

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL  
CORAL DE FUEGO (*Millepora complanata*)"**

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**GABRIELA PAOLA ÁVILA LAMAS**

DIRIGIDA POR:

**DRA. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2002

**BIBLIOTECA CENTRAL UAQ**  
"ROBERTO RUIZ OBREGON"

No. Adq. H67582

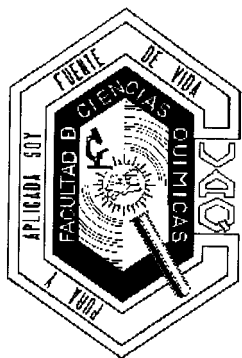
No. Título \_\_\_\_\_

Clas. TS

544.92

A958p

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDA AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL  
CORAL DE FUEGO (*Millepora complanata*)"**

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

PRESENTA

**GABRIELA PAOLA ÁVILA LAMAS**

DIRIGIDA POR

**DRA. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ**

**SINODALES:**

DRA. SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ  
DIRECTOR

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH  
PROPIETARIO

B. MIGUEL ANGEL RICO RODRÍGUEZ  
PROPIETARIO

DRA. MARICELA GONZÁLEZ LEAL  
SUPLENTE

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora Sandra Mendoza, al Doctor Moustapha Bah, a la Doctora Dora Marina Gutiérrez y todo el laboratorio de Productos Naturales por darme la oportunidad de trabajar junto con ellos y elaborar un proyecto de investigación que me permitiera culminar mis estudios satisfactoriamente.

A la maestra Carmen Venegas, al Doctor Peniche, a Nelly, Sergio, Marlen, Mariela, Estelita, Mundo y Lolita que me apoyaron mucho durante mi servicio social y han sido guía para mi desarrollo profesional.

A mis grandes amigas: Tere, Liz Rosales y Liz Sabath, que con el gran apoyo que me brindaron en los momentos difíciles y en los momentos felices durante estos 5 años.

Gracias a todos ellos ahora puedo concluir con gran satisfacción mi etapa de estudiante universitaria.

## DEDICATORIAS

Especialmente a mis padres que siempre me han apoyado incondicionalmente, que han creído en mí y que gracias a su orientación estoy muy satisfecha por la profesión que ahora tengo

A mi hermano, que siempre ha estado conmigo en los momentos buenos así como en los malos y que siempre me ha brindado su ayuda.

A mi abuela, que siempre creyó en mí, me guió y aconsejó cuando más lo necesitaba.

A Javier y Brenda que han sido para mí uno de los motivos más importantes de seguir adelante con mis sueños y mis metas.

# ÍNDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS	iv
ÍNDICE DE ESPECTROS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. OBJETIVOS	10
1. Objetivo general	10
2. Objetivos específicos	10
IV. METODOLOGÍA	11
1. MATERIALES	11
2. MÉTODOS	12
2.1. Recolección y transporte de los especímenes de <i>M. complanata</i>	12
2.2. Preparación del extracto	12
2.3. Fraccionamiento del extracto	12
2.4. Análisis cromatográfico por HPLC	14
2.5. Caracterización de las muestras	14
V. RESULTADOS	15
VI. DISCUSIÓN	37
VII. CONCLUSIONES	39
VIII. BIBLIOGRAFÍA	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. <i>Millepora complanata</i> (“coral de fuego”)	2
2. Cnidoblastos y nematocistos	5
3. Crecimiento del coral: A, <i>M. alcornis</i> ; B, <i>M. tenera</i> ; C, <i>M. dichotoma</i>	6
4. 1a, <i>M. complanata</i> ; 1b,c, <i>M. tenera</i> ; 2, <i>M. incustans</i>	7
5. Diagrama de flujo del proceso de partición del extracto cloroformo-metanol (1:1) de <i>M. complanata</i> .	13

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADROS</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Columna cromatográfica abierta del extracto metanólico de <i>M. complanata</i> .	15



## ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

<b>CROMATOGRAMAS</b>	<b>PÁGINAS</b>
1. Perfil cromatográfico de la fracción VIII del extracto metanólico. Flujo de 1 ml/min.	19
2. Perfil cromatográfico de la fracción VIII del extracto metanólico. Flujo de 8 ml/min.	20
3. Perfil cromatográfico de la fracción 8. Fase móvil, cloroformo-metanol (95:5).	21
4. Perfil cromatográfico de la fracción 8. Fase móvil, cloroformo-metanol (9:1).	22
5. Reciclado de la fracción 3'.	23
6. Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, metanol.	24
7. Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, agua-metanol (9:1).	25
8. Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, agua-metanol (8:2).	26
9. Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, agua-metanol (7:3).	27
10. Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Columna de sílica gel (µPorasil 125 Å 10 µm, 19 X 300 mm); fase móvil, cloroformo-metanol (9:1)	28

11. Perfil cromatográfico de la fracción 6. Llevado a cabo en el día A	29
12. Perfil cromatográfico de la fracción 6. Llevado a cabo en el día B	30
13. Perfil cromatográfico de la fracción 6. Llevado a cabo en el día C	31
14. Perfil cromatográfico de la fracción 6. Llevado a cabo en el día D	32
15. Perfil cromatográfico de la fracción 7.	33

## ÍNDICE DE ESPECTROS

<b>ESPECTROS</b>	<b>PÁGINA</b>
1 RMN $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ de la fracción 3'.	34
2 RMN $^1\text{H}$ en $\text{CDCl}_3$ de la fracción 2'.	35
3 RMN $^1\text{H}$ en $\text{CD}_3\text{OD}$ de la fracción 7.	36

## RESUMEN

Los cnidarios o celenterados son un grupo predominante que incluye las medusas, hidroides, anémonas de mar, abanicos de mar y corales. A pesar de tener una apariencia muy variable, todos tienen un cuerpo con simetría radial. Su sistema digestivo consta de un estómago con una sola abertura que sirve de boca y de ano a la vez y generalmente está rodeada por tentáculos que poseen cápsulas punzantes (nematocistos) que narcotizan a su presa antes de introducirla a la boca. Dichos nematocistos pueden causar graves heridas en los humanos. El presente proyecto de investigación constituye parte del estudio sistemático del Coral de Fuego (*Millepora complanata*) del caribe mexicano que se desarrolla en el Departamento de Estudios Químicos y Farmacológicos de Productos Naturales. El trabajo de investigación incluye las etapas de extracción de muestras de coral colectadas en Puerto Morelos, Cancún, la partición cloroformo-metanol de los extractos, el fraccionamiento de la fracción metanólica, la determinación del perfil cromatográfico en cromatografía líquida de alta eficiencia de las fracciones con componentes mayoritarios y la caracterización espectroscópica de las mismas. Se logró aislar tres diferentes fracciones, de las cuales los espectros de RMN  $^1\text{H}$  no correspondían a compuestos puros o a un compuesto mayoritario sino más bien a una mezcla de compuestos, con lo que podemos concluir que el extracto metanólico de *M. complanata* presenta un perfil metabólico complejo y al mismo tiempo pobre en rendimiento. Sin duda alguna, estos resultados experimentales permitirán purificaciones futuras con el objeto de conocer la naturaleza de los compuestos y realizar ensayos farmacológicos para determinar una probable actividad.

## I. INTRODUCCIÓN

Las especies de coral *Millepora*, al igual que otros miembros del *phylum Cnidaria*, poseen nematocistos que contienen toxinas las cuales son inoculadas mediante filamentos punzantes, en caso de contacto con otro animal. El contacto humano con las especies de este género produce severas lesiones en la piel que incluyen quemaduras, eritema y una erupción que dura varios días. No obstante su abundancia y su importancia ecológica y toxicológica, a la fecha se tiene muy poca información con relación al proceso toxicológico inducido por el contacto con las especies de *Millepora*. Se desconoce también cuál es el tratamiento adecuado para las lesiones, así como la naturaleza de las toxinas.

Recientemente se ha observado en los corales el fenómeno de “blanqueamiento”; que se refiere a la pérdida del simbiote zooxantela incluyendo la reducción de sus pigmentos fotosintéticos. Aunque no se han establecido las causas del blanqueamiento se sugiere que los incrementos de temperatura observados con el Fenómeno del Niño (1-2 °C) son un factor que contribuye a la separación del coral y el nematocisto, al igual que la contaminación y los rayos ultravioleta que se filtran a consecuencia de la falta de capa de ozono.

De las 13 especies que conforman el género *Millepora*, solamente *M. tenera*, *M. alcicornis*, *M. dichotoma* y recientemente *M. complanata* han sido objeto de estudios bioquímicos y toxicológicos. Sin embargo, dichos estudios solamente permitieron purificar de manera parcial algunas toxinas de origen peptídico quedando aún muchas preguntas abiertas, por ejemplo: ¿los corales o nematocistos son capaces de sintetizar metabolitos secundarios?, ¿cuál es su naturaleza?, ¿existe diferencia entre la composición de muestras de coral blanqueado y de coral normal (coral que no presenta el fenómeno de blanqueamiento)?, ¿los metabolitos secundarios presentan actividad farmacológica?.

Con el objeto de profundizar los estudios químicos y farmacológicos del genero *Millepora*, el grupo de investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química inició un proyecto de investigación multidisciplinario con muestras de un coral del Caribe mexicano, *Millepora complanata* comúnmente conocido como “coral de fuego” (ver figura 1).

Como parte de este estudio sistemático, se determinó el perfil cromatográfico de una muestra de coral normal de *M. complanata* utilizando como método principal la cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).



**Figura 1.** *Millepora complanata* (“coral de fuego”)

## II. ANTECEDENTES

Los corales fueron designados por los griegos como *koralliones*, “adorno de mar”, y su origen se atribuía a una planta marina que crecía entre las serpientes de la cabeza de la legendaria Medusa. Posteriormente, el nombre de pólipo, “con muchos pies”, fue introducido por Aristóteles para designar al pulpo, pero después lo utilizó para denominar a una de las formas que presentan los corales, las anémonas y las medusas. En el siglo XVIII, el distinguido naturalista sueco Carlos Linneo les dio el nombre de zoofitos o animales plantas, y fue hasta el presente siglo en el que se les llamó celenterados o cnidarios. (Cifuentes y col., 1995).

Los celenterados son animales acuáticos, en su inmensa mayoría marinos, aunque algunos viven en agua dulce como la *Hydra* y otros hidrozoarios pertenecientes al género *Crodilophora*; incluso algunas anémonas han penetrado a las aguas salobres. Pueden vivir fijos o ser libres nadadores; son solitarios o coloniales y la simetría de su cuerpo es típicamente radiada. Durante su ciclo vital, los celenterados pueden presentar dos formas, la llamada “pólipo” y la llamada “medusa”. El cuerpo de los celenterados está formado por una boca central alrededor de la cual las diferentes partes del cuerpo se encuentran radialmente unidas. El eje principal del cuerpo es un eje oral-aboral. La boca se abre a una cavidad gastrovascular con un estómago central en el que tiene lugar la digestión extracelular y a partir del cual parten los canales para una distribución interna del alimento. Carecen de un verdadero ano de manera que los residuos son expulsados por la boca. La pared del cuerpo en sección transversal está formada por una capa tisular interna, la *gastrodermis* que produce el endodermo embrionario, y una capa externa, la *epidermis* que procede del ectodermo. Cada capa celular está formada por varios tipos de células especializadas y poseen las características de los verdaderos tejidos epiteliales, es decir, se adhieren una a otra firmemente a lo largo de sus márgenes, y sus actividades están coordinadas por células nerviosas. Entre



ambas capas existe una matriz gelatinosa, la *mesogea* que puede ser gruesa o delgada, contener escasas o numerosas fibrillas conectivas y tener ó no células errantes ameboides.

El sistema nervioso consta de uno o dos nervios, una red de neuronas y células sensoriales y efectoras (células granulares y contráctiles que transportan la respuesta). A diferencia de la sinapsis en los animales superiores, la sinapsis interneuronal es mayoritariamente bidireccional, es decir que la excitación puede ser propagada en cualquier dirección a través de la unión. Aunque las fibras de algunas neuronas pueden unirse formando nervios, no existen grupos de cuerpos de neuronas equivalentes al cerebro y ganglios de los animales superiores (Jessop, 1991).

Otras estructuras importantes de los celenterados son los tentáculos y los nematocistos. Los tentáculos son largos, delgados, huecos o extensiones sólidas de la pared que rodea la cavidad gastrovascular en uno o más ciclos. Los nematocistos o cápsulas urticantes son cuerpos escondidos que contienen una hebra enrollada (arpón) que bajo ciertas condiciones de estimulación, es lanzada al exterior de tal forma que el arpón penetra a su presa y lo inmoviliza por medio de sustancias tóxicas, la mayoría de naturaleza desconocida, emitidas por la punta de la hebra. Todos los cnidarios están provistos de nematocistos (Bayer y col., 1956); cada especie posee de 1 a 7 de alguna de las 40 variedades que hay. Los nematocistos se emplean en la captura de las presas y se clasifican de acuerdo a su mecanismo de ataque en tres clases principales: 1) *glutinosos*, que se adhieren al cuerpo de la víctima, 2) *envolventes*, que se enrollan alrededor del cuerpo de las presas como en el caso de pequeños crustáceos, y 3) *penetrantes*, de punta abierta y frecuentemente armados con púas y espinas que penetran en el cuerpo de la víctima inyectando toxinas (Figura 2)( Jessop, 1991).

El polimorfismo es un mecanismo de adaptación muy efectivo en los cnidarios. En muchos celenterados, los pólipos y medusas son generaciones alternativas, la generación pólipo con reproducción asexual y la generación



medusa con reproducción sexual. Los individuos pólipos y medusas a menudo difieren enormemente en tamaño, alimentación y hábitat, por consiguiente no compiten entre sí, lo que permite a las especies explotar un amplio hábitat y una gran gama de alimentos (Jessop, 1991).

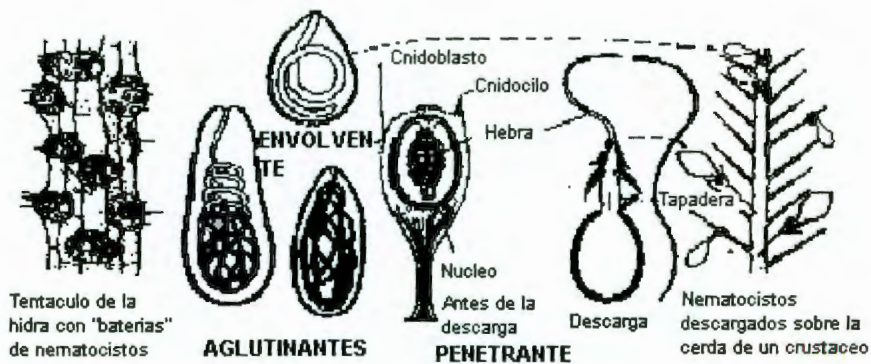


Figura 2. Cnidoblastos y nematocistos

Los cnidarios se dividen en tres clases: **hidrozoarios**, que durante su ciclo vital adoptan tanto la forma de pólipo como la de medusa; los **scifozoarios**, que sólo adoptan la forma medusa, y los **antozoarios**, que son pólipos que viven fijos (Cifuentes y col., 1995). Los hidrozoarios suelen presentarse con forma de pólipos con simetría radial, generalmente se encuentran en colonias pero también suelen estar solitarios. Un pólipo ordinario consiste de una base, de rama y de una terminal expansiva que sostiene la boca y tentáculos. Las colonias se originan por la formación de tallos que crecen en ramificaciones, son generalmente rígidas y protegidas por un esqueleto externo.

Los hidrozoarios se clasifican en seis órdenes: *Hydroidea*, *Milleporina*, *Stylasterina*, *Trachylina*, *Siphonophora* y *Chondrophora*, de los cuáles el orden

Milleporina contiene cuatro géneros: *Millepora*, *Millester*, *Axopora* y *Diamantopora*. Los pólipos dimórficos de *Millepora* y *Millester* (gastroporos y dactiloporos) están encapsulados en las cavidades tubulares del esqueleto de la colonia mientras que *Axopora* y *Diamantopora* se caracterizan por la presencia exclusiva de gastroporos.

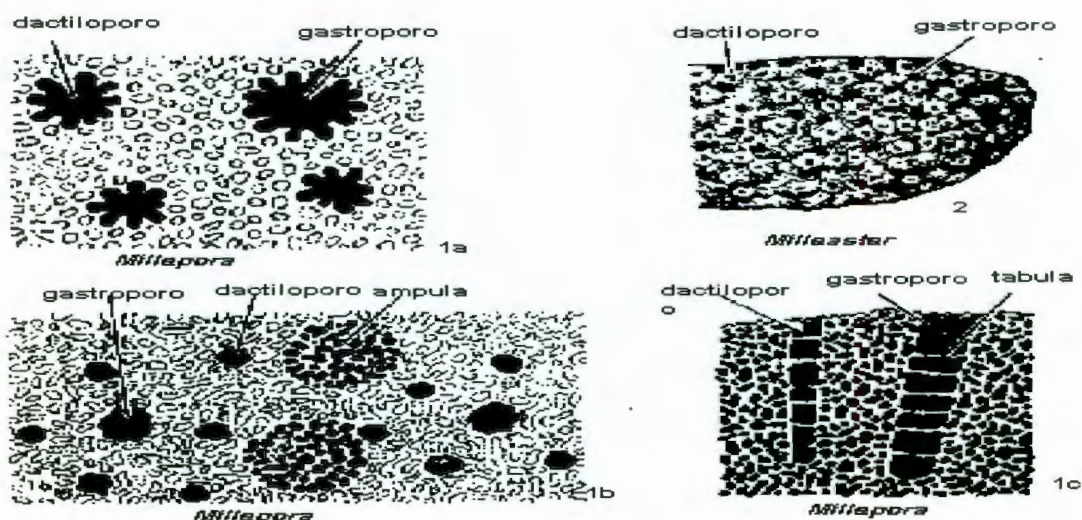
Las colonias de *Millepora* crecen en forma vertical cuando las condiciones de crecimiento son favorables, pero se extienden a lo largo cuando el medio ambiente no lo es. Algunas especies forman placas anchas, mientras otras producen ramificaciones con extremos puntiagudos o redondeados, extremidades anchas y comprimidas lateralmente y en general todas las ramificaciones en plano simple tienen forma de abanico (Figura 3).



**Figura 3.** Crecimiento del coral. A, *M. Alcornis*; B, *M. Tenera*; C, *M. dichotoma*

La superficie del esqueleto calcáreo muestra numerosas aberturas irregularmente poligonales de gastroporos rodeados por aberturas ligeramente pequeñas de dactiloporos (Figura 4). El contorno de estos poros es definitivamente estrellado en colonias de varias especies (Bayer y col., 1956).





**Figura 4.** 1a, *M. complanata*; 1b,c, *M. tenera*; 2, *M. incustans*

La mayoría de los celenterados son inofensivos para el hombre, sin embargo algunos de ellos pueden causar diferentes reacciones cutáneas o hasta un choque anafiláctico, ya sea por simple contacto o por la inoculación de sustancias venenosas. Las reacciones cutáneas incluyen eritema y salpullido, vesículas-pustulosas, hemorragia y lesiones ulcero-necróticas. Los síntomas generalmente son: náusea, vómito, dolor abdominal, dificultad para respirar y fiebre (Bianchini y col., 1988).

Debido a las propiedades urticantes de los hidrocorales se les conoce comúnmente como “corales urticantes”. Existen por lo menos dos mecanismos de respuesta en los que los hidrocorales pueden causar daños cutáneos: la liberación de histamina como respuesta al veneno del nematocisto; y la reacción hacia un cuerpo extraño inducida por los fragmentos de carbonato de calcio en los tentáculos que penetran rápidamente causando la herida (Bianchini y col. 1988).

En 1987 se reportó un caso de quemaduras severas cuando un nadador tuvo contacto con un hidrozoario (*Millepora dichotoma*). A la fecha, se han reportado síntomas como quemaduras, eritema y en ocasiones formaciones

postulantes causadas por el veneno de este coral. El dolor desaparece en poco tiempo después del contacto, pero el salpullido persiste por días o algunas semanas (Sagi y col., 1987).

A pesar de los sucesos, pocos estudios científicos se han realizado para explicar la naturaleza de los efectos farmacológicos observados. En la Escuela de Marina y Ciencias Atmosféricas de la Universidad de Miami, Wittle y colaboradores purificaron las toxinas de *M. alcicornis* y *M. dichotoma* mediante técnicas cromatográficas y electroforesis. Para *M. alcicornis* se aisló una toxina de origen proteico, termolábil, no-dializable y sensible al pH. La actividad farmacológica fue determinada por la inoculación intravenosa de la toxina a ratones de 20-25 g. Inoculaciones de 2–3  $\mu\text{g}$  de toxina inmediatamente producían convulsiones, seguidas de paro respiratorio y muerte. Sin embargo, la administración de dosis sub-letales al parecer modifican de manera favorable la respuesta de una segunda inoculación. Se determinó una dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) de 40  $\mu\text{g}$  de proteína por Kg de peso (Wittle y col., 1971). En el caso de *M. dichotoma* se aisló una toxina también de origen proteico, soluble en agua y no dializable con una  $\text{DL}_{50}$  de 38  $\mu\text{g}$  de proteína por Kg de peso. A diferencia de *M. alcicornis*, una inoculación de dosis subletal no promueve una modificación en la respuesta farmacológica (Middlebrook y col., 1971).

Wittle y colaboradores aislaron de los nematocistos de *Millepora tenera* una toxina de origen proteico con una  $\text{DL}_{50}$  en ratones de 40  $\mu\text{g}$  de proteína por Kg de peso. La letalidad observada para la toxina de *M. tenera* en el extracto de nematocistos es comparable con los extractos puros de *M. alcicornis* (40  $\mu\text{g}$  por kg de peso) y *M. tenera* (38  $\mu\text{g}$  por kg de peso). Cabe mencionar que la temperatura y el pH en que la toxina es estable, es similar en los extractos de *M. tenera* y *M. alcicornis* (Wittle y col., 1974).

Recientemente, un estudio bioquímico y farmacológico del coral de fuego *Millepora complanata* fue descrito (Rojas y col., 2002). El extracto proteico produce una estimulación sobre las contracciones espontáneas de íleon de

cobayo dependiente de la concentración ( $DE_{50} = 0.876 \mu\text{g/ml}$ ). Los resultados experimentales sugieren que las contracciones inducidas por la fracción proteica son causadas por una acción directa sobre las células del músculo liso a través de un incremento en la permeabilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  debido parcialmente a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes.

Continuando con el estudio sistemático de *M. complanata*, el presente trabajo de investigación describe los resultados del análisis cromatográfico por HPLC de un extracto metanólico de muestras de coral normal.

### III. OBJETIVOS

#### 1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil cromatográfico por HPLC del extracto metanólico del coral normal (pólipos y nematocistos) de *Millepora complanata*.

#### 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Preparar el extracto metanólico del "Coral de Fuego" (*Millepora complanata*).
- b) Fraccionar el extracto mediante una columna cromatográfica.
- c) Determinar las condiciones de trabajo en HPLC para la obtención de cromatogramas óptimos de las fracciones con compuestos mayoritarios.
- d) Obtener de los espectros de los compuestos aislados.

## IV. METODOLOGÍA

### 1. MATERIALES

- 1 Espectrofotómetro UV/VIS 635/Varian Techtron.
- 1 Sistema de HPLC marca Waters que incluye: a) sistema de control y bombeo modelo 600E con capacidad analítica y semipreparativa; b) válvula de inyección manual modelo 7725i; c) detector UV/VIS programable modelo 486; y d) estación de trabajo Millennium<sup>32</sup> para análisis y procesamiento de datos.
- 1 Columna cromatográfica  $\mu$ Porasil 125 Å, 10  $\mu$ m, de 3.9X300 mm.
- 1 Columna cromatográfica  $\mu$ Porasil 125 Å, 10  $\mu$ m, de 19X300 mm.
- 1 Columna Prep Nova Pak HR C18 60 Å, 6  $\mu$ m, de 3.9X300 mm.
- 1 Rotaevaporador Büchi de alto vacío, con baño, soporte y elevador.
- 1 Lámpara Ultravioleta de onda corta y onda larga ( $\lambda = 254$  y 365 nm).
- 1 Bomba de alto vacío para Rotaevaporador 0.1  $\mu$  de Hg motor ¼ HP.
- 1 Balanza analítica marca Ohaus (precisión 0.00001 g).
- 1 Columna cromatográfica de vidrio.
- Material de laboratorio (matraces, pipetas, vasos, etc.).
- Disolventes orgánicos: metanol (Mallinckrodt grado HPLC), cloroformo (J. T. Baker, grado HPLC), diclorometano (Mallinckrodt grado HPLC)
- Agentes de soporte cromatográfico para la realización de cromatografía en columna: gel de sílice 60
- Cromatofolios de gel de sílice en soporte de aluminio, 60 F<sub>254</sub>, espesor de capa 0.2 mm, Merck.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 **Recolección y transporte de los especímenes de *M. complanata***

Los trabajos de muestreo y recolección se llevaron a cabo en la Estación Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Quintana Roo, donde se dispone de equipo adecuado para estas labores. La muestra se colectó por buzos a una profundidad de 1-10 metros en los arrecifes coralinos de Cancún y Cozumel. Cabe mencionar que debido a la naturaleza del proyecto así como a la distribución y protección legal del coral de fuego (especie en peligro de extinción) el muestreo no fue muy amplio. Las muestras fueron congeladas en hielo seco y transportadas para su extracción al laboratorio de productos naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### 2.2 **Preparación del extracto**

El coral fue fraccionado mecánicamente en pequeños trozos y posteriormente sometido a un proceso de maceración. La muestra de coral se maceró en una mezcla cloroformo-metanol 1:1 por siete días con constante agitación. De esta forma se pudieron extraer los metabolitos secundarios de mediana y alta polaridad. El material resultante se filtró y se concentró al vacío.

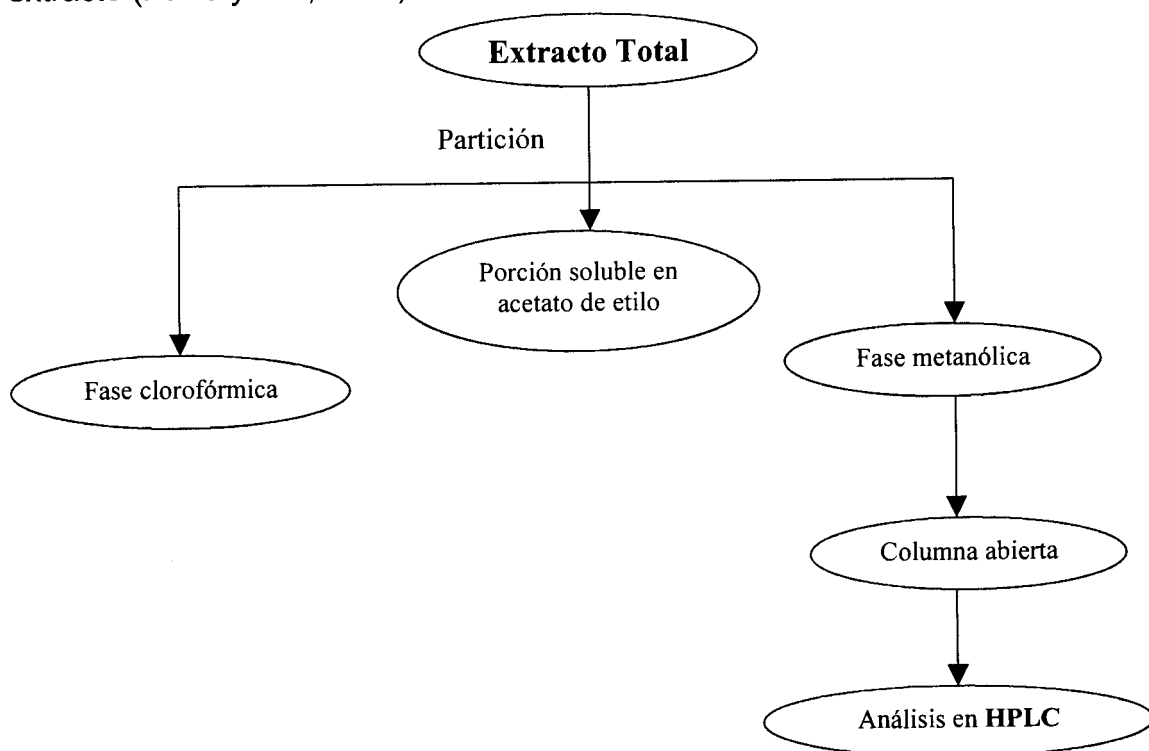
### 2.3 **Fraccionamiento del extracto**

El extracto se pasó a un matraz Erlenmeyer en donde se le agregó  $\text{CHCl}_3$  con el objeto de disolver los componentes de mediana polaridad, posteriormente se filtró en papel Whatman del No. 2, este proceso se repitió hasta obtener una solución incolora asegurando así, el aislamiento de los compuestos posibles. El filtrado se concentró al vacío. La parte que no fue soluble en  $\text{CHCl}_3$  fue sometida a una trituración con acetato de etilo, la solución resultante fue concentrada y el sólido restante se disolvió con metanol. Después de una filtración, se concentró el extracto metanólico. Los extractos obtenidos



se guardaron en el refrigerador a 5 °C para su uso posterior. El sólido resultante de las extracciones se descartó (Ver figura 5).

El siguiente paso fue preparar una columna abierta utilizando como adsorbente 229 g de sílica gel 60 G, Merck. El proceso de elusión se efectuó con diclorometano, diclorometano-acetona, acetona, acetona-metanol, y metanol en diferentes proporciones. Se colectaron muestras de 225 ml cada una y se obtuvieron un total de 86 fracciones; cada fracción se analizó en cromatografía en capa fina siguiendo las técnicas convencionales (Mohrin, Neckers, 1979). Se utilizaron cromatofolios de sílica gel (Cromatofolios Al de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, espesor de capa 0.2 mm, Merck), empleando diversos sistemas de elusión. Se utilizó una mezcla de sulfato cérico y ácido sulfúrico (12 g de sulfato cérico, 22.2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. y 350 mg de hielo picado) como agente cromógeno para la visualización de los constituyentes presentes en el extracto (Pavia y col., 1990).



**Figura 5.** Diagrama de flujo del proceso de partición del extracto cloroformo-metanol (1:1) de *M. complanata*.

## **2.4 Análisis cromatográfico por HPLC**

Una vez que se fraccionó la muestra por medio de la columna abierta las fracciones se analizaron por HPLC.

Las fracciones objeto de estudio se prepararon de la siguiente forma: 200  $\mu$ l de la muestra fueron disueltas en 800  $\mu$ l de cloroformo (J. T. Baker, grado HPLC) y filtrada a través de una membrana. Posteriormente las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo, descrito anteriormente (ver punto IV-1). La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 254 nm. Las columnas empleadas fueron de dos tipos: analíticas (Columna Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6  $\mu$ m y  $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, con medidas de 3.9X300 mm) y preparativas ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, con medidas de 3.9X300 mm). Se usó una línea de inyección (loop) de 20, 100, y 500  $\mu$ l. Cloroformo (J. T. Baker grado HPLC), diclorometano (Mallinckrodt grado HPLC), metanol (Mallinckrodt grado HPLC) y agua (grado HPLC) fueron utilizados como sistemas de elusión (Jonson y Stevenson, 1978).

## **2.5 Caracterización de las muestras**

Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un instrumento varian VXR-300 MHz en la Facultad de Química de la UNAM.

## V. RESULTADOS

La cantidad de muestra seca de coral normal de *M. complanata* que se recibió de Puerto Morelos fue de 602 g, de la cual después de la maceración en MeOH-CHCl<sub>3</sub> (1:1), y de la extracción con metanol, se obtuvo 9.044 g; este extracto se sometió a una columna cromatográfica abierta.

El cuadro 1 resume el fraccionamiento por columna abierta del extracto metanólico. La fracción más abundante y menos compleja de acuerdo al análisis cualitativo en cromatografía en capa fina fue la fracción combinada 70-89, con un peso de 3.184 g. Era un líquido incoloro e inodoro de consistencia aceitosa. Esta fracción denominada fracción VIII fue sometida al análisis por HPLC.

**Cuadro 1.** Columna cromatográfica abierta del extracto metanólico de *M. complanata*.

<b>Sistema de elusión</b>	<b>proporción</b>	<b>Fracciones combinadas</b>	<b>Asignación</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	1-11	I
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	9:1	12-24	II
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	8:2	25-50	III, IV
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	7:3	51-65	V, VI
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	6:4	66-69	VII
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	1:1	70-89	VIII
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	4:6	90-104	IX
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Acetona	3:7	105-113	X
Acetona	100	114-120	XI
Acetona-MeOH	6:4	121-146	XII

En este análisis, se utilizó una columna analítica de gel de sílice, con un flujo de 1ml/min, un volumen de inyección de 20  $\mu$ l y utilizando como eluyente diclorometano durante 120 minutos.

El tiempo de elusión de la muestra fue de aproximadamente 18 minutos y se obtuvo un cromatograma que presentó 4 picos principales no definidos con los tiempos de retención (Tr) de: 3.2, 4.3, 5.1 y 7.2 min (Cromatograma 1). Después de realizar el proceso cuatro veces, se observó reproducibilidad, razón por la cual se decidió utilizar una columna preparativa.

Se realizó un escalamiento a nivel preparativo, utilizando un volumen de inyección de 500  $\mu$ l, un flujo de 8 ml/min, un tiempo de corrida de 120 minutos y como eluyente diclorometano. La muestra se inyectó 10 veces bajo estas condiciones y se colectaron 8 grupos de fracciones (Cromatograma 2), de las cuales las fracciones con tiempo de retención (Tr) de 16.5 min, de 21.8 min y de 26.0 min, fueron identificadas como fracción 6, 7 y 8 respectivamente. La fracción 8 (Tr = 26.0 min) fue sometida a otro análisis por HPLC con el objeto de verificar la pureza de la muestra. Esta muestra se inyectó en una columna analítica de gel de sílice con un flujo de 1 ml/min y un volumen de inyección de 20  $\mu$ l utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo-metanol (95:5) en un tiempo de corrida de 120 minutos. De aquí, se obtuvo un cromatograma poco complejo, prácticamente con tres picos principales con los Tr de 2.9, 3.2 y 3.8 min (Cromatograma 3).

Tratando de encontrar una mejor resolución, se volvió a inyectar la misma muestra bajo las mismas condiciones, pero variando la proporción de los eluyentes a cloroformo-metanol (9:1). Con este sistema, se obtuvo el mismo comportamiento cromatográfico con Tr de 2.7 min, Tr de 2.9 min y Tr de 3.3 min ; (Cromatograma 4). Siguiendo estas condiciones, los tres picos fueron colectados utilizando una columna preparativa de gel de sílice con un volumen de inyección de 500  $\mu$ l, un flujo de 8 ml/min y un tiempo de corrida de 120 min. Este proceso de separación permitió aislar las muestras correspondientes a la

fracción 2' (Tr = 2.7 min) y 3' (Tr = 3.3 min) con un peso de 35.71 mg y 241.48 mg respectivamente.

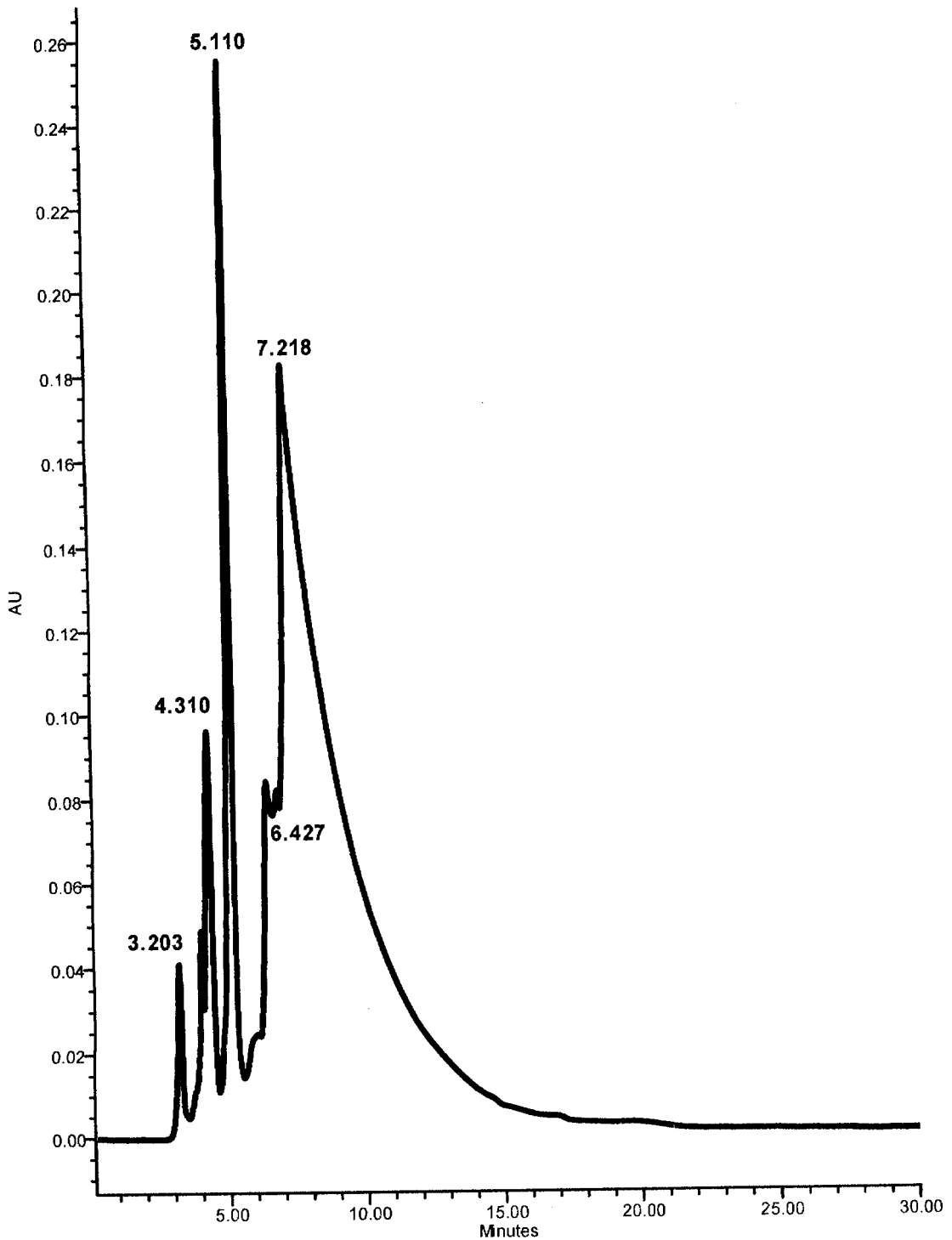
La muestra correspondiente a la fracción 3' (Tr = 3.3 min) se recirculó 5 veces bajo las mismas condiciones experimentales para verificar su pureza. El cromatograma 5 ilustra el proceso de purificación, para el que se utilizó una válvula de recirculación de muestras. El material resultante de este proceso fue concentrado al vacío mediante un rotaevaporador obteniéndose 56 mg de muestra. Posteriormente, la muestra fue enviada a la Facultad de Química de la UNAM para obtener el espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ , espectro 1).

La fracción 2' (Tr = 2.7 min, cromatograma 4) se analizó con una columna analítica Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6  $\mu\text{m}$  con medidas de 3.9X300 mm, utilizando metanol como eluyente, con un flujo de 1 ml/min y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ , el tiempo de corrida fue de 60 minutos. Bajo estas condiciones se obtuvo el cromatograma 6. Posteriormente la muestra se inyectó tres veces más, bajo las mismas condiciones pero con diferentes proporciones de eluyentes: agua-metanol 9:1, 8:2 y 7:3 (Cromatogramas 7, 8 y 9). Como no se observó una mejora en cuanto a la resolución de los picos se decidió utilizar nuevamente la columna analítica de sílica gel con un flujo de 1 ml/min durante 60 minutos, un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$  y utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo-metanol (9:1). El cromatograma resultante presentó un pico principal, el cual se trató de aislar por medio de cuatro inyecciones más en columna preparativa con un flujo de 8 ml/min y un volumen de inyección de 500  $\mu\text{l}$  durante 60 minutos, (Cromatograma 10). Se obtuvieron 15 mg de muestra los cuales se sometieron a una espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 2).

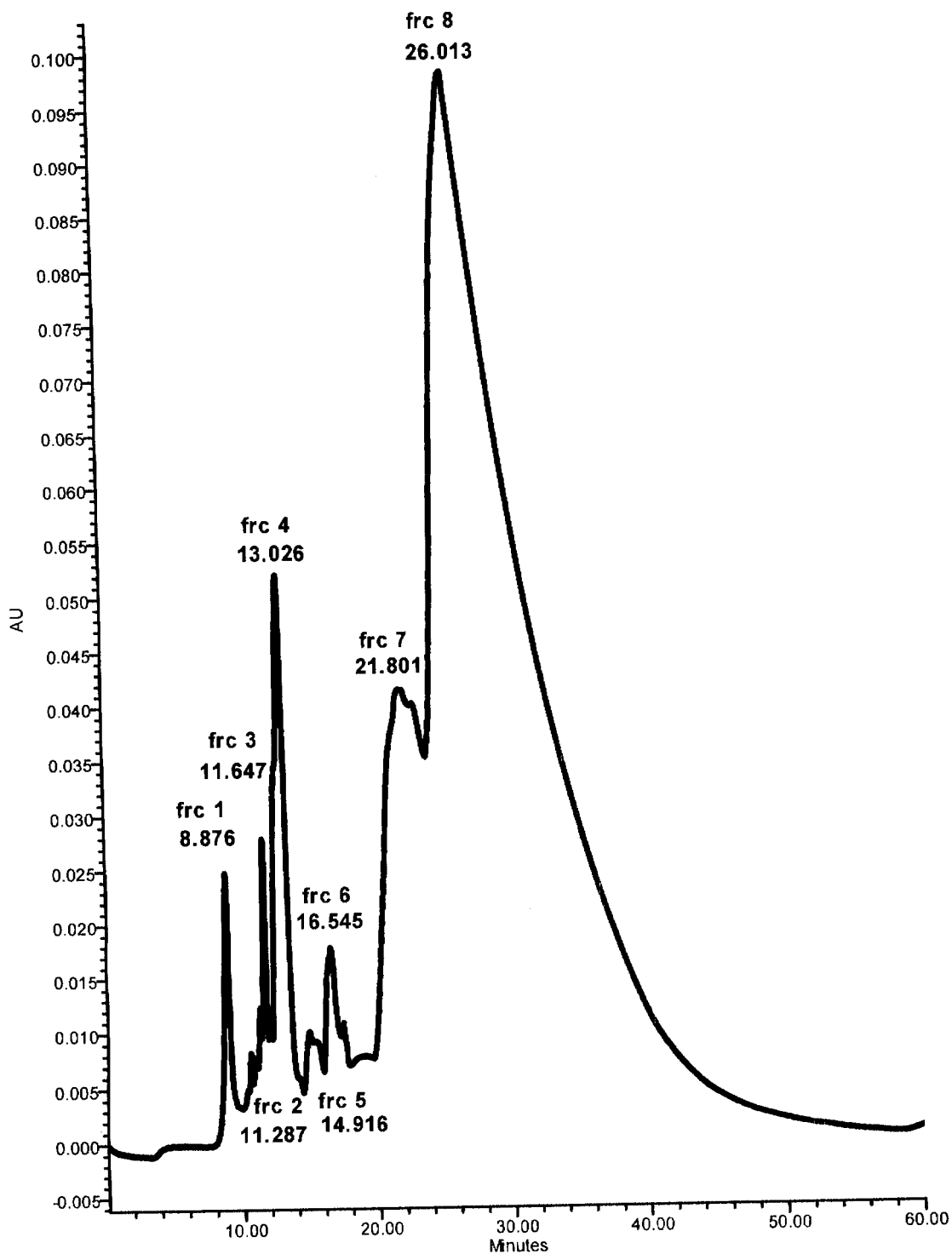
La fracción 6 (Tr = 16.5 min) de la muestra original (47.19 mg, cromatograma 2) se inyectó en una columna preparativa con un flujo de 8 ml/min, un volumen de inyección de 500  $\mu\text{l}$  y diclorometano como eluyente, durante 60 minutos. El cromatograma resultó ser algo complejo y las veces que

se inyectó tuvo diferente resolución, pero debido a que la muestra era muy escasa sólo se pudo inyectar tres veces más (Cromatogramas 11, 12, 13 y 14).

Continuando con el proceso, se analizó la fracción 7 ( $T_r = 21.8$  min) (29.15 mg, cromatograma 2) con una columna preparativa de gel de sílica, con un volumen de inyección de 100  $\mu$ l, un flujo de 8 ml/min y con cloroformo como eluyente. Solo se pudo inyectar tres veces, en las cuales se aisló el pico principal (Cromatograma 15) para obtenerse 11.74 mg. De la muestra se obtuvo un espectro de resonancia magnética nuclear protónica en las Instalaciones de la Facultad de Química de la UNAM (Espectro 3).

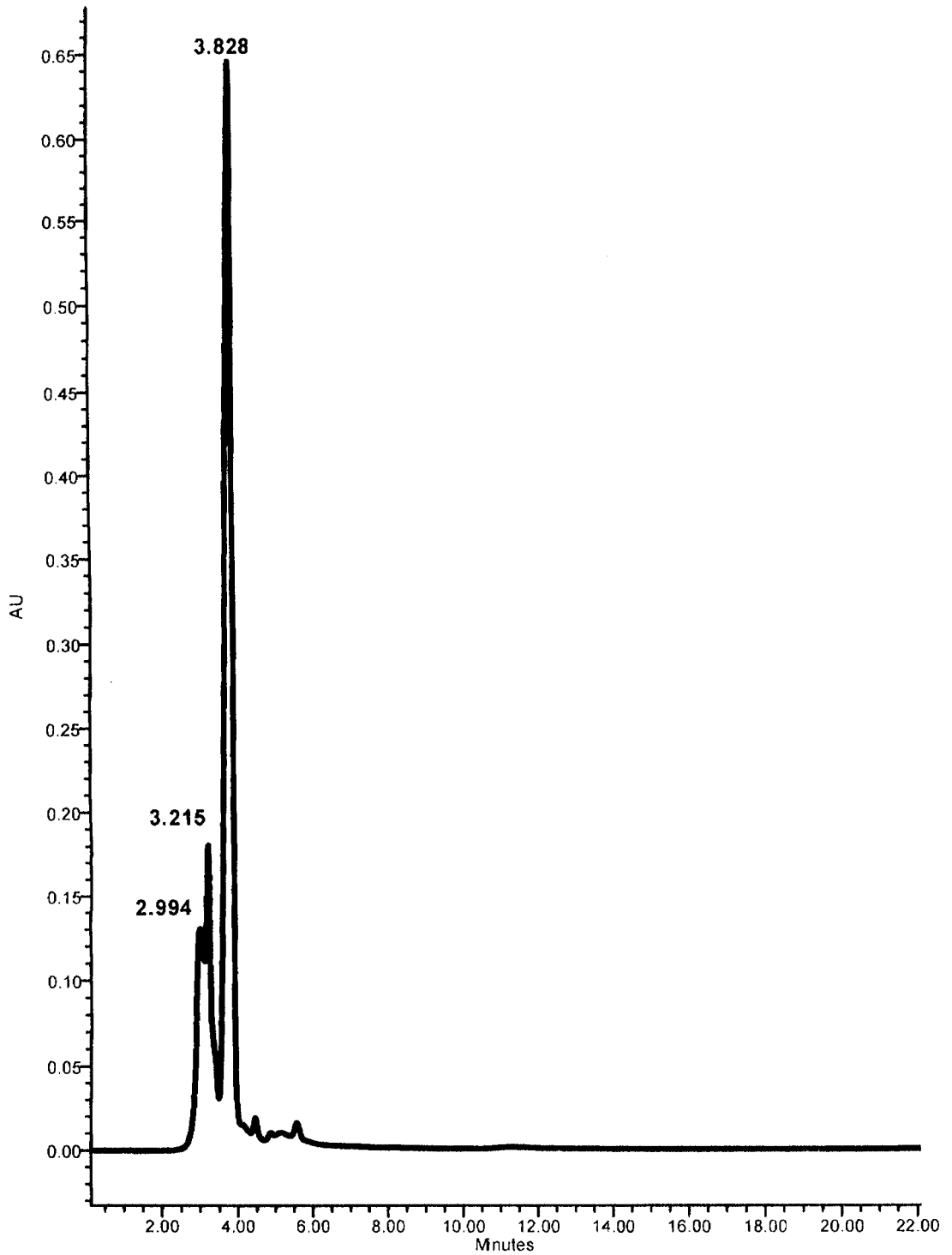


**Cromatograma 1.** Perfil cromatográfico de la fracción VIII del extracto metanólico. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 3.9 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 1ml/min.

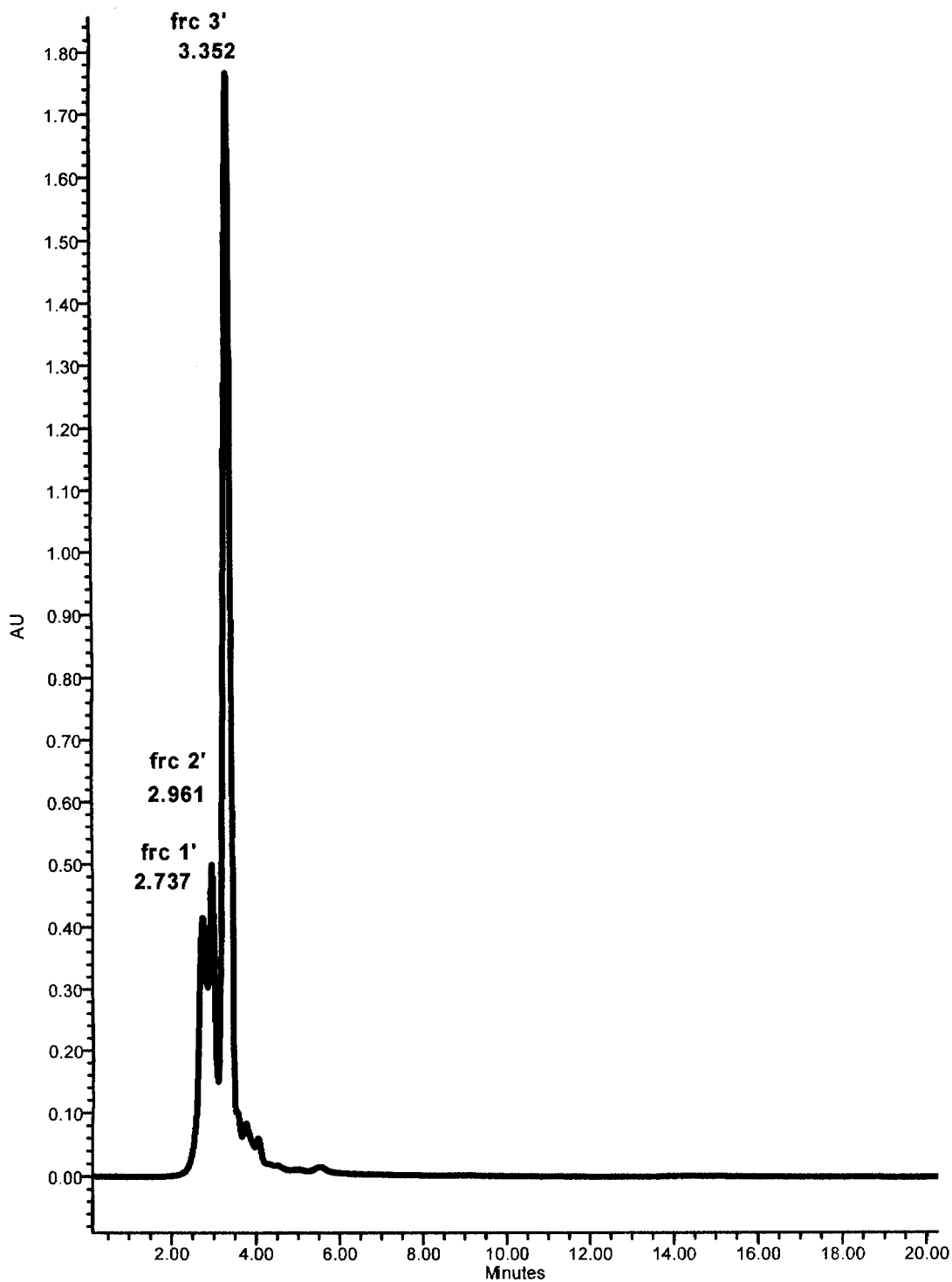


**Cromatograma 2.** Perfil cromatográfico de la fracción VIII del extracto metanólico. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 8ml/min.

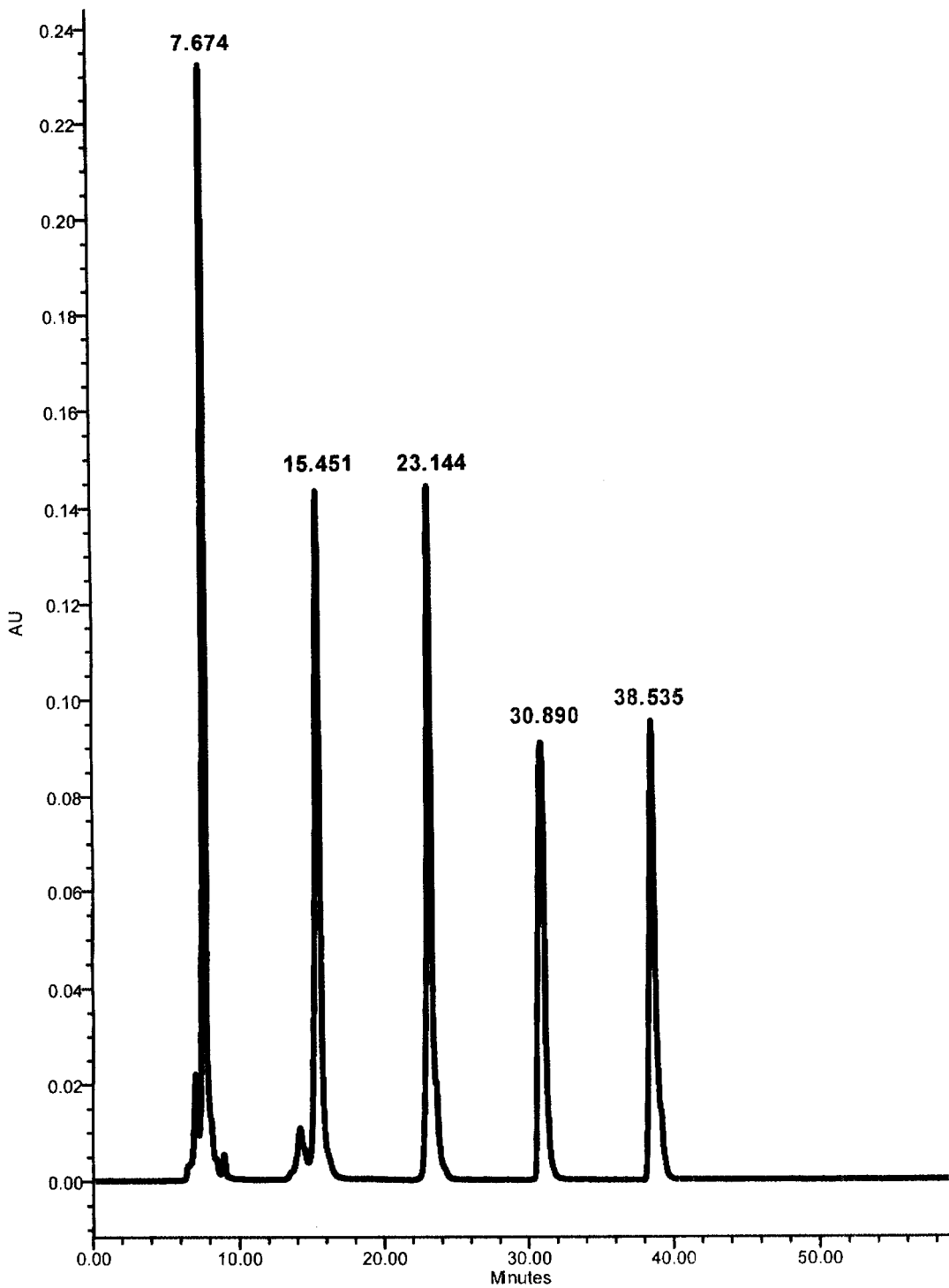




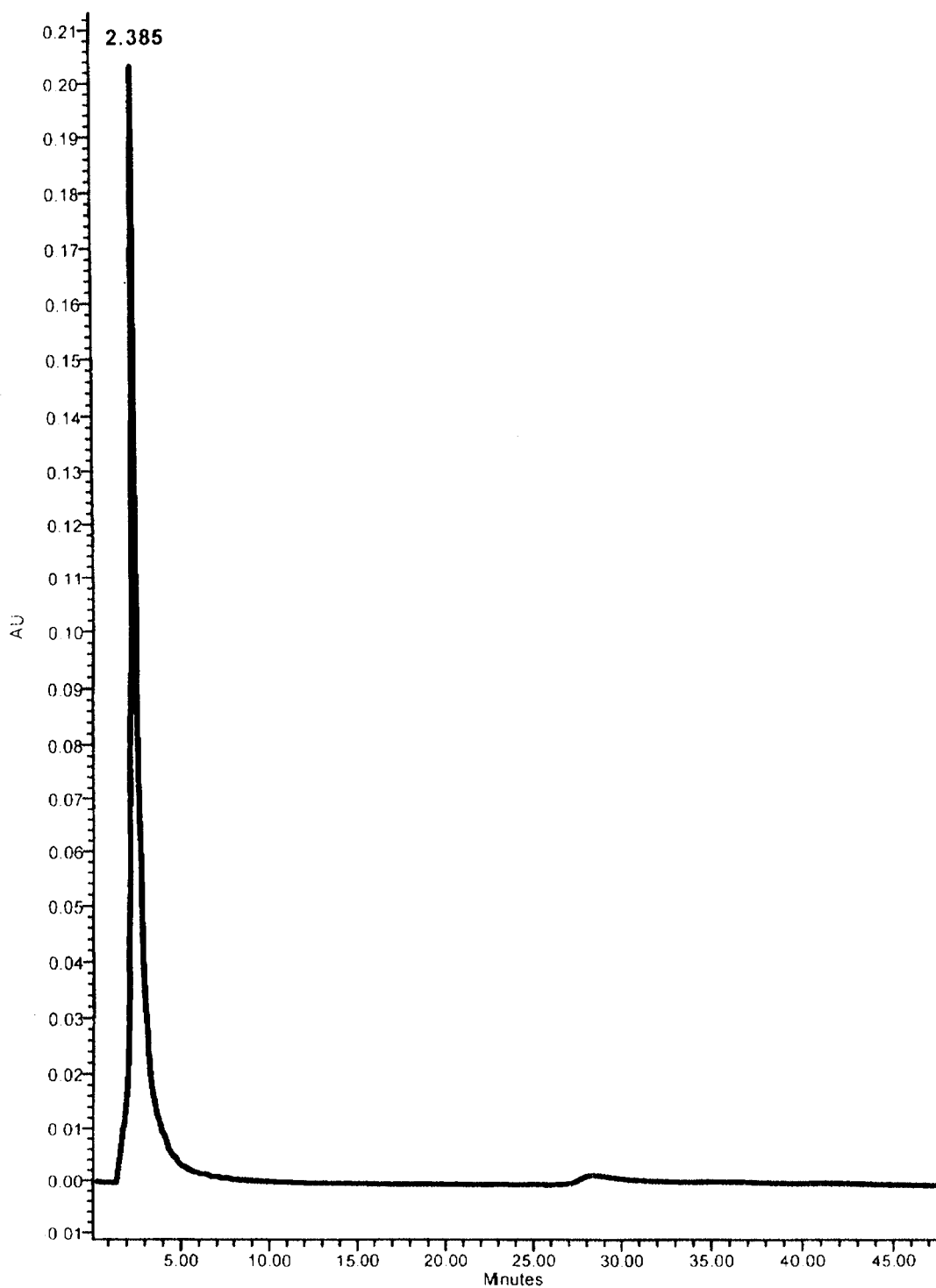
**Cromatograma 3.** Perfil cromatográfico de la fracción 8. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 3.9 X 300 mm); fase móvil, cloroformo-metanol (95:5); flujo, 1ml/min.



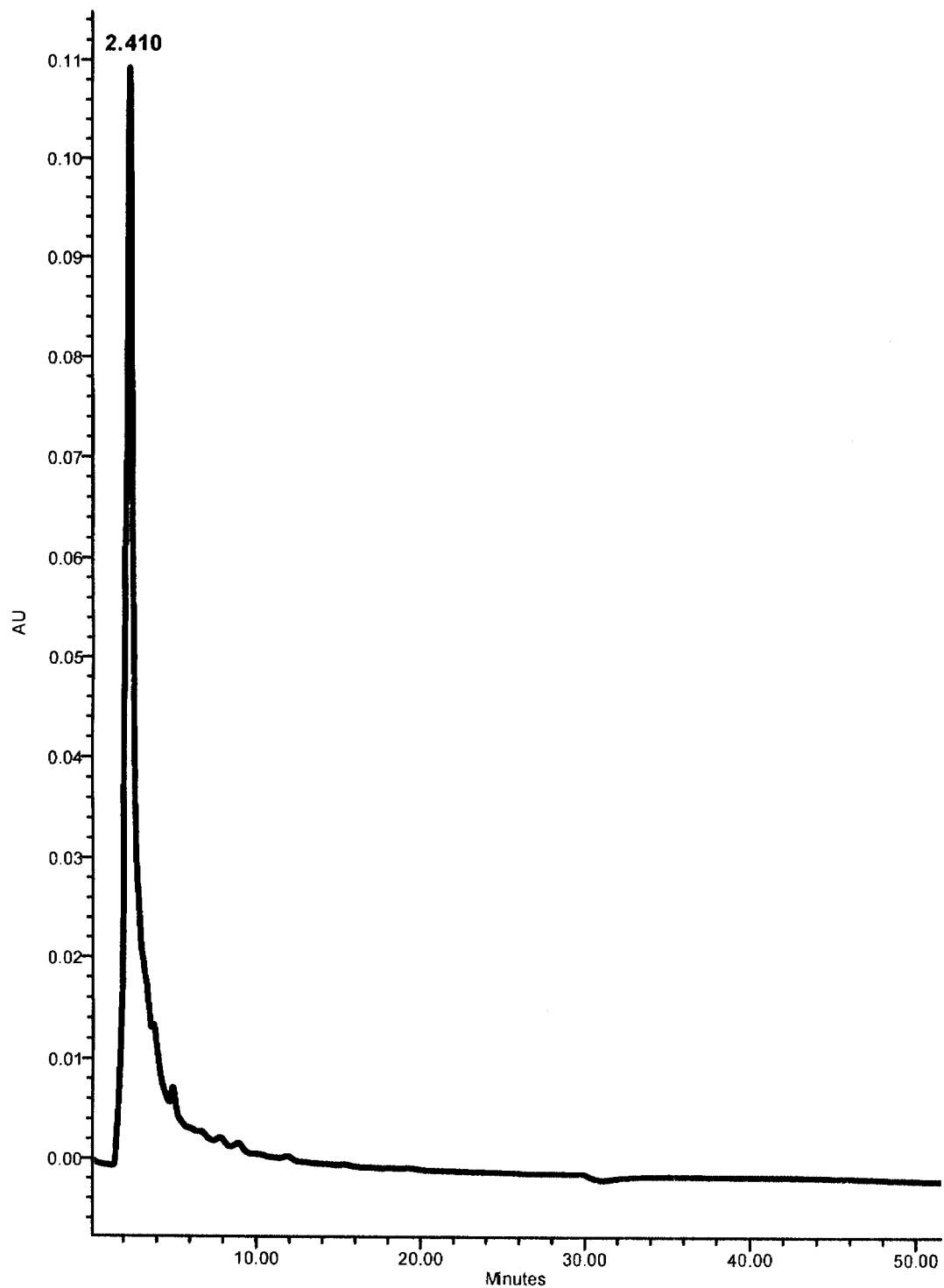
**Cromatograma 4.** Perfil cromatográfico de la fracción 8. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 3.9 X 300 mm); fase móvil, cloroformo-metanol (9:1); flujo, 1ml/min.



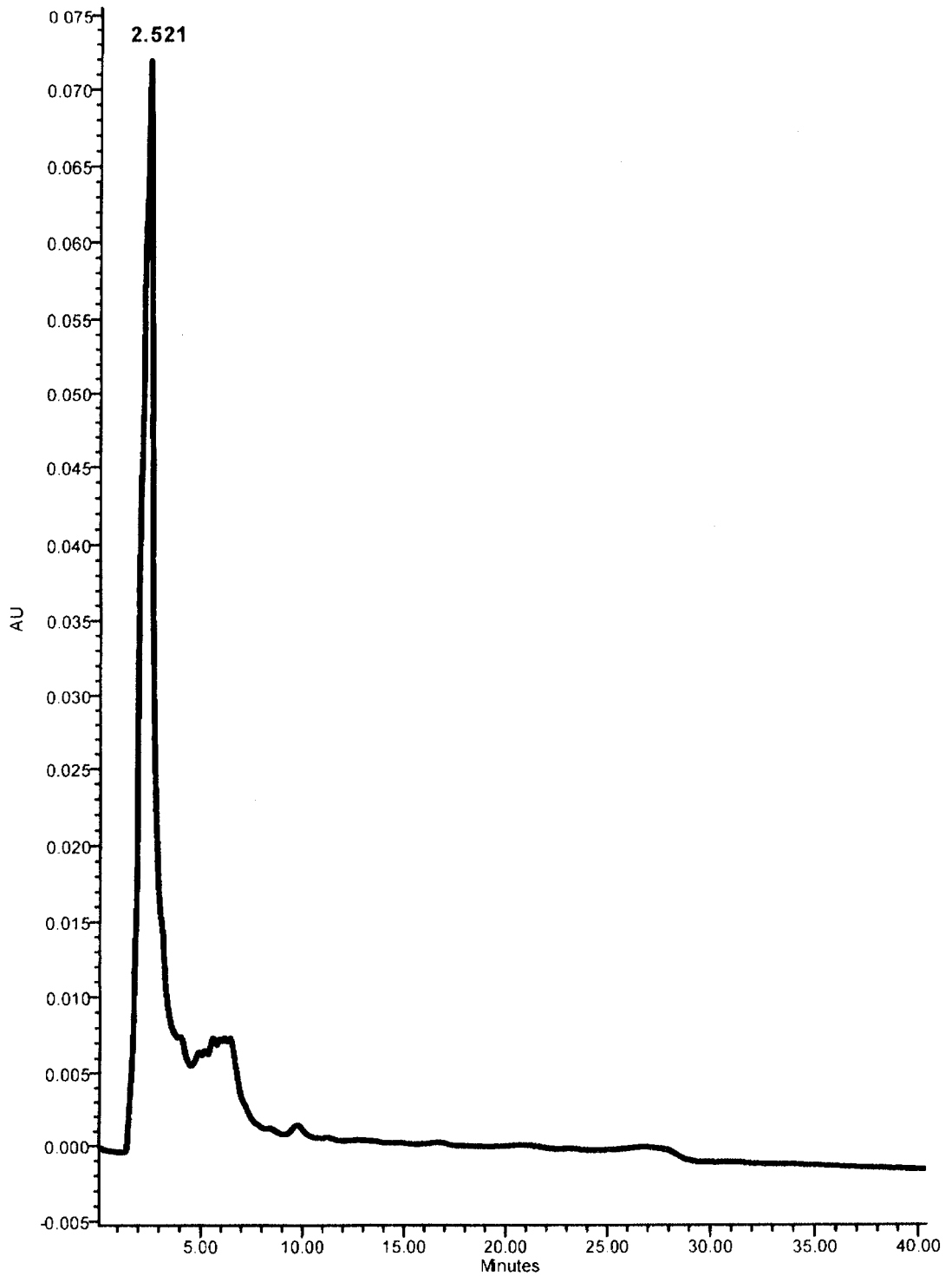
**Cromatograma 5.** Reciclado de la fracción 3'. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano cloroformo-metanol (9:1); flujo, 8ml/min.



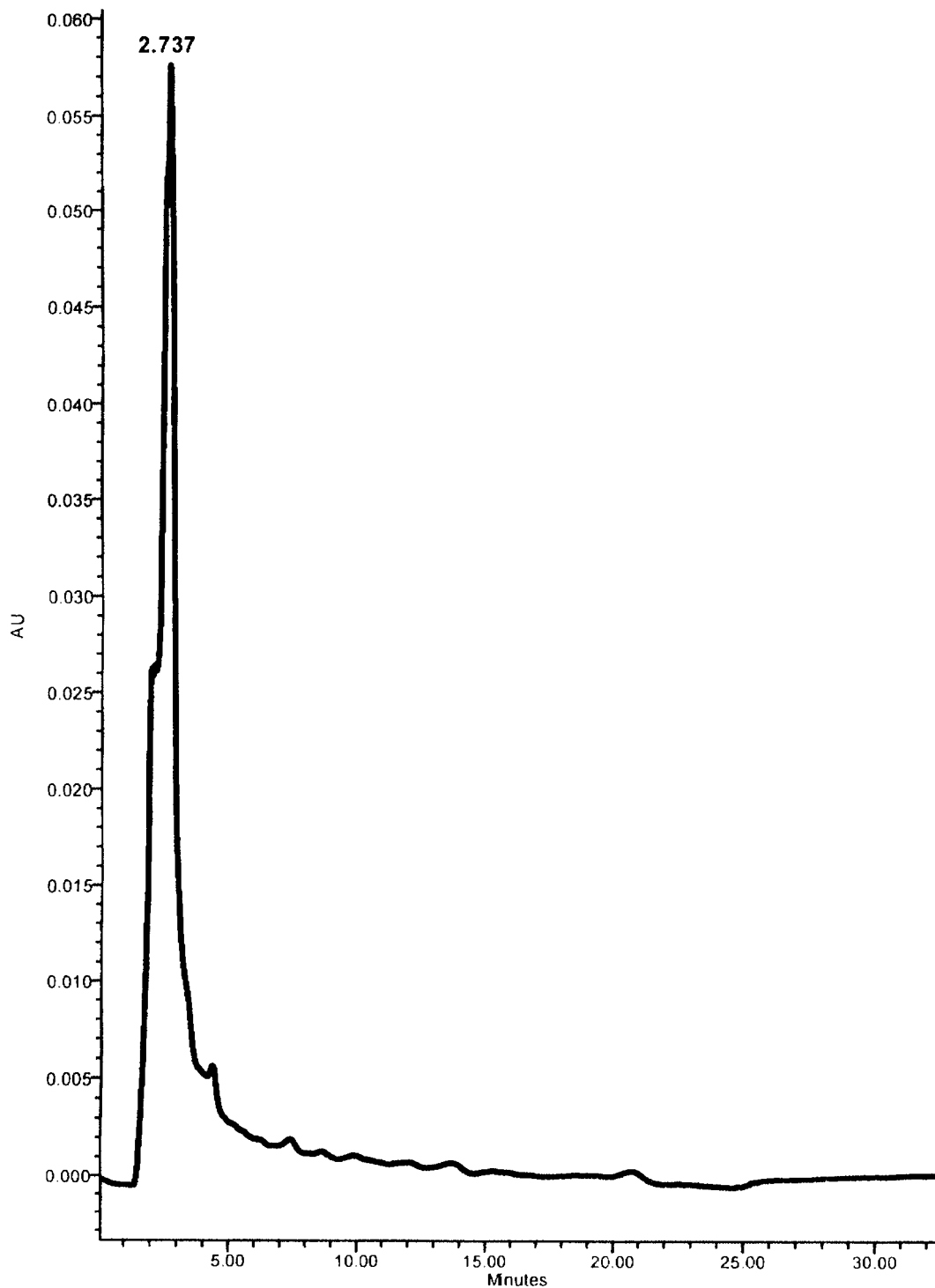
**Cromatograma 6.** Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, metanol; flujo, 1ml/min.



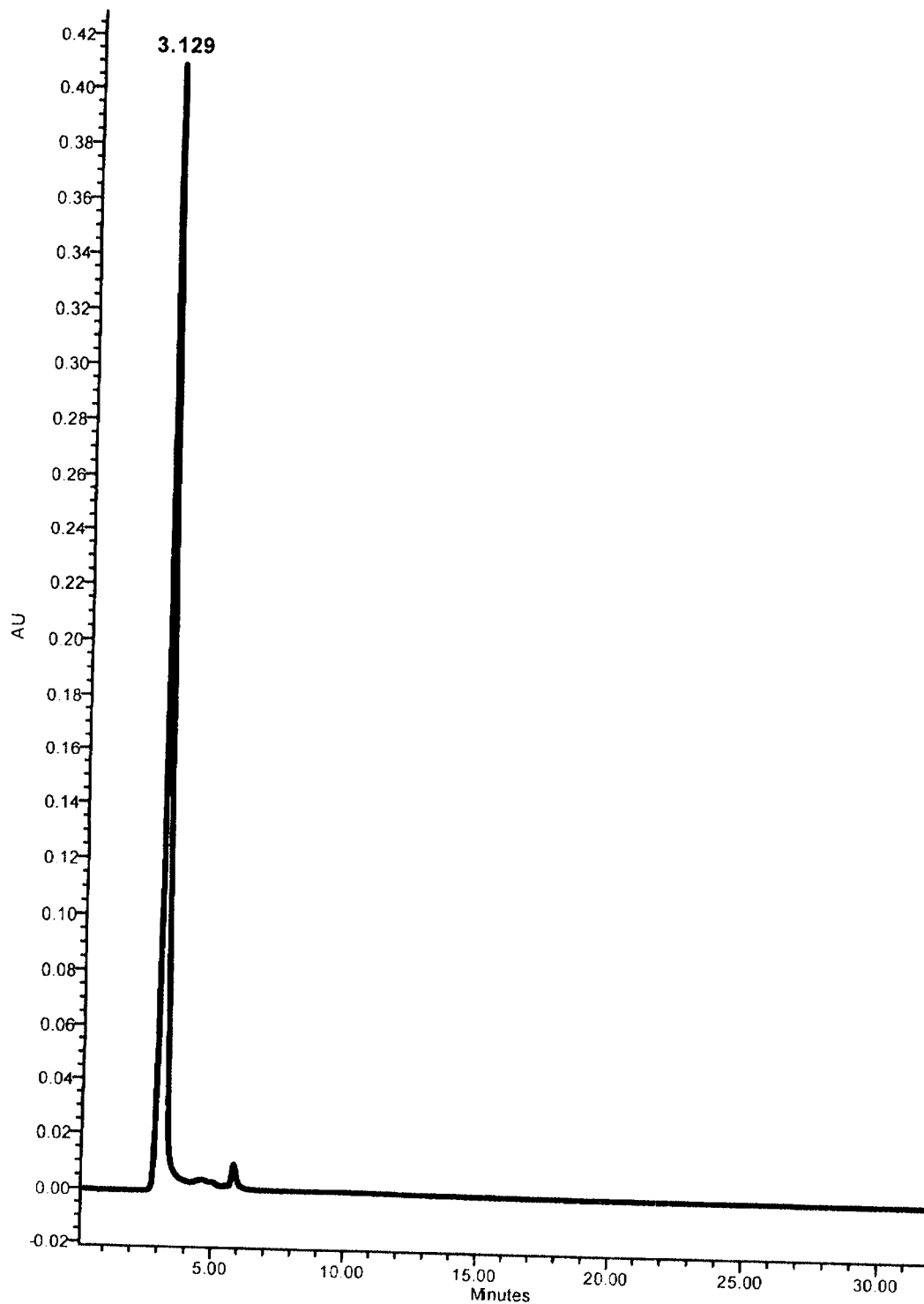
**Cromatograma 7.** Perfil cromatográfico de la fracción 2' . Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, agua-metanol (9:1); flujo, 1ml/min.



**Cromatograma 8.** Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, agua-metanol (8:2); flujo, 1ml/min.

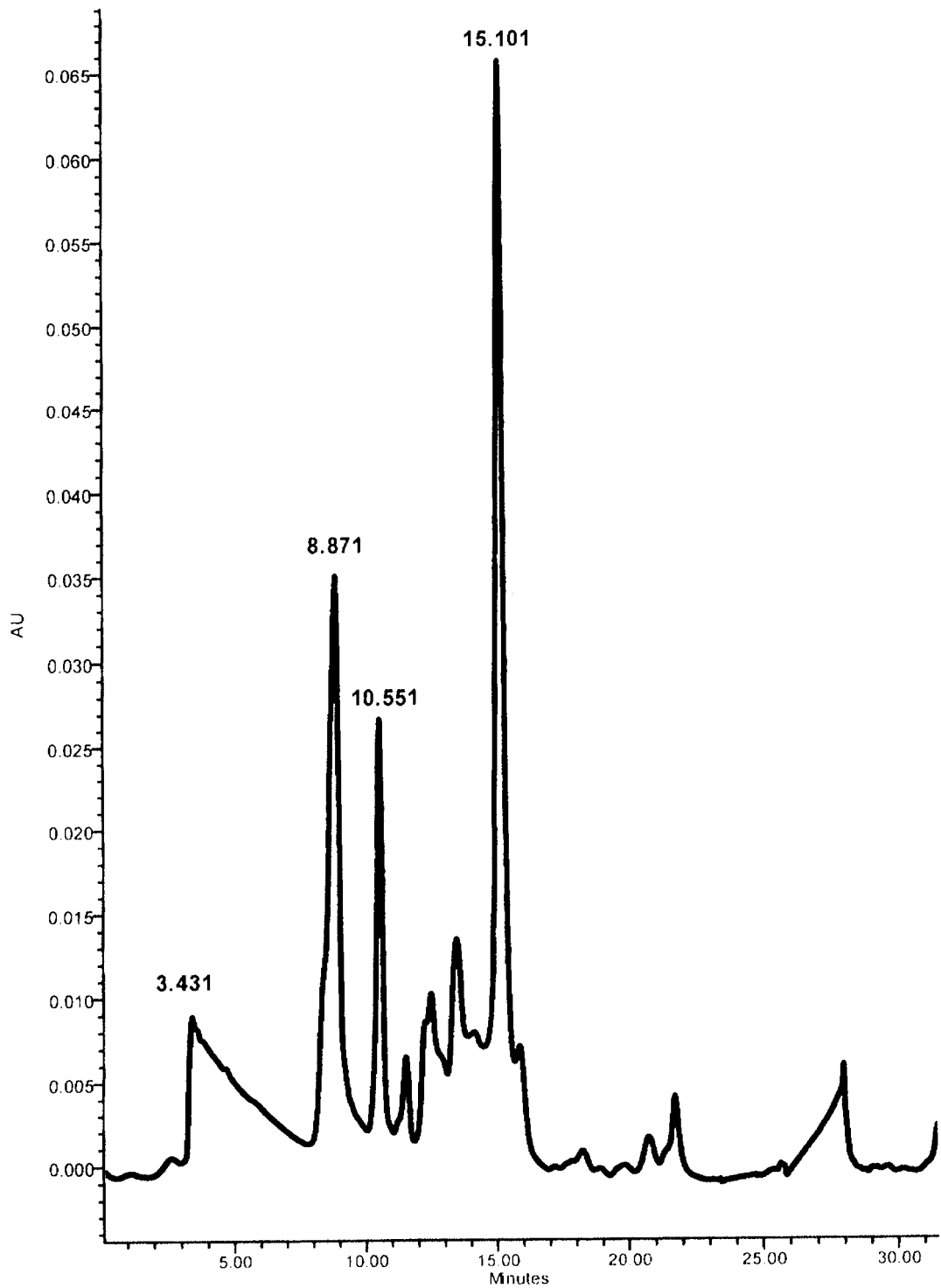


**Cromatograma 9.** Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna C18 (Prep Nova Pak HR C18 60 Å 6 µm, 3.9 X 300 mm); fase móvil, agua-metanol (7:3); flujo, 1ml/min.

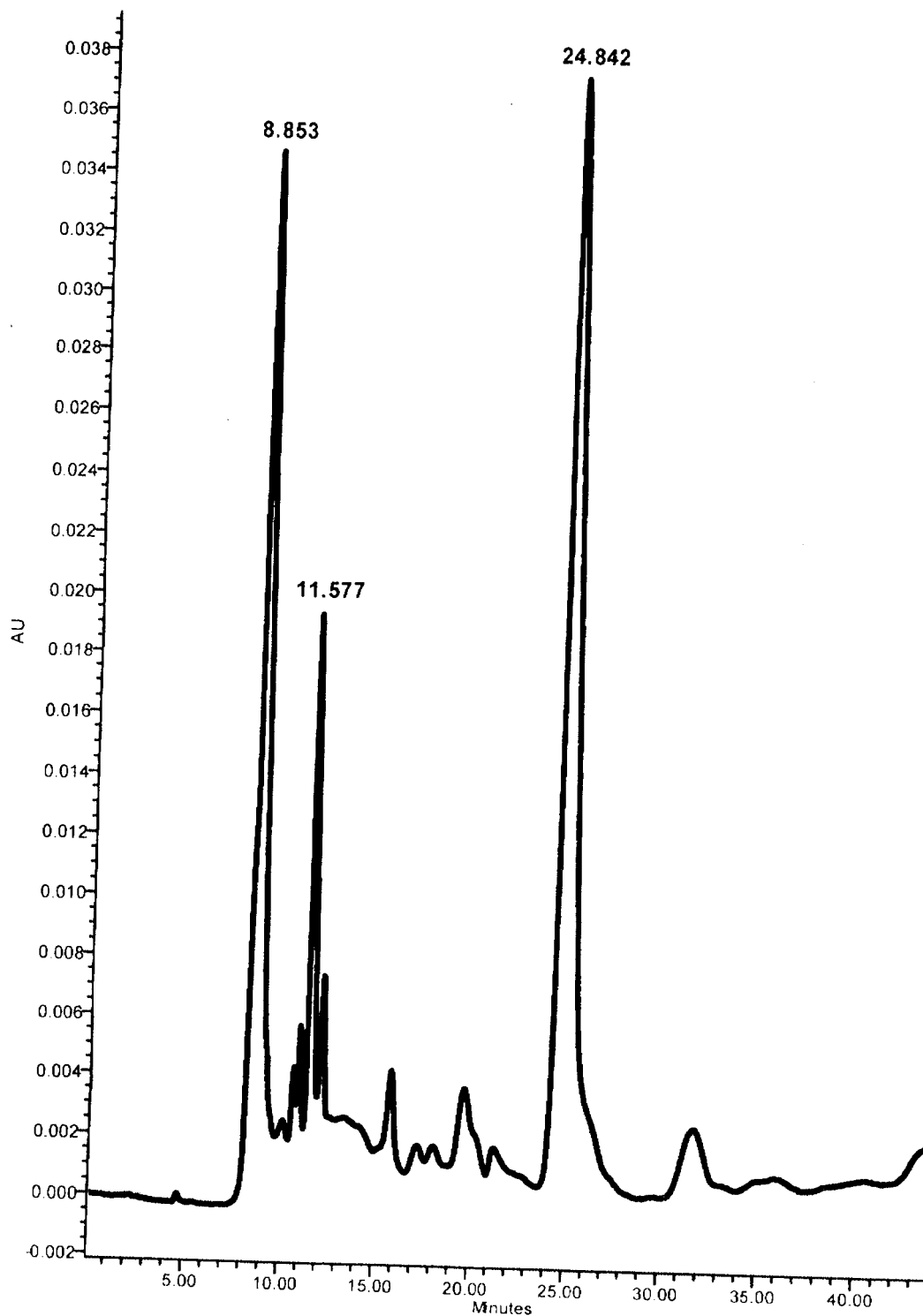


**Cromatograma 10.** Perfil cromatográfico de la fracción 2'. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, cloroformo-metanol (9:1); flujo, 8ml/min.

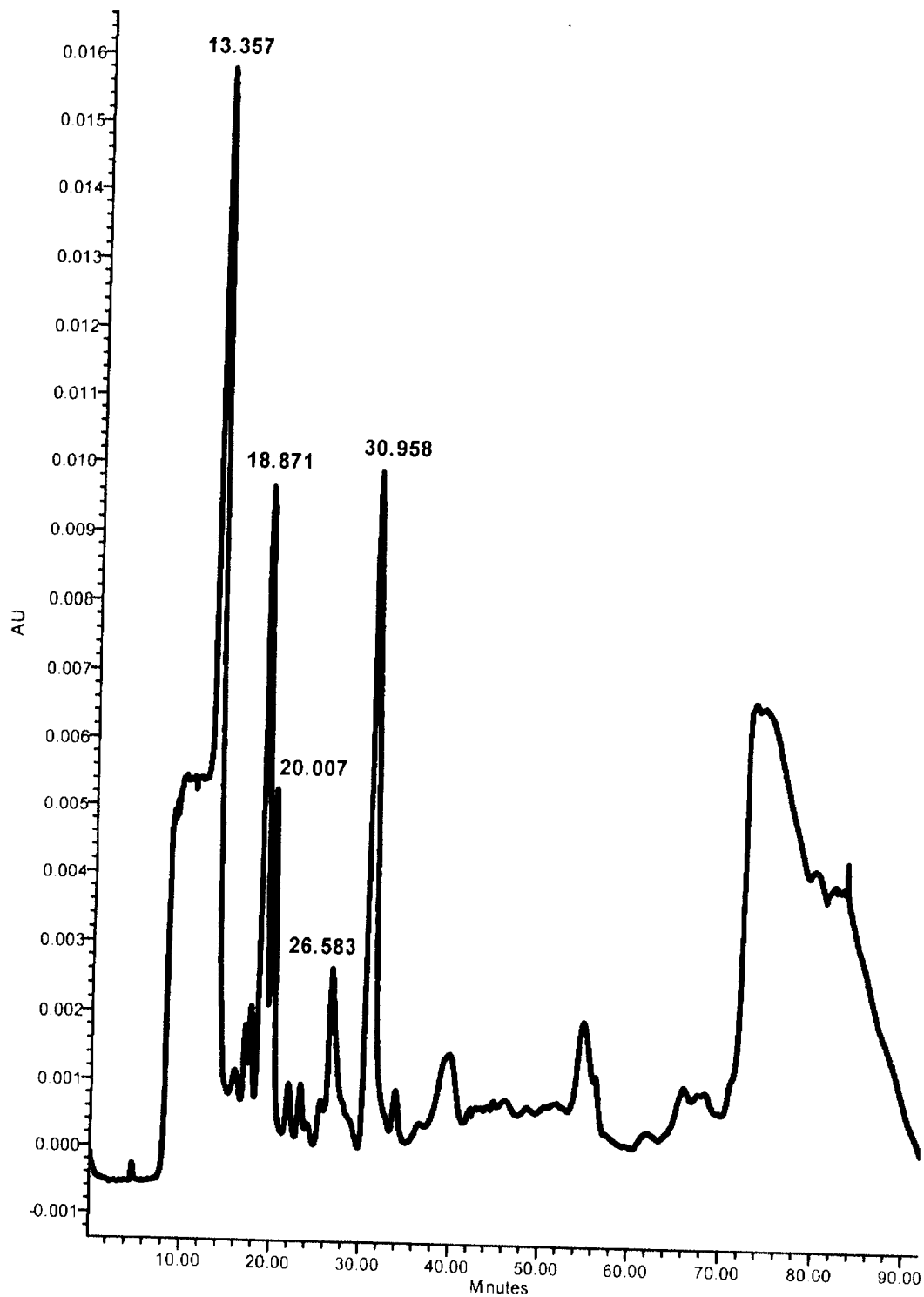




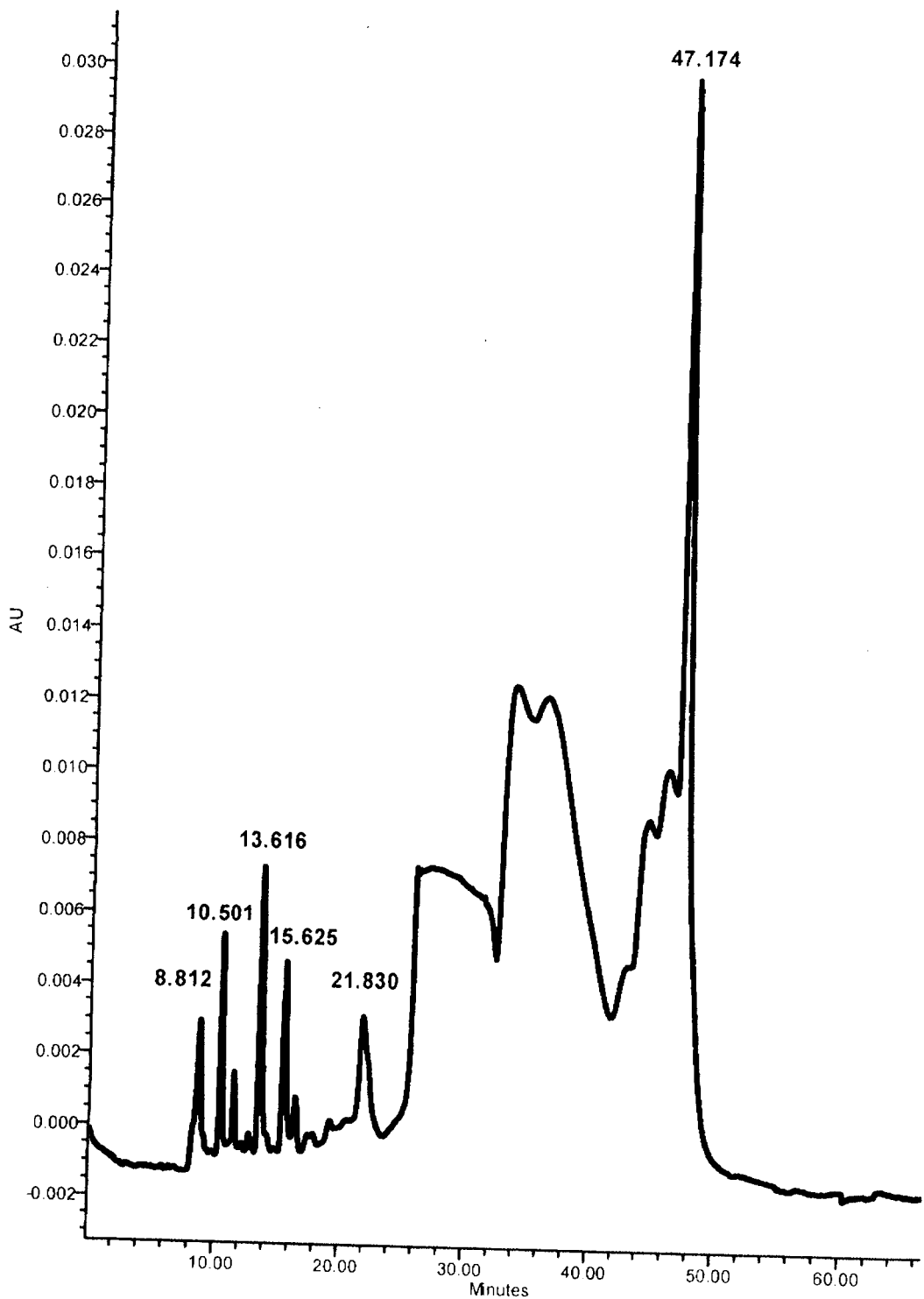
**Cromatograma 11.** Perfil cromatográfico de la fracción 6 en el día A. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, índice de refracción modelo 2410; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 8ml/min.



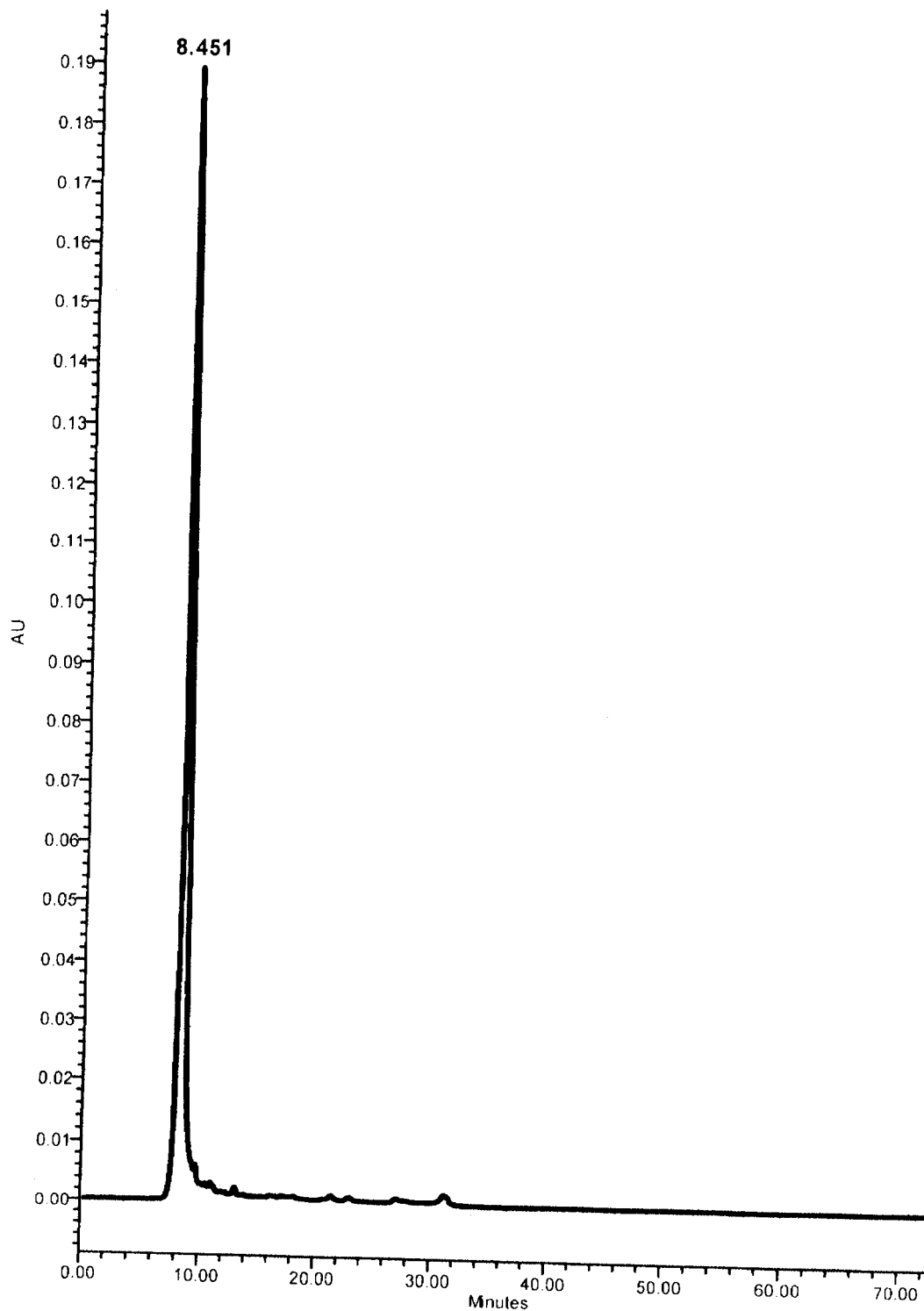
**Cromatograma 12.** Perfil cromatográfico de la fracción 6 en el día B. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 A 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 8ml/min.



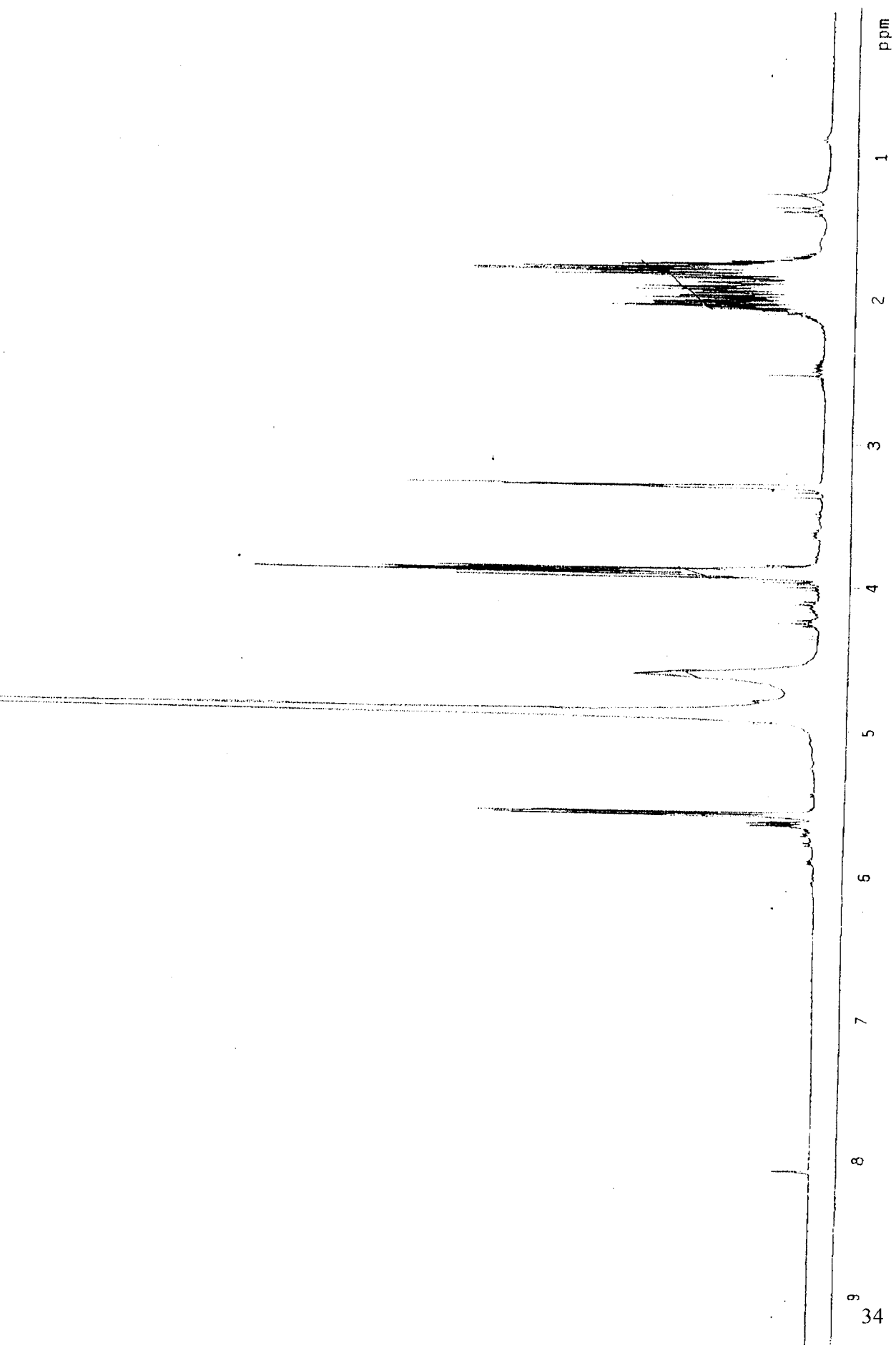
**Cromatograma 13.** Perfil cromatográfico de la fracción 6 en el día C. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 8ml/min.



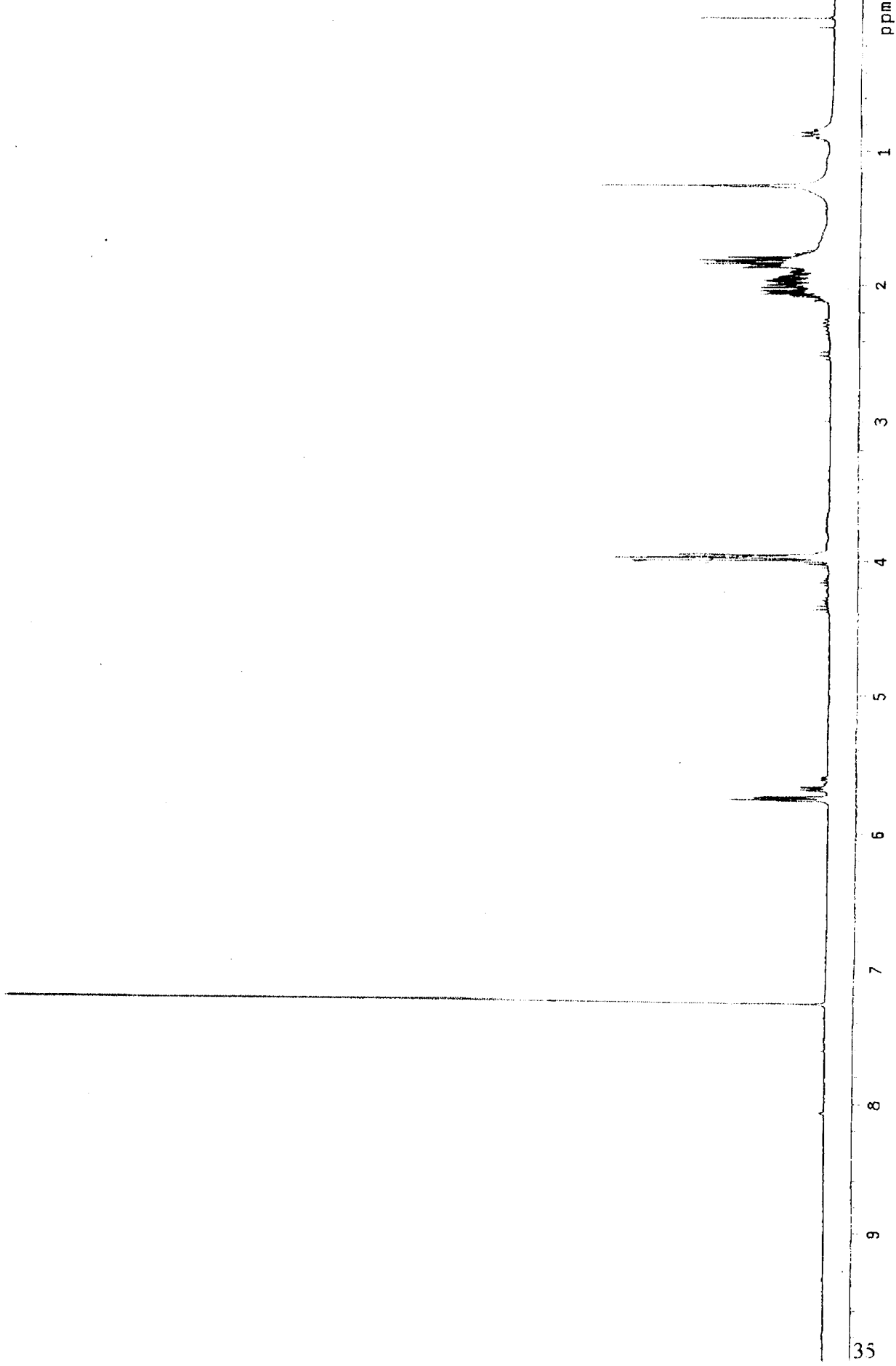
**Cromatograma 14.** Perfil cromatográfico de la fracción 6 en el día D. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 8ml/min.



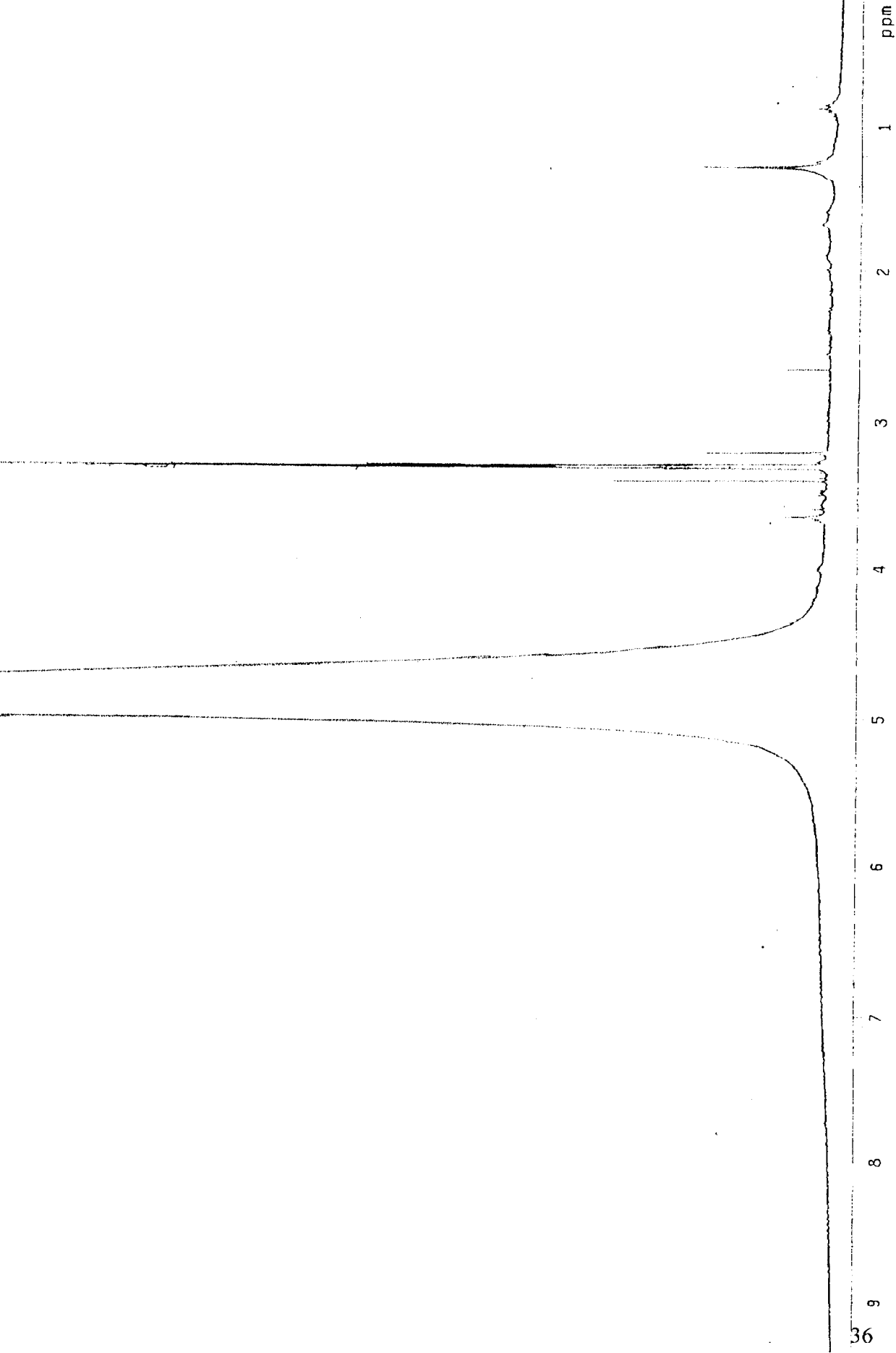
**Cromatograma 15.** Perfil cromatográfico de la fracción 7. Condiciones de análisis: Equipo, Waters; Detector, UV/VIS modelo 486; columna de sílica gel ( $\mu$ Porasil 125 Å 10  $\mu$ m, 19 X 300 mm); fase móvil, diclorometano; flujo, 8ml/min.



Espectro 1. RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de la fracción 3'.



Espectro 2. RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  de la fracción 2'.



Espectro 3. RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  de la fracción 7.



## VI. DISCUSIÓN

El proceso de maceración y partición de la muestra de coral normal de *M. complanata* generó tres extractos: el clorofórmico, el de acetato de etilo y el metanólico. Después de analizar los extractos mediante una cromatografía en capa fina se observó que los extractos clorofórmico y metanólico presentaban un perfil químico. Considerando entonces el comportamiento cromatográfico así como la cantidad del extracto se decidió llevar a cabo una serie de estudios cromatográficos en HPLC utilizando el extracto metanólico.

Antes de poder analizar la muestra mediante la técnica de HPLC, fue necesario hacer un fraccionamiento preliminar del extracto metanólico, con el objeto de resumir el contenido químico de las fracciones a separar por HPLC.

La cromatografía en columna del extracto metanólico de *M. complanata* permitió la obtención de 12 fracciones. El análisis por cromatografía en capa delgada permitió concluir que de todas las fracciones, la fracción VIII presentaba al menos un compuesto mayoritario y su perfil químico no parecía muy complicado. Esta fracción posteriormente fue sometida a un análisis cromatográfico por HPLC.

Se decidió comenzar el análisis en HPLC con una columna de gel de sílice debido a que la fracción VIII era de mediana polaridad y en caso de utilizar una columna de fase inversa (C18), se corría el riesgo de que toda la muestra fuera arrastrada al mismo tiempo por el eluyente.

La fracción VIII obtenida de la columna cromatográfica fue sometida a un proceso de separación en HPLC mediante una columna analítica y preparativa. Se obtuvieron ocho fracciones (Cromatograma 2), de las cuales se analizaron las fracciones 6, 7 y 8.

Los cromatogramas de la fracción 6 fueron inyectados diferente día cada uno y no presentaron reproducibilidad bajo ninguna condición experimental, lo que indicaba una posible descomposición de la muestra aparentemente debida a que la muestra se mantuvo a temperatura ambiente y no estaba protegida de la luz.

De la fracción 7 se aislaron 11.74 mg de muestra. Aunque el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 3) muestra señales poco resueltas, se puede apreciar la presencia de compuestos mayoritarios y minoritarios. De manera adicional la región correspondiente a  $\delta = 1.6 - 2.2$  ppm señala la presencia de metilos de diferente naturaleza, lo que demuestra que la muestra de la fracción 7 corresponde a una mezcla de compuestos. Desafortunadamente la muestra era insuficiente para seguirla purificando mediante HPLC.

Las fracciones 2' y 3' fueron aisladas de la fracción 8 (Cromatograma 4), y se obtuvieron 15 y 56 mg respectivamente. La sobreposición de señales en los espectros de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 1 y 2), no permitió la determinación de una estructura química para ninguna de las muestras. El comportamiento de los metilos sugiere la presencia de varios compuestos, lo que indica continuar la purificación. Como en el caso anterior, la cantidad de muestra limita el seguimiento del proceso de purificación.

## VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas del trabajo experimental son las siguientes:

1. El extracto metanólico de *M. complanata* presenta un perfil metabólico complejo y al mismo tiempo pobre en rendimiento.
2. El fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico de *M. complanata* mediante las técnicas de cromatografía en columna, placa fina y HPLC permitió determinar varias condiciones experimentales para la obtención de fracciones poco complejas.
3. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las muestras resultantes de la separación por HPLC indicaron que las muestras no correspondían a compuestos puros o a un compuesto mayoritario sino más bien era una mezcla de compuestos.
4. Sin duda alguna, estos resultados experimentales permitirán purificaciones futuras con el objeto de conocer la naturaleza de los compuestos y realizar ensayos farmacológicos para determinar una probable actividad. Resultaría interesante estudiar muestras de coral blanqueado para comparar los resultados con este estudio.
5. En base a los resultados obtenidos se pueden hacer las siguientes sugerencias: a) iniciar el estudio fitoquímico con una mayor cantidad de material, b) aislar por HPLC los componentes bajo las condiciones ya establecidas y dar un seguimiento a la muestra para verificar una posible descomposición. Es decir, se puede seguir el proceso de separación por HPLC con cromatografía en capa fina comparando con la muestra antes de la inyección o se podría obtener los espectros de RMN  $^1\text{H}$  antes y después del proceso de separación por HPLC. Se podría además seguir el comportamiento cromatográfico de una muestra al paso del tiempo y modificando variables como la luz.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Bayer, M., Boschman H., Harrington, H., Hill, D. y col. 1956. Treatise on invertebrate paleontology. University of Kansas Press, Kansas: Part F: F110-f15, F90-F93

Bianchini, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., Panconesi, E. 1988. Coral ulcer as a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27: 506-507.

Jessop, N. 1991. *Zoología.. Interamericana McGraw-Hill, Madrid: 113-119*

Johnson, E., Stevenson, R. 1978. Basic liquid chromatography. Varian associates, Inc., Palo Alto, California: 6-13

Middlebrook, R., Wittle, L., Scura, E., Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora dichotoma*. *Toxicon.* 9: 333-336.

Mohrig, J., Neckers, D. 1979. Laboratory experiments in organic chemistry. 3<sup>a</sup>. Ed. D. Van Nostrand Company, New York: 55-65

Pavia, L. D., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Egel, R. G. 1990. Organic laboratory techniques a micro-scale approach. Saunders golden sunburst series, Orlando FL.: 580-625.

Rojas, A., Torres, M., Rojas, 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., Rosenberg, L., Ben-Meir, P., Hauben, D.J. 1987. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns.* 13: 325-326.

Wittle, L., Middlebrook, R., Lane, C. 1971. Isolation and partial purification of a toxin from *Millepora alcicomis*. *Toxicon*. 9: 327-331.

Wittle, L., Scura, E., Middlebrook, R. 1974. Stinging coral (*Millepora Tenera*) Toxin: a comparison of crude extracts with isolated nematocist extracts. *Toxicon*. 12: 481-485.

<http://omega.ilce.edu.mx:300> Cifuentes, J. L., Frías, M. 1995. *Biblioteca digital*