas como MA-suz-3 y MA-suz-5 mostraron bandas muy similares en alrededor de 2920, 2850, 1735, 1465 y 1378 cm^{-1} (ver Anexo). Destaca en estos casos la ausencia de la banda en 2067 cm^{-1} . No se dispuso de sus respectivos espectros de RMN ^{13}C , por lo que no se pudo confirmar la presencia de este triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$. El espectro IR del extracto obtenido mediante AcOEt (MA-Suz-1) mostró esencialmente las mismas bandas anteriormente descritas, mientras que las fracciones MA-Suz-3 y MA-Suz-5, al parecer, carecen de grupos OH.

VII.1.2. Cromatografía de gases–Espectrometría de masas

El cromatograma de gases de la fracción soluble en acetona (MA-EA1) de *M. allicornis* (Figura 7) puso en evidencia que la misma consistía en una mezcla muy compleja de constituyentes individuales, ya que presentó más de 45 componentes en su perfil. Los espectros de masas obtenidos mediante impacto electrónico de los 17 mayoritarios fueron registrados. Sólo en once de los espectros se observan picos que podría suponerse que corresponden a los iones moleculares M^+ [270 para el componente con tiempo de retención (R_t) = 11.61 min, 256 para R_t = 12.02 min, 284 para R_t = 14.07 min, 508 para R_t = 16.66 y 33.47 min, 386 para R_t = 24.13, 536 para R_t = 25.13 min, 398 para R_t = 25.81 min, 400 para R_t = 26.07 min, 480 para R_t = 27.86 min y 506 para R_t = 32.66 min]. Los patrones de fragmentación observados en los diferentes espectros apoyan la naturaleza lipídica de varios de ellos. En particular, existe una pérdida consecutiva y sin interrupción de 14 unidades de masa en una buena región de cada espectro (Silverstein y col., 1991). Esas porciones corresponden evidentemente a pérdidas de grupos CH_2 que caracterizan a cadenas hidrocarbonadas de alcanos y alquenos. Debido a la presencia de un grupo $\text{C}=\text{O}$ en los espectros IR de las mezclas y de los compuestos puros y a pesar de la ausencia de los picos $\text{M} - 17$ (OH) y $\text{M} - 45$ (CO_2H) generalmente prominentes en los ácidos grasos de cadena corta, se puede

asumir que los compuestos presentes en el extracto acetónico del coral consisten en ácidos grasos superiores. En algunos de los espectros de masas, se aprecian picos debidos a rearrreglos de McLafferty (m/z par) (Figura 23). La ramificación en la posición α al carbonilo incrementa tanto la intensidad de esos picos, como su masa.

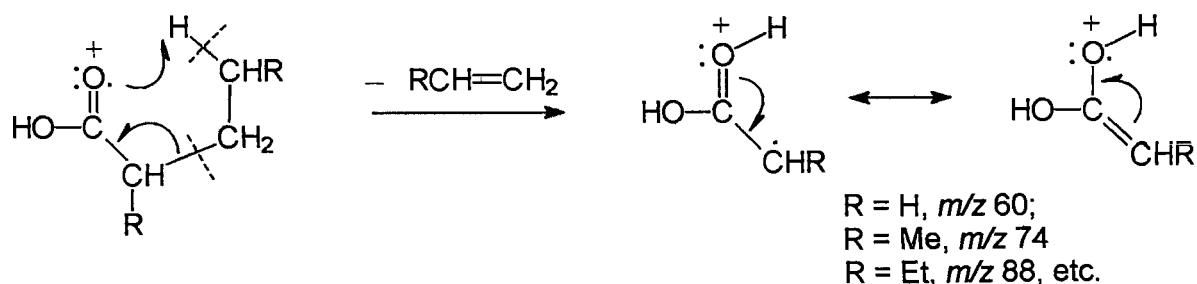


Figura 23. Mecanismo de rearrreglo de McLafferty.

El componente con $R_t = 12.02$ min muestra un pico a $m/z 256$ (M^+) (100%) y 227 [$M^+ - 29$ (C_2H_5)] y picos producidos por pérdidas sucesivas de CH_2 con retención de la carga en el lado del grupo carboxilo y/o en el lado de la cadena alquílica a $m/z 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 101, 99, 98, 97, 87, 85, 84, 83, 73, 71, 69, 57, 55, 43, 41$. Destaca además de esa serie el fragmento producido por el rearrreglo de McLafferty a $m/z 60$. Por lo tanto, ese compuesto es un ácido carboxílico saturado de cadena abierta, cuyo patrón de fragmentación satisface la estructura química del ácido hexadecanoico (palmítico) ($C_{16}H_{32}O_2$), como se ilustra a continuación (Figura 24).

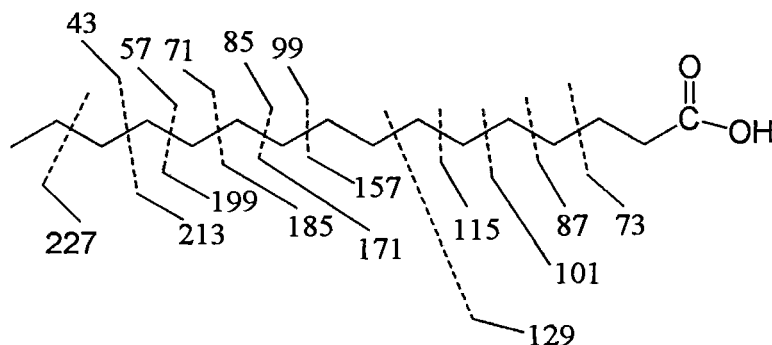


Figura 24. Esquema de fragmentación del ácido palmítico.

Para el componente con $R_t = 11.61$ min ($M^+ = 270$), el pico base (m/z 74) (Figura 25) se origina de un rearrreglo de McLafferty del ácido carboxílico con un grupo metilo en el carbono alfa. Además, se identifican los fragmentos de m/z 241 ($M^+ - 29$), 239 ($M^+ - 29 - 2$), 227 ($M^+ - 45$), 199 ($227 - 28$), 185 ($199 - 14$), 171 ($185 - 14$), 143 ($171 - 28$), 129 ($143 - 14$), 87 ($129 - 42$ ($3 \times \text{CH}_2$)), 69 [C_5H_9] $^+$, 57 [C_4H_9] $^+$, 43 [C_3H_7] $^+$.

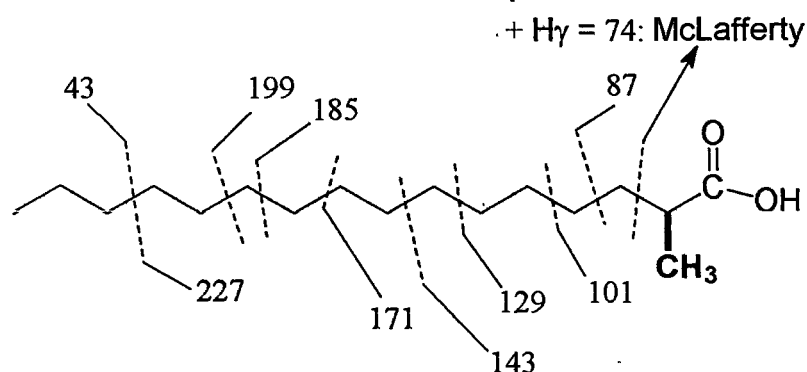


Figura 25. Esquema de fragmentación del ácido 2-metil hexadecanoico.

El constituyente con $R_t = 14.07$ min ($M^+ 284$) presentó en su espectro el mismo patrón de fragmentación que el de 12.02 min, con dos metilenos más que éste, es decir los fragmentos 241 [$M^+ - 43$ (C_3H_7)], 227 [$241 - 14$ (CH_2)], 199 [$227 - 28$ (C_2H_4)], 185 [$199 - \text{CH}_2$], 171 [$185 - 14$], 129 [$171 - 42$ ($3 \times \text{CH}_2$)], 85 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5$] $^+$, 73 [$(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$] $^+$, 60 [$\text{CH}_2=\text{C}(\text{OH})_2$] $^+$, McLafferty], 57 [C_4H_9] $^+$, 43 [C_3H_7] $^+$.

El pico con $R_t = 27.86$ min ($M^+ = 480$) presenta un equivalente de 16 metilenos más que el pico con $M^+ = 256$. Su fórmula molecular debe ser ($\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$).

Los picos con $R_t = 16.66$ y 33.47 min son dos isómeros que presentan el mismo patrón de fragmentación y que consisten también en ácidos grasos de más alto peso molecular ($M^+ = 508$), con un equivalente de 18 metilenos adicionales al pico con peso molecular = 256. La fórmula molecular condensada de esos isómeros corresponde a $\text{C}_{34}\text{H}_{68}\text{O}_2$.

Finalmente, el pico con $R_t = 25.13$ min ($M^+ = 536$) tiene dos grupos CH_2 más que los isómeros con masa molecular de 508 y debe tener la fórmula condensada $\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{O}_2$.

Por su parte, como se aprecia en el cromatograma de la fracción soluble en AcOEt (MA-Suz-1) (Figura 13), esta porción del extracto orgánico de *M. alcicornis* contiene más de 15 constituyentes individuales. Destaca el perfil del espectro de masas de los componentes con $R_t = 4.88$, 5.32 y 6.43 min, donde se aprecia el fragmento de m/z 43 $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$. En los componentes con $R_t = 6.65$ y 8.96 min, los fragmentos de m/z 65 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$ y 91 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ indican la presencia en estos compuestos de un grupo bencílico (tropilio) (C_7H_7^+). Para completar la elucidación estructural de esos componentes, se requerirá de la espectroscopía RMN.

VII.1.3. Resonancia magnética nuclear

Evidentemente, se registraron los espectros RMN del extracto MA-EA1 para buscar la presencia de grupos funcionales en sus constituyentes individuales que justificaran el sentido del estudio químico del extracto orgánico del hidrocoral. Resulta poco confiable la interpretación de los espectros de RMN del extracto, aunque se aprecia la presencia de numerosos metilenos en δ 0.8 – 2.4 ppm en el espectro RMN ^1H , lo cual se confirma con la presencia de señales para CH_2 en el espectro RMN ^{13}C (δ 20 – 60 ppm) (ver Figuras 8 y 9). También existen grupos $\text{C}=\text{C}$ en δ 100 – 160 ppm, aunque éstos no pueden atribuirse a los ácidos grasos identificados hasta el momento. También se encuentra una señal para carbonilo a δ 174.3 ppm. Sin embargo, los espectros de RMN de los picos purificados MA-Suz-2 (ver Figuras 20 – 22) y MA-Suz-4, debido a la pobre cantidad de muestra, tampoco fueron de calidad suficiente para una asignación adecuada. Esos espectros contienen señales para grupos CH , CH_2 y CH_3 . No se ven más grupos funcionales.

VIII. CONCLUSIONES

El análisis del extracto orgánico (metabolismo secundario) de *M. alcornis* mediante CG-EM ha establecido la presencia de más de 60 constituyentes individuales en su perfil, muchos de los cuales consisten en policétidos en forma de ácidos grasos libres, los cuales como es sabido, constituyen las reservas energéticas a largo plazo para la mayoría de los organismos. Se ha determinado la estructura química de 7 de los constituyentes del extracto acetónico.

La espectrometría de masas de los picos del cromatograma de gases no fue suficiente para caracterizar más compuestos. Sin embargo, dados los antecedentes químicos de especies de *Millepora*, algunos de esos constituyentes pueden ser de naturaleza terpenoide.

En cuanto a diversidad estructural, esta especie marina muestra un perfil aparentemente rico en metabolitos secundarios, los cuales generalmente se biogeneran en los organismos como agentes defensivos, como feromonas o como colorantes, entre otras funciones. Sin embargo, es conocido que esos organismos utilizan péptidos como defensas y como medios para abastecerse de su alimentación, mientras que su color se lo imparten sus simbioses.

De acuerdo a los espectros de masas obtenidos para 22 de los constituyentes individuales del hidrocoral y contrariamente a lo observado en diversos organismos marinos, este organismo no incorpora los halógenos Cl y Br en sus metabolitos secundarios.

IV. BIBLIOGRAFÍA

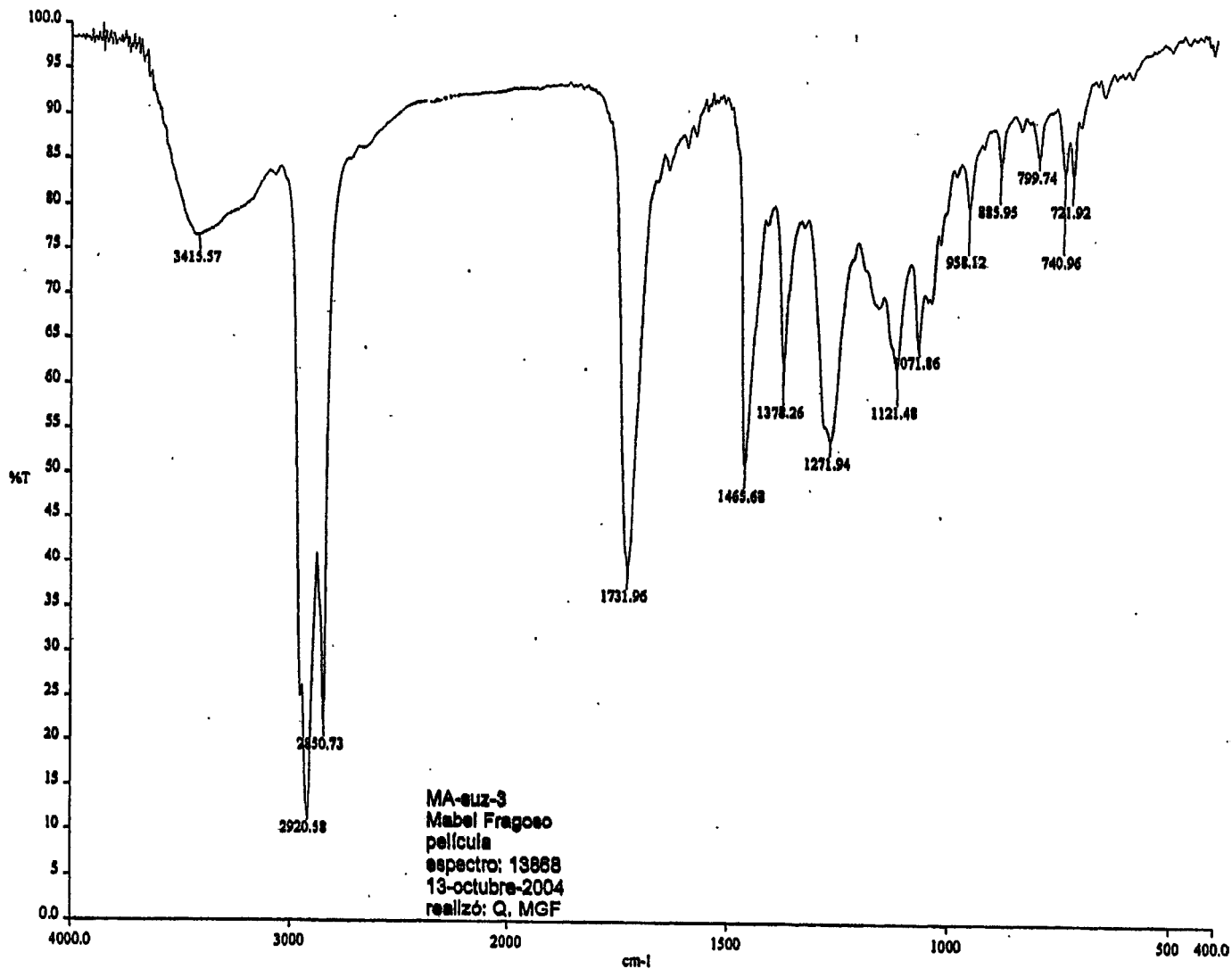
- Ackermann, D., Holtz, F., Reinwein, H. 1923.** Reindarstellung und konstitutionsermittlung des tetramins, eines giftes aus *Aktina equina*. *Z Biol*: 79: 113-120.
- Ahmed, A.F., Su, J-H., Kuo, Y-H, Sheu, J-H. 2004.** Scabrolides E-G, three new noditerpenoids from the soft coral *Sinularia scabra*. *Journal of Natural Products*: 67: 2079-2082.
- Aiello, A., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L. 1987.** Brominated β -carboline from the marine hydroid *Aglaophenia pluma* linnaeus. *Tetrahedron*: 43: 5929-5932.
- Alexander, P., Bahret, M.J., Chaves, J., Courts, G., D'Alessio, N.S. 1992.** *Biología*. Prentice Hall, New Jersey: 356-361.
- Azuma, H., Ishikawa, M., Nakajima, T., Satoh, A., Sekizaki, S. 1989.** Calcium-dependent contractile response of arterial smooth muscle to a jellyfish toxin. *Eur J Pharmac*: 88: 549-559.
- Barret, J.M., Bramoff, A.P., Kumaran, A., Millington, W., 1986.** *Biology*. Prentice may. USA.: 878-885.
- Baslow, M. 1977.** *Marine pharmacology*. Robert Krieger Pub, New York: 100-115.
- Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., Panconesi, E. 1988.** Coral ulcer as a vasculitis. *Int J Dermatol*: 27: 506-507.
- Blunt, J., Copp, B., Murno, M., Northcote, P., Prinsep, M. 2003.** Marine natural products. *Nat Prod Rep*: 20:1-48.
- Brewster R.Q., 1977.** *Curso práctico de química orgánica experimental*. Alhambra. España: 22-38.
- Capurro, L., Evan, J., Herrera, J. 2002.** Manejo sustentable del Ecosistema Costero de Yucatán. *Avance y perspectiva*: 21: 195-204.
- Castillo, V., Capurro, L. 2000.** Las playas de la Península de Yucatán: evolución de la línea de costa. *Avance y perspectiva*: 19: 195-201.
- Curtis, H., Barnes, N.S. 1994.** *Biología*. 5ª ed. Panamericana, Buenos Aires: 539-545.

- Davies, P.J., Montaggioni, L. 1985.** Reef growth and sea-level change: the environmental signature. *Proc 5th Int Coral Reef Symp*: 3: 477-511.
- Dubois, J.M., Tanguy, J., Burnett, J.W. 1983.** Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane. *Biophys J*: 42: 199-202.
- Evans, W.C. 1991.** Farmacognosia. 13a ed. Mac Graw Hill Interamericana. México: 134-150.
- Faulkner, D.J. 2002.** Marine natural products. *Nat Prod Rep*: 19: 1-48.
- García, A.J. 2004.** Caracterización química y farmacológica del extracto acuoso de *Millepora alcicornis*. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo. 78-88.
- Glynn, P.W. 1991.** Coral-reef bleaching in the 1980s and possible connections with global warming. *Trends Ecol Evol* : 6: 175-179.
- Glynn, P.W., Cortes, J., Guzman, H. W., Richmond, R. H. 1998.** El Niño, Associated coral mortality related to sea surface temperature deviations in the Tropical Eastern Pacific. *Proc 6th Inter. Coral Reef Symp.*: 3: 273-243.
- Grassé, P.P. 1993.** Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie. Masson, Paris: vol 3:1117.
- Hashimoto, Y. 1979.** Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokyo: 1-115.
- Hickman, C., Roberts, L., Larson, A. 2003.** Principios Integrales de Zoología. Mac Graw Hill Interamericana, España: 253-279.
- Klug, M., Weber, J. 1991.** An extract from *Hydra vulgaris* (Cnidaria) nematocysts increases cytoplasmic Ca²⁺ levels in fibroblasts. *Toxicon*: 29: 129-133.
- Klug, M., Weber, J., Tardent, P. 1989.** Hemolytic and toxic properties of *Hydra attenuata* nematocysts. *Toxicon*: 27: 325-339.
- Knowlton, N. 2001.** The future of coral reefs. *Proc Natl Acad Sci USA*: 10: 5419-5425.
- Lewis, J.B. 1989.** The ecology of *Millepora*. *Coral Reefs*: 8: 99-107.

- Lindquist, N. 2002.** Tridentatols D-H, Nematocyst metabolites and precursors of the activated chemical defense in the marine hydroid *Tridentata marginata* (Kirchenpauer 1864). *J Nat Prod*: 65: 681-684.
- Lindquist, N., Lobkovsky, E., Clardy, J. 1996.** Tridentatols A-C, novel natural products of the marine hydroid *Tridentata marginata*. *Tetrahedron Lett.* 37: 9131-9134.
- Lindquist, N., Shigematsu, N., Pannell, L. 2000.** Corydendramines A and B, defensive natural products of the marine hydroid *Coridendrium parasiticum*. *J Nat Prod*: 63: 1290-1291.
- Mathias, A.P., Ross, D.M., Schachter, M. 1958.** Distribution of histamine, 5-hydroxytryptamine, tetramethyl-ammonium, and other substances in coelenterates possessing nematocysts. *J Physiol*:142: 56-57.
- McField, M.D. 1999.** Coral response during and after mass bleaching in Belize. *Bull Mar Sci*. 64: 155-172.
- Mebs, D., 2002.** Venomous and poisonous animals. Medpharm Scientific Publishers. Germany: 39-50.
- Meehan, W.J., Ostrander, G.K. 1997.** Coral bleaching: a potential biomarker of environmental stress. *J Toxicol Environ Health*: 50: 529-552.
- Middlebrook, R., Lawrence, W., Scura, E., Lane, C. 1971.** Isolation and purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon*: 9: 333-336.
- Pathirana, C., Andersen, R.J., Wright, J.C.L. 1989.** Hydrallmanol A, an interesting diphenyl-methane derivative of mixed biogenetic origin from hydroid *Hydrallmania falcata*. *Tetrahedron Lett*: 30: 1487-1490.
- Pathirana, C., Andersen, R.J., Wright, J.C.L. 1990.** Abietinarins A and B, cytotoxic metabolites of the marine hydroid *Abietinaria sp.* *Can J Chem*: 68: 394-396.
- Rojas, A., Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., Heimer-de la Cotera, E. 2002.** Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon*: 40: 777-785.
- Sagi, A., Rosenber, L., Ben-Meir, P., Hauben, D.J. 1987.** The fire coral (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns Incl Therm Inj*: 13: 325-326.

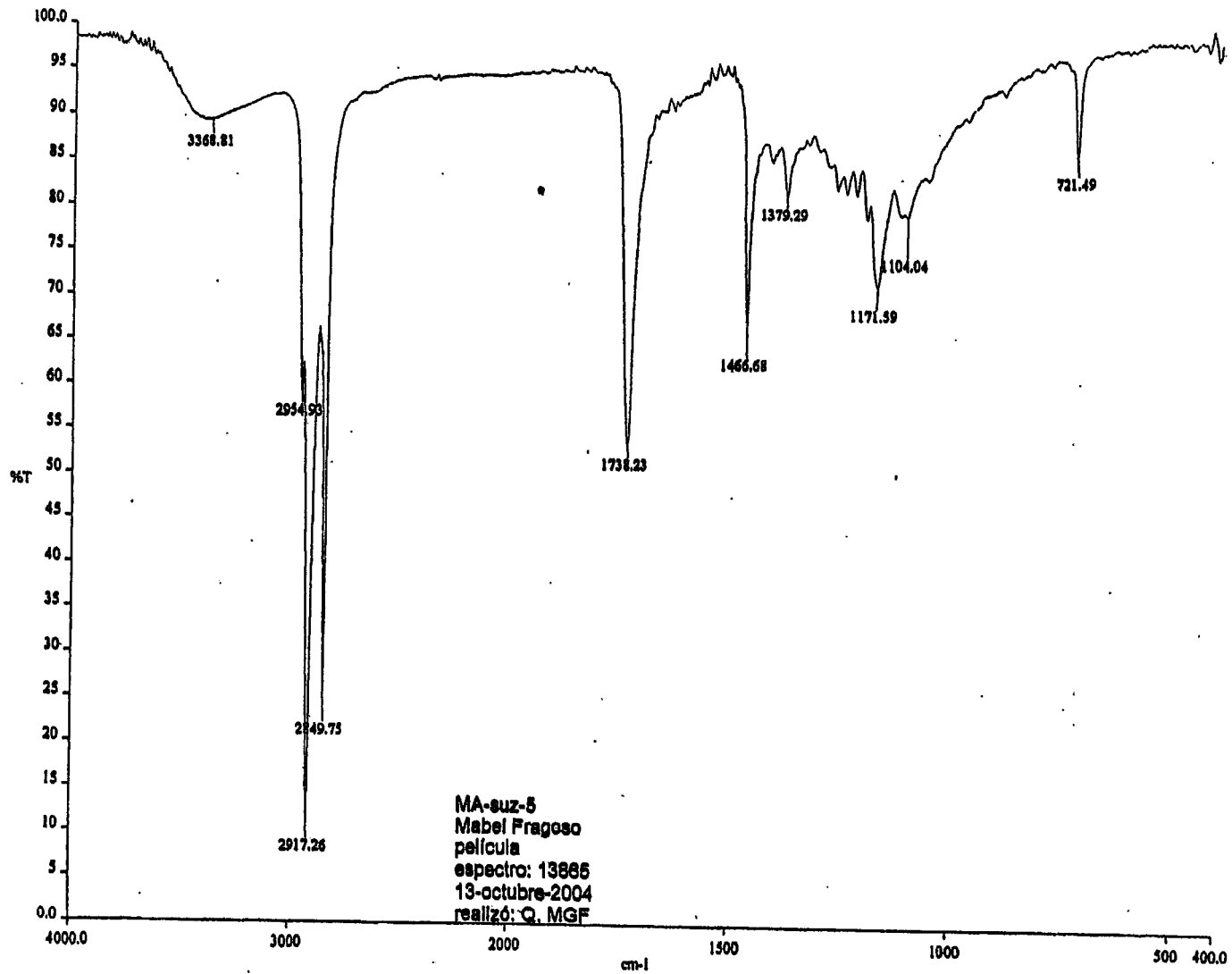
- Shimizu, Y. 1985.** Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. *J Nat Prod*: 48: 223-235.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C, Morrill, T.C. 1991.** Spectrometric identification of Organic Compounds. 5th Edition. John Wiley & Sons, Inc. USA: 3-89.
- Solomon, E.P., Berg, L.R., Martín, D.W., Ville, C. 1998.** Biología de Villee. 4^a ed. McGraw-Hill Interamericana, México D.F.: 598-602.
- Torres, M., Aguilar, M.B., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F.F., Burnett, J.W., Heimer-de la Coteria, E., Arellano, R.O. 2001.** Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish *Casiopea xamachana*. *Toxicon*: 39: 1297-1307.
- Valcarcel, C.M., Silva, R.M. 1984.** Teoría y práctica de la extracción líquido- líquido. Alhambra. España: 1-10.
- Warner, M.E., Fitt, W.K., Schmidt, G.W. 1999.** Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proc Natl Acad Sci USA*: 96: 8007-8012.
- Welsh, J.H. 1961.** Compounds of pharmacological interest in coelenterates. En: The Biology of Hydra and of some other coelenterates. Lenhoff, H.M., Loomis, W.F. Ed. Univ Miami Press, Florida: 178-186.
- Wittle, L., Middlebrook, R., Lane, C. 1971.** Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicornis*. *Toxicon*: 9: 327-331.
- Wittle, L., Scura, E., Middlebrook, R. 1974.** Stinging coral (*Millepora tenera*) toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocyst extracts. *Toxicon*: 12: 481-486.
- Wood, J.G., Lentz, T.L. 1964.** Histochemical localization of amines in hydra and in the sea anemone. *Nature*: 201: 88-90.
- Youngken, H.W. 1951.** Tratado de Farmacognosia. 9 ed. Atlante S. A. México: 3-28.

X. ANEXO



a:\13868.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

Espectro IR de la muestra MA-Suz-3.



s:\13866.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

Espectro IR de la muestra MA-Suz-5.

[TIC]

Date : 078234_MF1-EA_002

Date : 01-May-2004 16:05

Sample :

Mode :

Inlet : GC

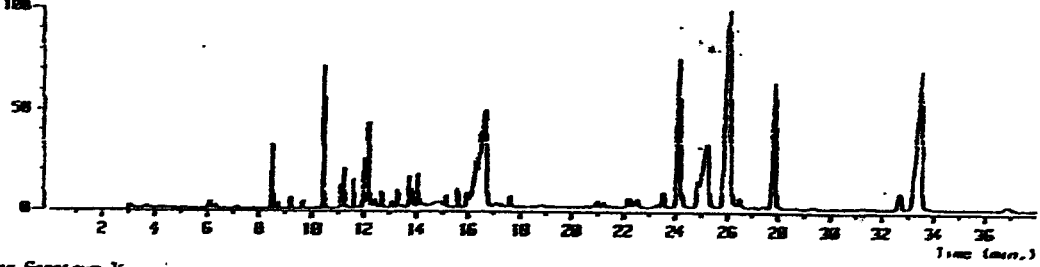
Ion Mode : EI+

Ion Species : Normal Ion (PF-Linear)

TIC Range : m/z 33 to 800

Output RT Range : 0.00 to 30.00 min

!!5587200



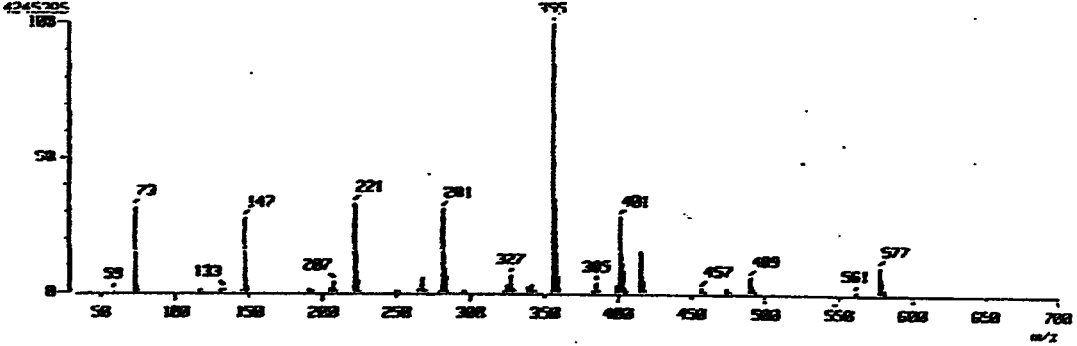
[Mass Spectrum]

RT : 8.49 min

Scan# : (599,603)-(563,577)(k=1.0)

Ion Mode : EI+

Int. : 484.87



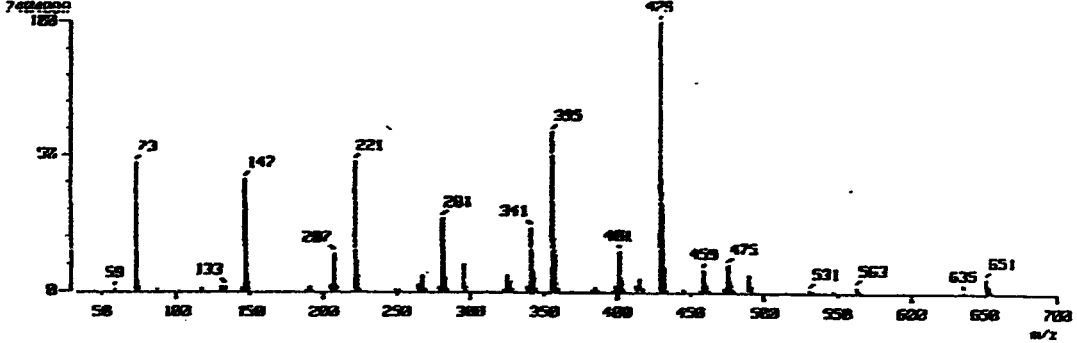
[Mass Spectrum]

RT : 10.46 min

Scan# : (738,741)-(753,778)(k=1.0)

Ion Mode : EI+

Int. : 795.11



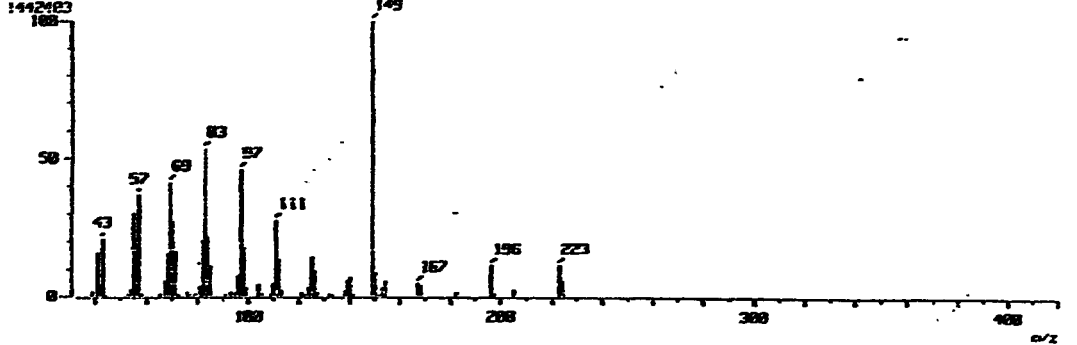
[Mass Spectrum]

RT : 11.18 min

Scan# : (784,787)-(800,808)+(757,764)(k=1.0)

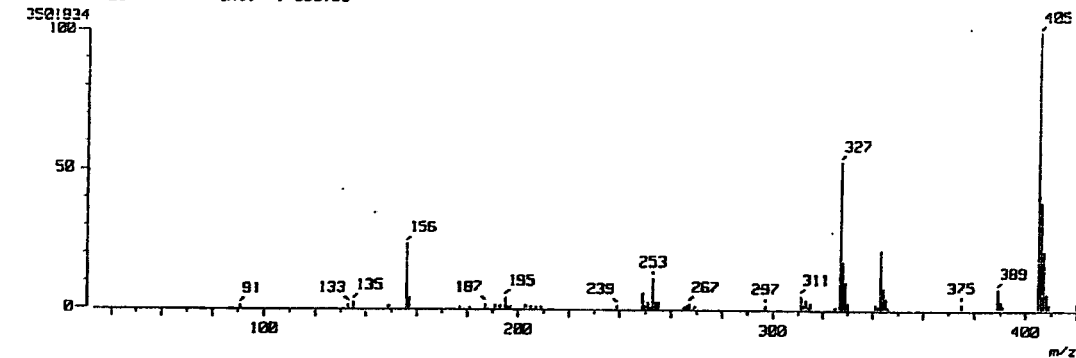
Ion Mode : EI+

Int. : 137.55

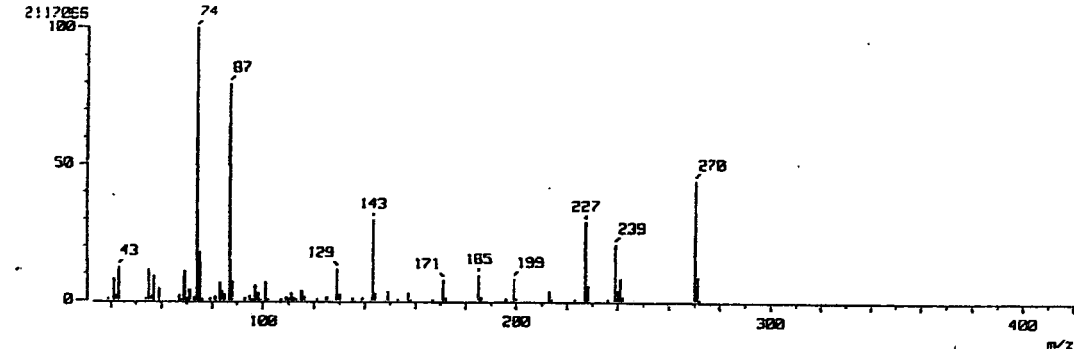


CG-EM de la muestra MA-EA1.

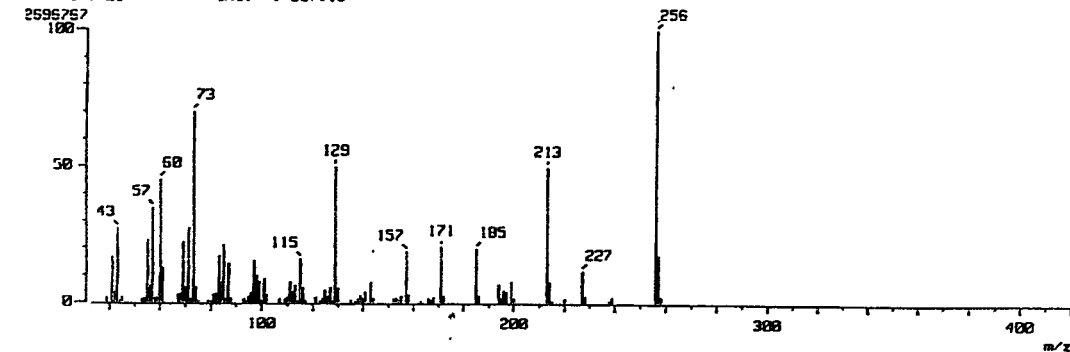
[Mass Spectrum]
RT : 11.21 min Scan# : (792,795)-k((800,810))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 333.96



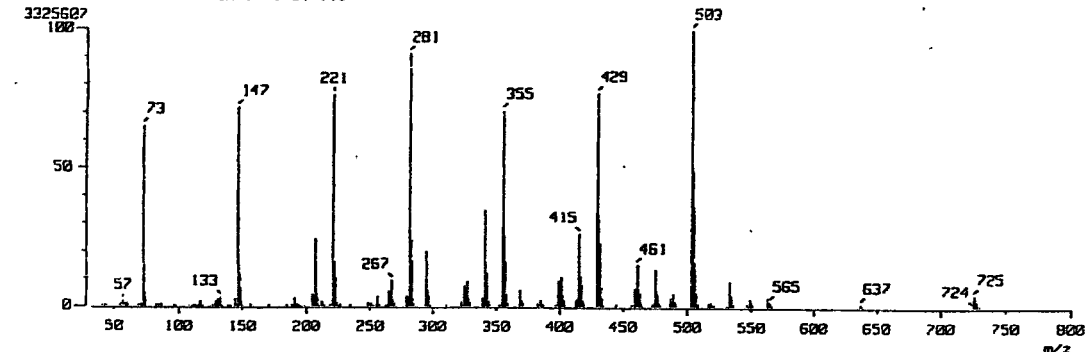
[Mass Spectrum]
RT : 11.61 min Scan# : (820,822)-k((799,813))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 201.90



[Mass Spectrum]
RT : 12.02 min Scan# : (849,851)-k((828,836))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 257.19

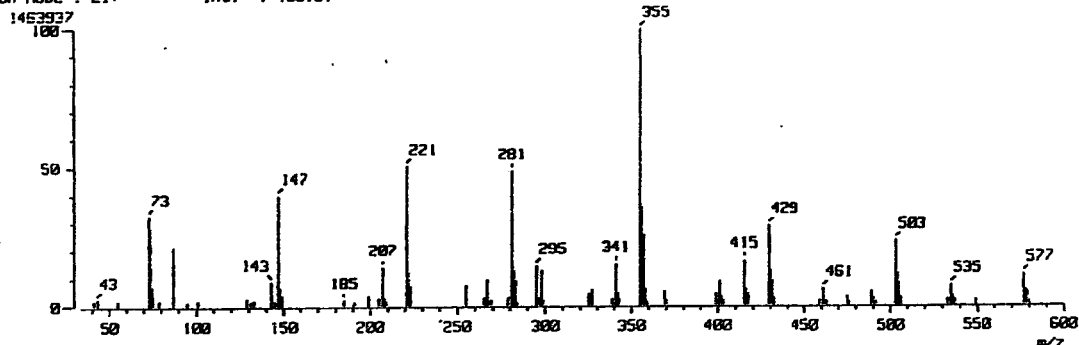


[Mass Spectrum]
RT : 12.17 min Scan# : (861,862)-k((868,873))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 317.15

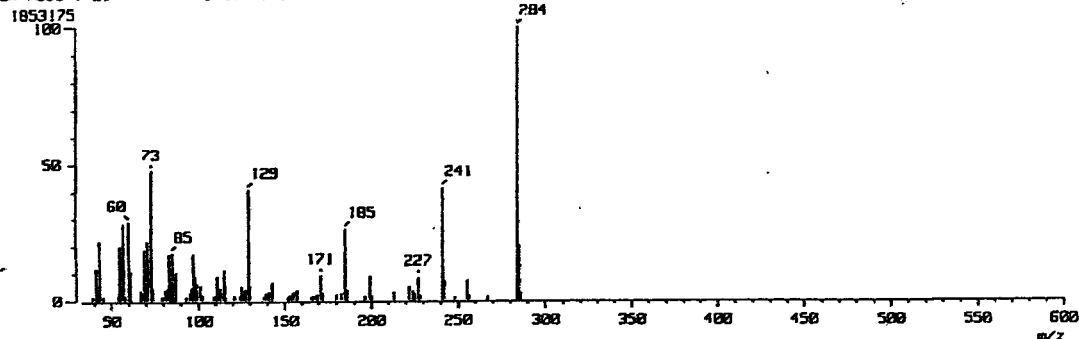


Espectros de masas de la muestra MA-EA1.

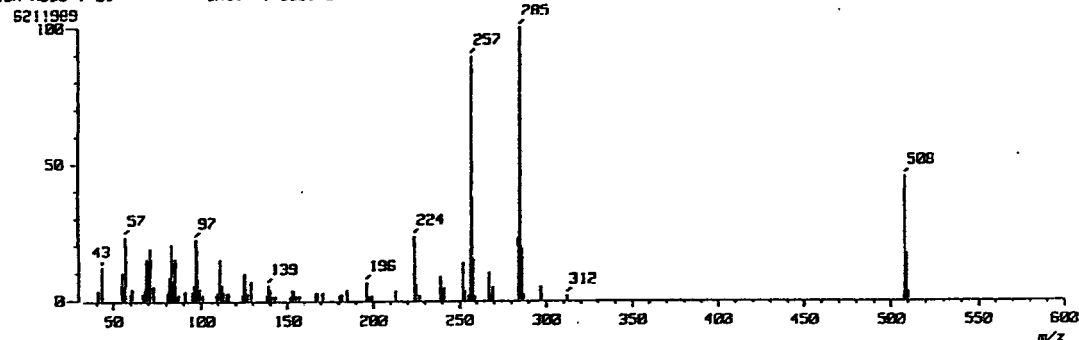
[Mass Spectrum]
RT : 13.73 min Scan# : (970,972)-k((949,959))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 139.61



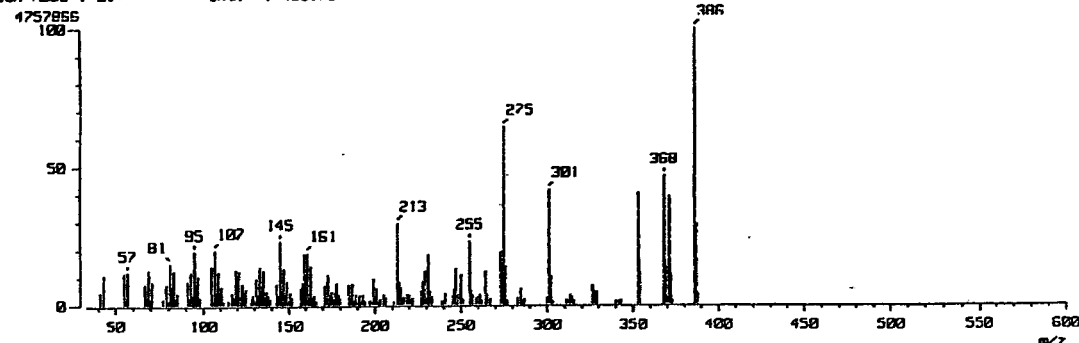
[Mass Spectrum]
RT : 14.07 min Scan# : (994,996)-k((1000,1023))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 176.73



[Mass Spectrum]
RT : 16.66 min Scan# : (1176,1180)-k((1196,1231))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 592.42



[Mass Spectrum]
RT : 24.13 min Scan# : (1704,1709)-k((1687,1649))(k=1.0)
Ion Mode : EI+ Int. : 453.75



Spectros de masas de la muestra MA-EA1.

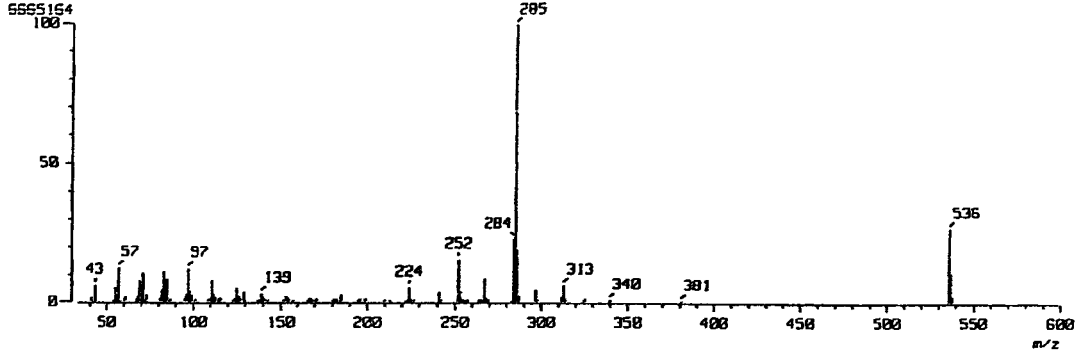
[Mass Spectrum]

RT : 25.13 min

Scan# : (1769,1785)-k((1728,1737))[k=1.0]

Ion Mode : EI+

Int. : 635.64



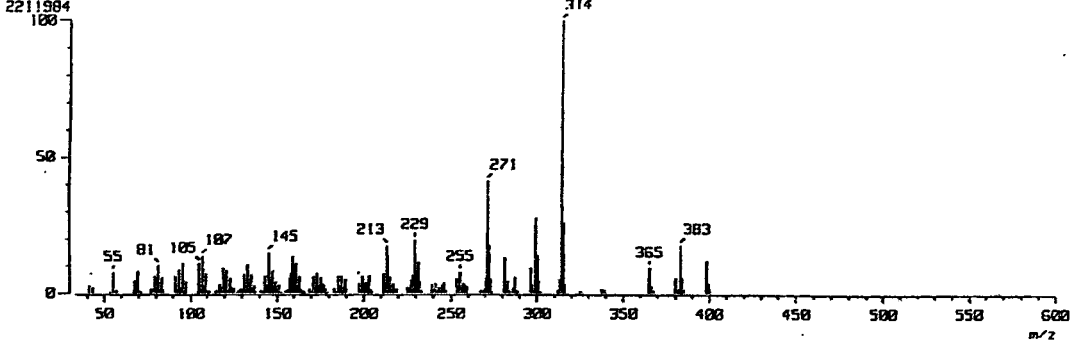
[Mass Spectrum]

RT : 25.81 min

Scan# : (1824,1827)-k((1801,1814))[k=1.0]

Ion Mode : EI+

Int. : 218.95



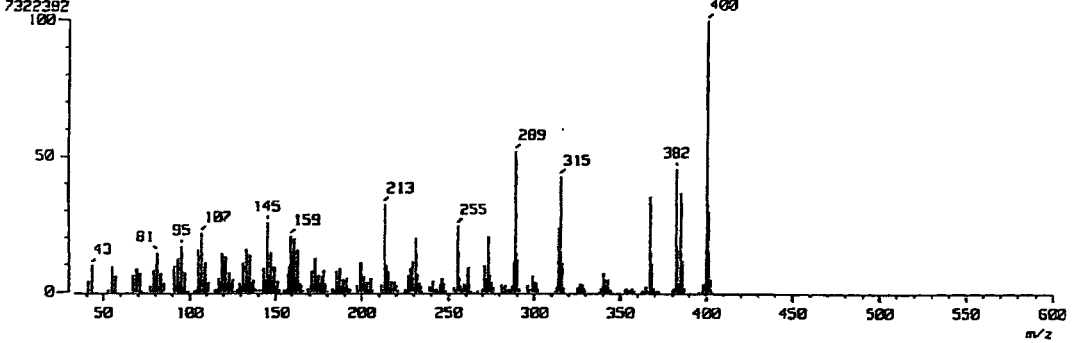
[Mass Spectrum]

RT : 26.07 min

Scan# : (1842,1844)-k((1856,1862))[k=1.0]

Ion Mode : EI+

Int. : 698.32



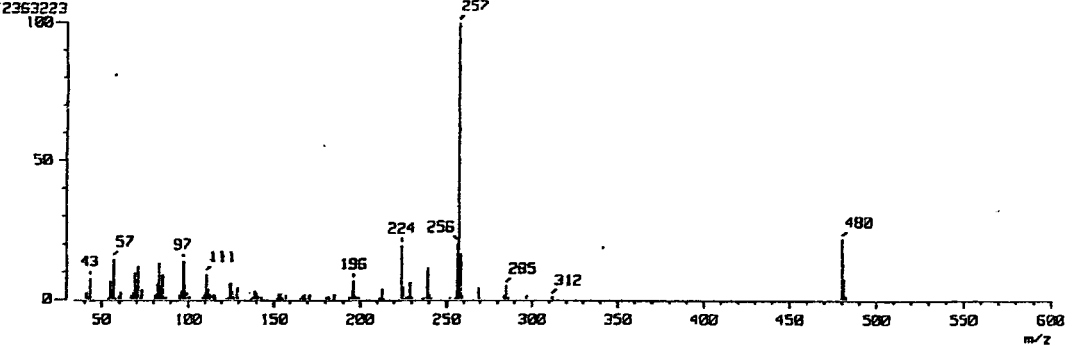
[Mass Spectrum]

RT : 27.86 min

Scan# : (1968,1973)-k((1907,1938)+(1990,2018...)

Ion Mode : EI+

Int. : 1178.05



Espectros de masas de la muestra MA-EA1.

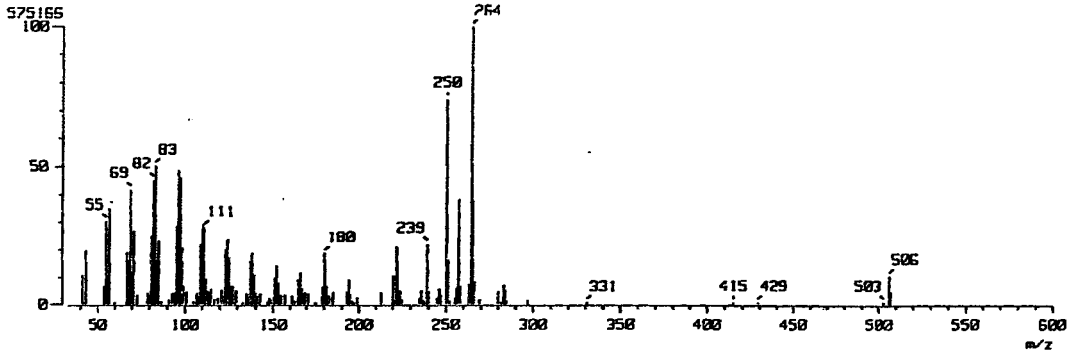
[Mass Spectrum]

RT : 32.66 min

Ion Mode : EI+

Scan# : (2306,2312)-k((2253,2262))[k=1.0]

Int. : 54.85



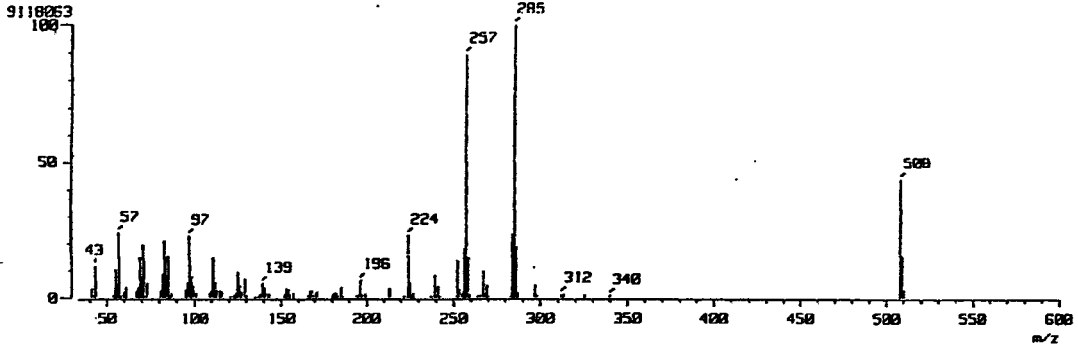
[Mass Spectrum]

RT : 33.47 min

Ion Mode : EI+

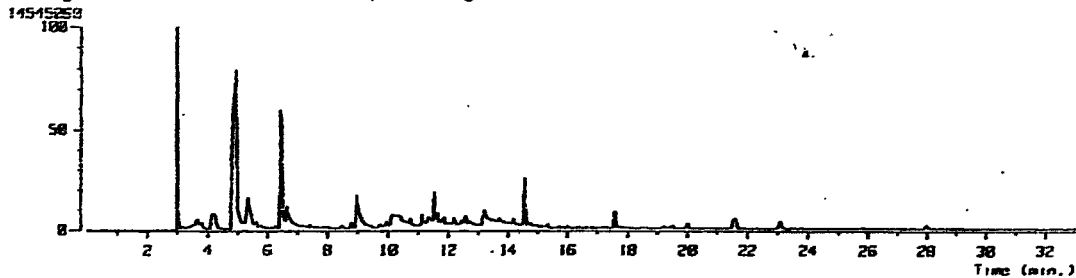
Scan# : (2364,2368)-k((2387,2461))[k=1.0]

Int. : 869.57

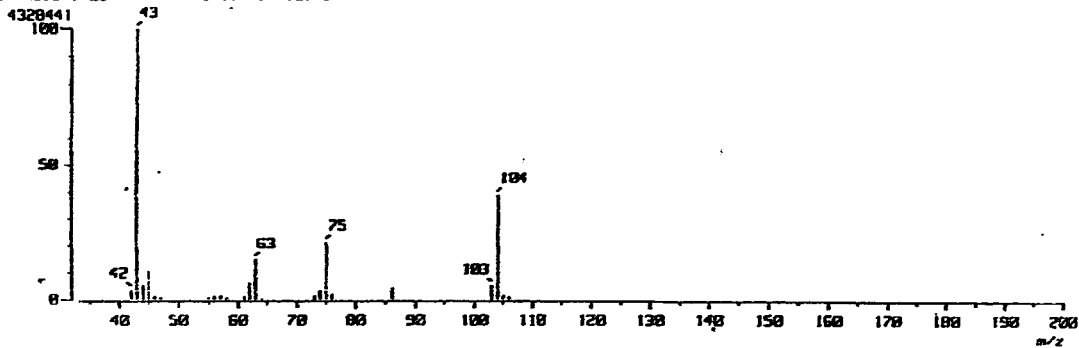


Espectros de masas de la muestra MA-EA1.

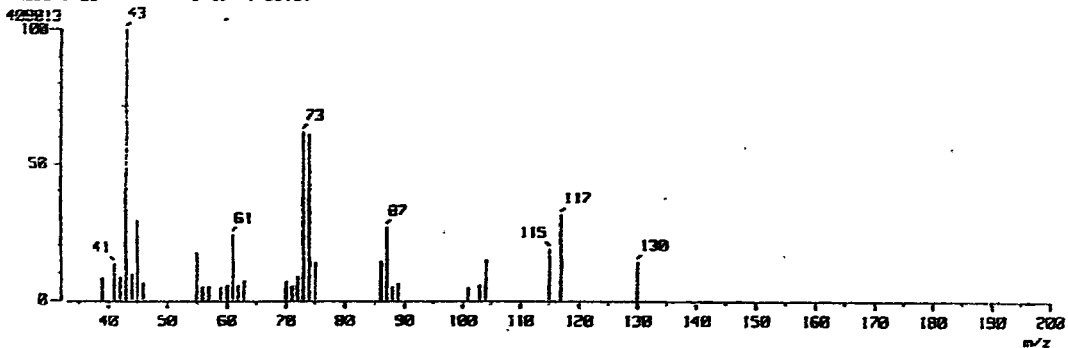
[TIC]
 Data : 019426_HF-SUZ-1_002 Date : 18-Jan-2025 15:10
 Sample : -
 Note : -
 Inlet : GC Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion (MF-Linear)
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 32.97 min



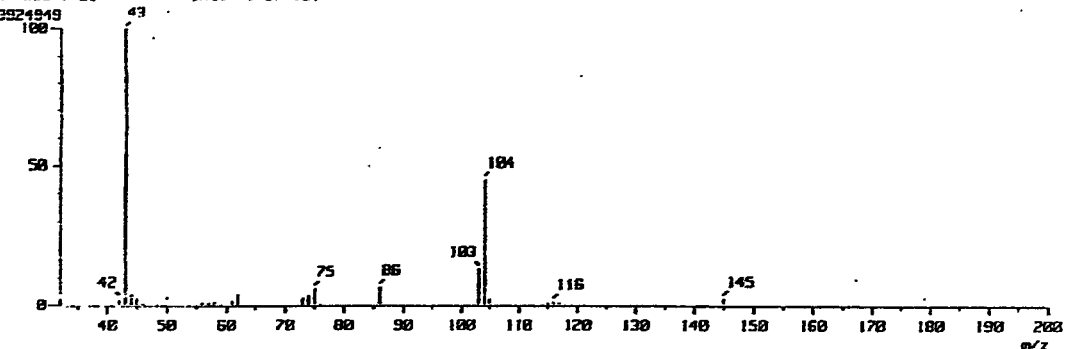
[Mass Spectrum]
 RT : 4.88 min Scan# : (177,180)-k((211,220))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 412.79



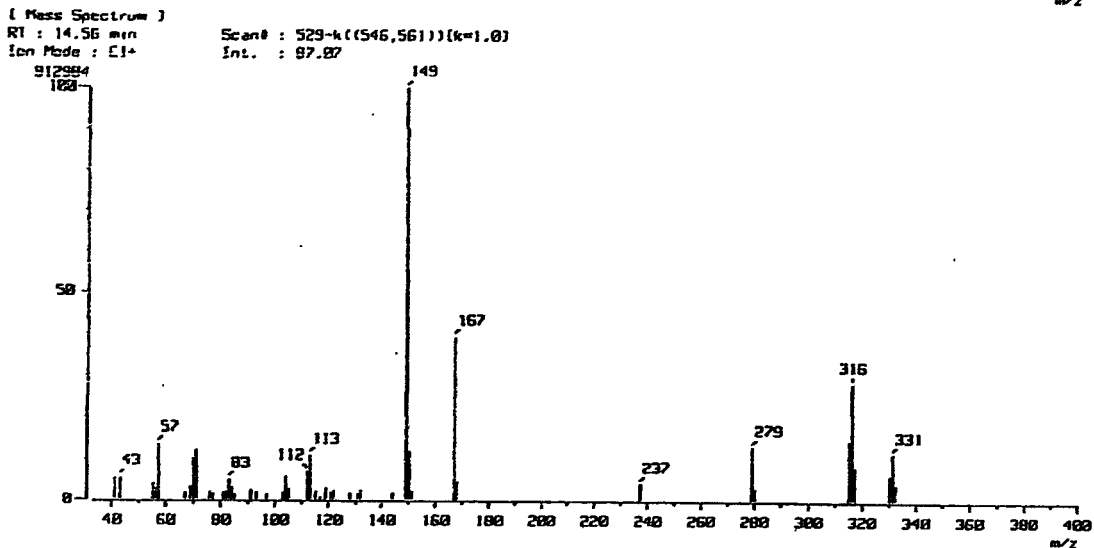
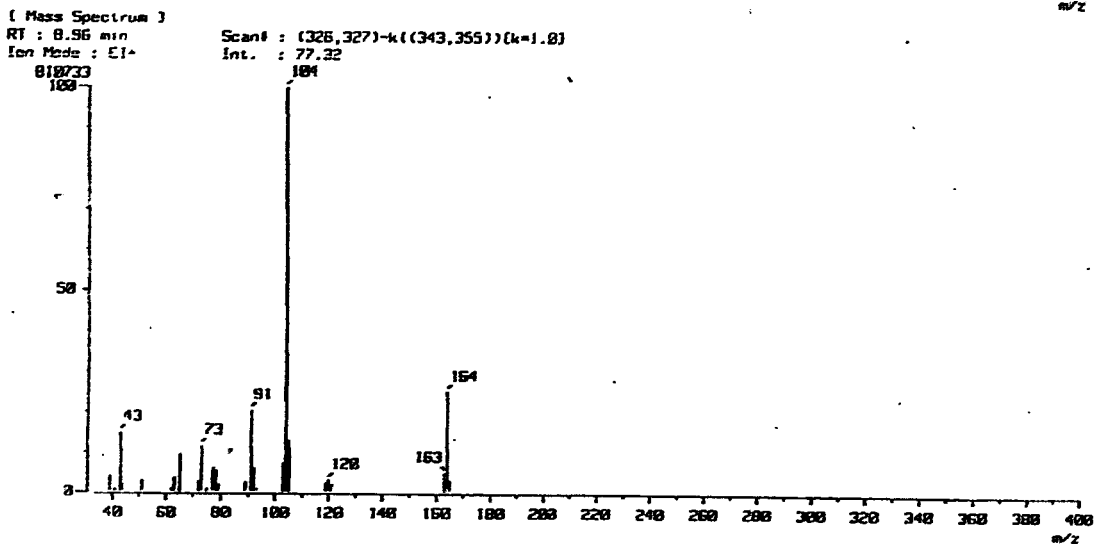
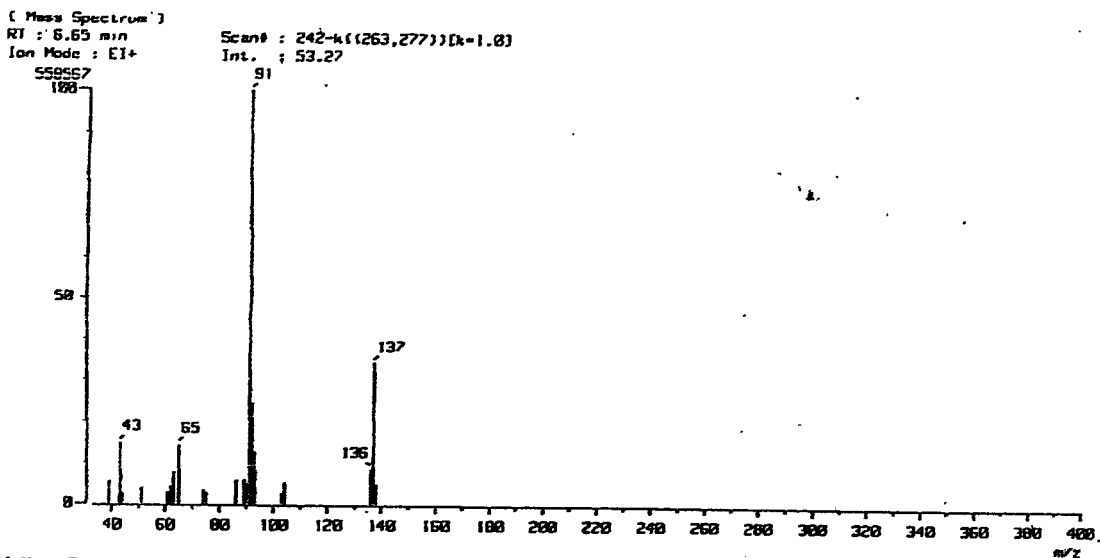
[Mass Spectrum]
 RT : 5.32 min Scan# : 194-k((210,220))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 39.81



[Mass Spectrum]
 RT : 6.43 min Scan# : (234,235)-k((263,276))(k=1.0)
 Ion Mode : EI+ Int. : 374.31



CG-EM de la muestra MA-Suz-1.



Espectros de masas de la muestra MA-Suz-1.