

Tesis de Posgrado

Estudio químico de tres especies de algas rojas de la familia de las corallináceas

Palermo, Jorge Alejandro

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Palermo, Jorge Alejandro. (1989). Estudio químico de tres especies de algas rojas de la familia de las corallináceas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2218_Palermo.pdf

Cita tipo Chicago:

Palermo, Jorge Alejandro. "Estudio químico de tres especies de algas rojas de la familia de las corallináceas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2218_Palermo.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"ESTUDIO QUIMICO DE TRES ESPECIES
DE ALGAS ROJAS DE LA FAMILIA DE
LAS CORALLINACEAS"

Autor

Jorge Alejandro Palermo

Directora de Tesis

Dra. Alicia M. Seldes

Lugar de trabajo

Departamento de Química Orgánica

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas**

- 2218 -
g.2

-1989-

A la memoria de mi padre.

A mi madre.

A Gaby, mi esposa.

**Agradezco al Dr. Eduardo G. Gros,
mi Director de Becas de Iniciación,
Perfeccionamiento y Formación Superior,
por haber sido un ejemplo permanente de
dedicación, entusiasmo, sabiduría y
constancia, y por las enseñanzas y el
apoyo de él recibidos.**

**Mi mas sincero agradecimiento a la
Dra. Alicia M. Seldes, Directora de
este Trabajo de Tesis por haberme guiado,
por su compañerismo constante, por el
apoyo y la confianza absolutas, y sobre
todo por su excepcional entereza.**

Agradezco además:

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por la realización de determinaciones instrumentales:

Dr. Gerardo Burton, Sr. Carlos G. Arabehey y Dr. Darío Doller por los espectros RMN-¹H y RMN-¹³C.

Sr. Jorge A. Aznárez por los espectros de masa y CGL-EM.

Lic. María M. Rivero y Lic. María M. de Moglia por las cromatografías gas-líquido.

Lic. Juan B. Rodríguez por las cromatografías líquidas de alta resolución.

Al CONICET, por las Becas de Iniciación, Perfeccionamiento y Formación Superior otorgadas.

Al Dr. Stefan Krolík, de VG Analytical Limited (Manchester, Inglaterra) por los espectros EM/FAB⁺ y EM/EM realizados.

A la Dra. Elsa Lacoste de Díaz (Depto. de Biología, FCEN-UBA) por la identificación de las especies estudiadas, y sus criteriosas sugerencias.

A la Dra. Nora I. Mайдana, Dra. María S. Vigna y Lic. Sonia Mc Carthy (Depto. de Biología, FCEN-UBA) por su valioso asesoramiento y la bibliografía facilitada.

A la Dra. Alicia Borasso (Centro Nacional Patagónico-Pto. Madryn) por el envío de material vegetal.

A la Dra. María L. Mendoza (CADIC-Ushuahia) por su asesoramiento y clasificación de material vegetal.

Al Dr. A. Fenucci y a la Dra. Ana M. Petriella (INIDEP-Mar del Plata) por su colaboración en los trabajos realizados en Mar del Plata.

Al Dr. Pedro Cattáneo por la bibliografía facilitada.

Al Dr. Gerardo Burton por su ayuda y sus valiosos consejos.

Al Lic. Marcelo Cases y al Sr. Fernando Soriano por su entusiasmo y desinteresada colaboración.

Al Dr. Mario Silva O. (Universidad de Concepción - Chile) por el otorgamiento de una Beca para asistir al curso "Química y Ecología de las Algas Marinas Bentónicas".

Al Dr. William Fenical (Scripps Institution of Oceanography, University of California - San Diego) por sus enriquecedores consejos.

Al Dr. Aurelio San Martín (Universidad de Chile) por su amistad, colaboración e intercambio de información.

A la Lic. Fidelina (Fide) González M. (Universidad de Concepción-Chile) por su cariño y valiosísima ayuda.

A mi esposa, la Lic. Gabriela (Gaby) Cabrera, por todo el amor y la infinita paciencia con que realizó las ilustraciones de este Trabajo de Tesis, y la felicidad de compartir mi vida con ella.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Mónica Deluca, Dra. Marta Maier, Dra. Marta Romero, Lic. Patricia Eisenberg, Lic. Henry Hughes, Lic. Laura Schor, Lic. Gabriela Cabrera, Lic. Sergio Giacobello, Sr. Marcos Spallone y Srta. Alicia Arenaza, por su paciencia y afecto con que compartimos buenos y malos momentos.

A Moni Deluca, Henry Hughes, Laura Schor, Sergio Giacobello, Marcos Spallone, Miriana Biondic, Alejandra Ponce, Gustavo Revelli, Walter Samaniego, Eli Lewkowicz y Guillermo Amorín, por disfrutar de su amistad, y la alegría de compartir el trabajo con ellos (y por haberme aguantado).

A todo el personal del Departamento de Química Orgánica por su colaboración y cordialidad.

INDICE

pág.

Introducción.....	1
Carotenoides.....	24
Galactosildiglicéridos.....	49
Descripción de la labor realizada.....	65
Discusión de los resultados obtenidos.....	147
Parte experimental.....	180
Resumen.....	218
Bibliografía.....	221

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ac	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
c.c.d.	cromatografía en capa delgada
CGL	cromatografía gas-líquido
CGL-EM	cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masa
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución
cm	centímetro
EM	espectrometría de masa, con ionización por impacto electrónico
EM/FAB ⁺	espectrometría de masa con ionización por bombardeo con átomos rápidos, operando en modo de iones positivos
Et	etilo
EtOH	etanol
g	gramo
Hz	hertz
IR	infrarojo
kg	kilogramo
l	litro
Me	metilo
MeOH	metanol
mg	miligramo
MHz	megahertz
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro

m/z	relación masa/carga
nm	nanometro
pág	página
pf	punto de fusión
ppm	partes por millón
rf	relación frontal
RMN- ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear de protón.
s	segundo
UV/Vis	ultravioleta/visible

Aclaración: Al no existir aún una abreviatura en castellano para el bombardeo con átomos rápidos, se optó por la terminología inglesa (FAB: "fast atom bombardment").

INTRODUCCION

El estudio de los metabolitos secundarios provenientes de algas marinas, contrariamente a lo sucedido con los de plantas terrestres, cobró gran impulso recién a partir de la década pasada. Esto se debe fundamentalmente a que las algas marinas, por su habitat característico, se encuentran menos accesibles para su recolección que las plantas superiores. Este impedimento recién fue superado con el desarrollo de medios de acceso al mar, y en especial la posibilidad de equipos de inmersión autónoma.

Aún así, la cantidad de material vegetal disponible es, en muchos casos, menor a la necesaria para llevar a cabo un estudio de productos naturales, sobre todo de aquellos compuestos presentes a nivel de trazas.

En particular, el desarrollo de técnicas analíticas y separativas, tales como la cromatografía líquida de alta resolución, y espectroscópicas como RMN-FT y CGL-EM, posibilitaron el estudio de productos presentes a nivel de trazas.

Los avances logrados permitieron un explosivo desarrollo del estudio de metabolitos secundarios de origen marino a partir de la década de 1970, lo cual se vio reflejado en numerosas publicaciones y trabajos de recopilación sobre el tema [1-11].

La importancia de este tipo de estudio puede ser considerada desde distintos puntos de vista:

- a) la elucidación estructural de compuestos de estructura química novedosa, sin precedentes en los aislados de fuentes terrestres, constituyen un aporte a la química de productos naturales.
- b) un gran número de estos compuestos poseen acción farmacológica muy potente, con actividades desconocidas hasta el momento [12-14].
- c) el interés quimiotaxonómico debido al uso de estos metabolitos secundarios como trazadores para la diferenciación de especies morfológicamente idénticas.
- d) las algas, productoras primarias en su medio, son la base de la cadena alimentaria en el ambiente marino. El conocimiento de algunos de estos metabolitos permite elucidar la secuencia trófica en dicho ambiente.
- e) se identificaron numerosos compuestos que actúan como mecanismos de defensa, feromonas de reproducción [15], mensajeros químicos [16,17], o inhibidores de predación. El conocimiento de estas interacciones químicas entre distintos organismos constituye el campo de acción de la ecología química marina.

Un ejemplo de esta interacción es el caso de los moluscos opistobranquios *Aplysia californica* y *Stylocheilus longicauda*. Estos moluscos evolucionaron de tal forma que no sólo toleran algas tóxicas en su dieta, sino que las necesitan para su supervivencia.

En efecto, *Aplysia californica* se alimenta de algas rojas de los géneros *Laurencia* y *Plocamium*, y *S. longicauda* lo hace de cianófitas del género *Lyngbya*. El estudio de los metabolitos secundarios presentes en estos moluscos, permitió hallar varios compuestos tóxicos para los peces, que eran biosintetizados por las algas mencionadas [18-28]. Los moluscos incorporan estos compuestos en la dieta, y luego los concentran en distintos órganos, lo cual los vuelve tóxicos para los peces.

En otros casos, se ha comprobado que el molusco transforma químicamente para su provecho algunos de los metabolitos de algas ingeridos con la dieta [29].

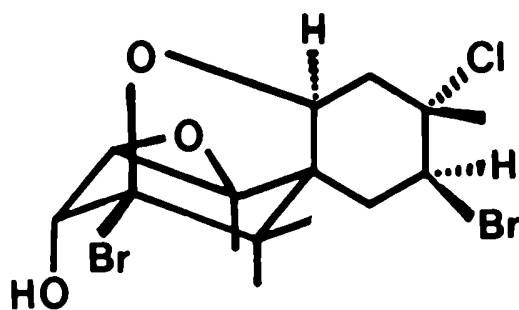


Fig. 1: Johnstonol [29], metabolito hallado en el alga roja *Laurencia johnstonii* y en el molusco *Aplysia californica*

CLASIFICACION DE LAS ALGAS

Según la clasificación de Silva [30] existen 17 clases de algas: Prochlorophyceae, Cyanophyceae (algas azul-verdosas), Rhodophyceae (algas rojas), Cryptophyceae, Prasinophyceae, Chlorophyceae (algas verdes), Charophyceae, Euglenophyceae, Chrysophyceae (algas doradas), Dictyochophyceae, Bacillariophyceae (diatomeas), Phaeophyceae (algas pardas), Xantophyceae (algas amarillas), Raphidophyceae, Haptophyceae, Eustigmatophyceae y Dinophyceae (dinoflagelados).

En general, en el ámbito marino las algas macroscópicas (macrófitas) comprenden sólo cuatro clases: Rhodophyceae (rojas), Phaeophyceae (pardas), Chlorophyceae (verdes) y Cyanophyceae (azul-verdosas).

CLASE RHODOPHYCEAE

Esta clase incluye a las algas comunmente conocidas como rojas, aunque su coloración va del rojo al púrpura, incluyendo tonalidades parduzcas y oliváceas.

El grupo comprende alrededor de 500 géneros y cerca de 4000 especies, de las cuales solo unas 50 son de agua dulce. La gran mayoría son especies marinas, preferentemente de aguas templadas. Se encuentran por lo general en las zonas del meso- y el infralitoral, habiéndose encontrado incluso algunas especies a 400 m de profundidad.

En general son algas que presentan talo macroscópico y sésil, y se diferencian de las otras clases por los siguientes caracteres:

- no presentan estados flagelados.
- producen pigmentos fotosintéticos característicos, como por ejemplo las ficoeritrinas.
- las sustancias de reserva son principalmente, almidón de las florídeas y floridósido.
- entre los componentes de la pared celular, presentan polisacáridos sulfatados.
- la reproducción sexual, oogámica, es muy característica y especializada.

En general, las algas rojas se fijan a las rocas y otros sustratos inanimados, aunque también existen especies epífitas y parasitarias.

En varios géneros se produce la calcificación de las paredes celulares, siendo ésta la característica principal de las algas coralinas (familia Corallinaceae).

Otros géneros producen polisacáridos (carragenanos, agar), que forman hidrocoloides explotados industrialmente.

CLASIFICACION DE LAS RHODOPHYCEAE

Según Silva [30], la clase Rhodophyceae comprende dos subclases: Bangiophycidae y Florideophycidae. La subclase Bangiophycidae presenta cinco órdenes: Porphyridales, Goniotrichales, Bangiales, Compsopogonales, y Rhodochaetales.

A su vez, la subclase Florideophycidae comprende diez órdenes: Acrochaetales, Nemaliales, Chaetangiales, Gelidiales, Bonnemaissonales, Cryptonemiales, Gigartinales, Rhodymeniales, Palmariales y Ceramiales.

ORDEN CRYPTONEMIALES

Este orden puede dividirse en dos familias, según el grado de calcificación de la pared celular:

- a) paredes celulares calcificadas: familia Corallinaceae.
- b) paredes celulares poco calcificadas o sin calcificar.

FAMILIA CORALLINACEAE

Las algas de esta familia presentan paredes celulares regularmente calcificadas. El talo puede ser incrustante o articulado. Poseen internodos calcificados alternados con nodos sin calcificar.

Esta familia comprende los siguientes géneros: *Alatocladia*, *Amphiroa*, *Anthrocardia*, *Bosiella*, *Calliarthron*, *Chellosporum*, *Chiharaea*, *Clathromorphum*, *Corallina*, *Dermatholithon*, *Derthiophycus*, *Ezo*, *Fosliella*, *Goniolithon*, *Haliptylon*, *Hydrolithon*, *Jania*, *Litholeepis*, *Lithophyllum*, *Lithoporella*, *Lithothamnium*, *Lithothrix*, *Marginisporum*, *Mastophora*, *Melobesia*, *Mesophyllum*, *Metagoniolithon*, *Metamastophora*, *Neogoniolithon*, *Pachyartroa*, *Phymatolithon*, *Porolithon*, *Serraticardia*, *Tenarea*, *Yamadea*.

Como ya fue señalado, estos géneros pueden ser divididos en dos grandes grupos: incrustantes y articuladas. En el litoral marino argentino, la mayor parte de las especies existentes son del tipo incrustante. Estas algas forman una pátina coloreada sobre las rocas, mimetizándose en muchos casos con ellas, lo cual vuelve muy dificultosa su recolección en cantidad suficiente como para un estudio químico de productos naturales.

La familia de las Corallinaceas es una de las pocas familias de algas rojas que ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista de su sistemática, taxonomía y variaciones morfológicas.

Las Corallinaceas articuladas están representadas en el litoral marítimo argentino por solo tres géneros: *Corallina*, *Jania* y *Bosiella*. En total han sido informadas solo cuatro especies: *Corallina officinalis* (Linée), *Corallina elongata* (Areschoug), *Bosiella orbignana* (Silva) y *Jania sp.*

En los trabajos publicados por Mendoza [54,55], solo aparecen citadas las tres primeras especies. Sin embargo, *Jania sp.* fue posteriormente clasificada por la misma autora, no habiéndose determinado hasta el momento la especie en particular. Actualmente, la Dra. M. L. Mendoza (CADIC-Ushuaia), está completando la clasificación del alga *Jania sp.* estudiada en el presente trabajo.

Todas estas algas son de pequeño tamaño (3-10 cm), y tienen forma de pequeño cepillo o plumero (ambas *Corallinas* y *Jania sp*) o de collar de cuentas (*B. orbignana*), que se forman a partir de un disco calcáreo fijado sobre sustratos rocosos, la caparazón de moluscos o sobre otras algas. El color es rojizo en el caso de las *Corallinas* y *Jania sp.*, y rosado en el de *B. orbignana*.

Las especies mencionadas pueden ser ubicadas a lo largo de todo nuestro litoral marítimo, desde la provincia de Buenos Aires hasta Tierra del Fuego.

En particular, salvo *B. orbignana*, las tres restantes son particularmente abundantes en el litoral marítimo bonaerense, donde forman un "cojín" rojizo sobre las rocas que se encuentran en la línea de marea.

En el caso de *Bosiella orbignana*, si bien se la ha detectado en numerosas oportunidades, se trata siempre de ejemplares aislados, o arrastrados por la resaca. Evidentemente este alga tiene su hábitat en la región del infralitoral, y por lo tanto no es recolectable a mano durante los períodos de baja marea.

Corallina officinalis es la más fácilmente recolectable, encontrándose en el horizonte superior del mesolitoral.

Corallina elongata y *Jania sp.* se encuentran preferentemente en la zona del horizonte medio e inferior del mesolitoral, por lo tanto son recolectables a mano solo durante bajantes importantes.

METABOLITOS SECUNDARIOS DE ALGAS ROJAS

La mayor cantidad de metabolitos secundarios de algas rojas se encuentra en ciertos órdenes y familias, extremadamente ricas en este tipo de compuestos, la mayor parte de los cuales presentan estructuras químicas novedosas.

Sin embargo, existen casos, como la familia de las Corallinaceas, en el cual los datos informados son dudosos o incompletos. Mas aún, otro factor que complica las generalizaciones quimiotaxonómicas es el hecho de que la clasificación de las distintas especies de algas es muy compleja a nivel de géneros y especies. Muchas especies son indistinguibles en base a su morfología, debiéndose entonces apelar a las características de sus órganos reproductores para diferenciarlas. Aún así, la clasificación de muchas especies es dudosa, lo cual hace necesario la continuación de estudios sistemáticos para lograr un completo panorama quimiotaxonómico.

Entre las familias de algas rojas que han probado ser mas ricas en metabolitos secundarios, se encuentran:

Orden Bonnemaisoniales: familia Bonnemaisoniaceae.

Orden Ceramiales: familia Rhodomelaceae.

Orden Gigartinales: familias Plocamiaceae y Rhodophyllidaceae.

Orden Cryptonemiales: familia Rhizophyllidaceae.

FAMILIA BONNEMAISONACEAE:

En general, las algas de esta familia se caracterizan por la presencia de acetogeninas halogenadas, principalmente de C-1, C-3, C-7, y C-9. Estos compuestos, en su mayoría volátiles, se encuentran en compartimientos celulares donde no son afectados por el metabolismo primario y son excretados por el alga como sustancias de defensa.

En particular los géneros *Asparagopsis* (Fig. 2), *Bonnemaisonia* (Fig. 3), *Ptilonia* y *Delisia* son muy ricos en esta clase de compuestos.

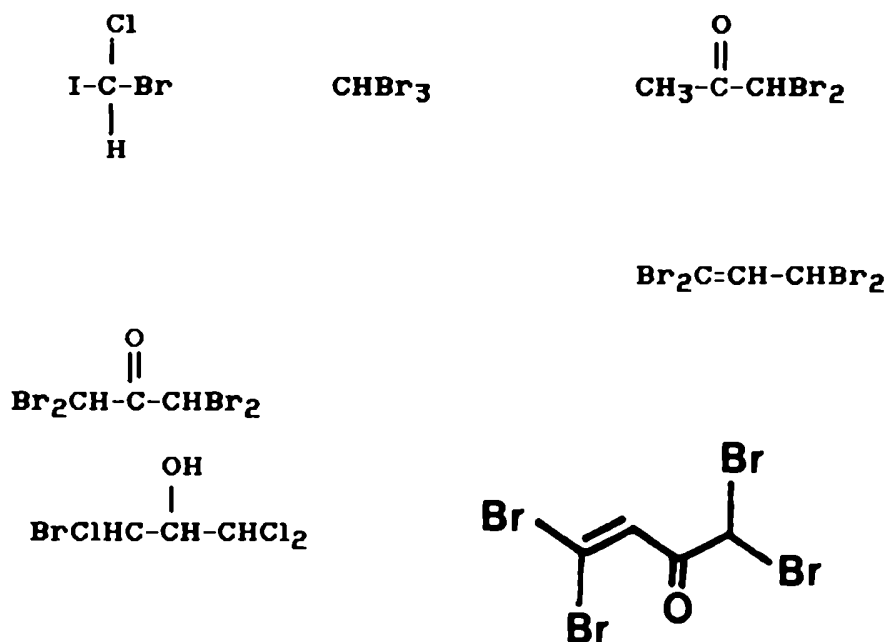


Fig. 2: Algunos compuestos volátiles de *Asparagopsis taxiformis* y *Asparagopsis armata* [31,32]

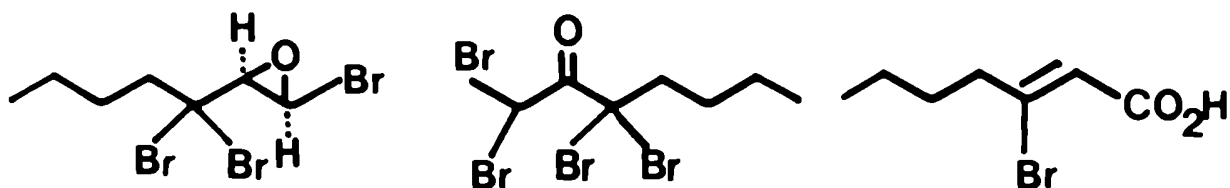


Fig. 3: Algunos compuestos aislados de *Bonnemaisonia hamifera*, *Bonnemaisonia nootkiana* y *Bonnemaisonia asparagoides* [33].

FAMILIA PLOCAMIACEAE:

Estas algas son en general muy ricas en monoterpenos halogenados, en su mayor parte, lineales. De unas quince especies estudiadas del género *Plocamium* se han aislado alrededor de cien compuestos nuevos de este tipo [36-39].

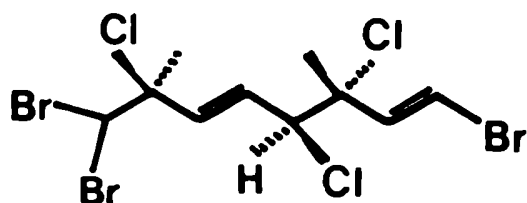


Fig. 4: Ejemplo de monoterpeneo halogenado aislado de algas rojas del género *Plocamium*.

En este género en particular, existen grandes controversias en cuanto a la clasificación taxonómica y a los metabolitos producidos por las distintas especies.

Por ejemplo, se ha observado que ejemplares supuestamente de la misma especie y recolectados en distintas localidades, producen distintos monoterpenos halogenados [40].

La dificultad en la elucidación estructural de estos monoterpenos, radica fundamentalmente en la ubicación de los halógenos. Esto ha dado origen a numerosas publicaciones y correcciones de estructuras ya asignadas.

FAMILIA RHODOPHYLLIDACEAE:

La característica que poseen algunas especies de esta familia es la de producir compuestos indólicos halogenados.

Por ejemplo, de *Rhodophyllis membranacea* se han aislado más de diez compuestos representativos de este tipo de estructura [41].

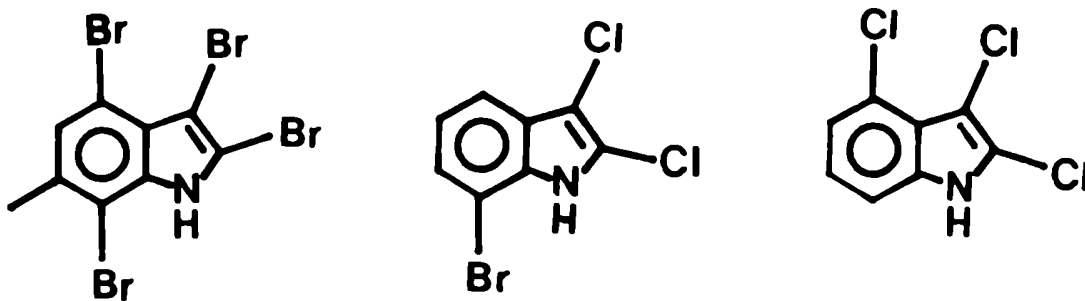


Fig. 5: Algunos compuestos aislados de *Rhodophyllis membranacea*

Estos compuestos presentan propiedades antibióticas y citotóxicas.

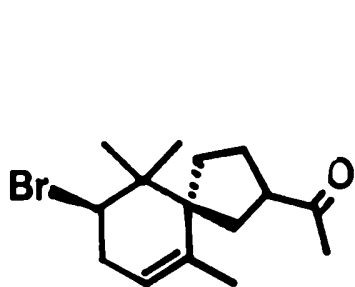
FAMILIA RHODOMELACEAE:

Es la familia de algas rojas que presenta la mayor variedad en cuanto al tipo de metabolitos que produce. En general, estos productos podemos clasificarlos dentro de cuatro tipos:

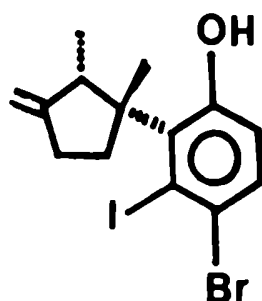
- a) sesquiterpenos halogenados.
- b) diterpenos halogenados.
- c) compuestos fenólicos halogenados (bromados).
- d) acetogeninas halogenadas.

Se destaca claramente el género *Laurencia*, el cual es probablemente el género más rico (en cuanto a variedad de estructuras que produce) de todo el reino vegetal. Hasta la fecha se han informado más de 400 nuevos metabolitos secundarios producidos por algas de este género [42]. En particular:

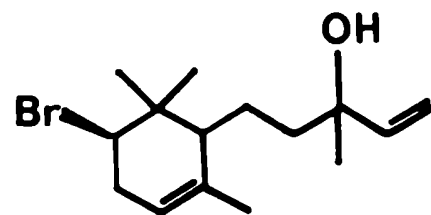
- 26 esqueletos carbonados novedosos de sesquiterpenos.
- 10 esqueletos carbonados novedosos de diterpenos.
- más de 50 estructuras novedosas de acetogeninas.



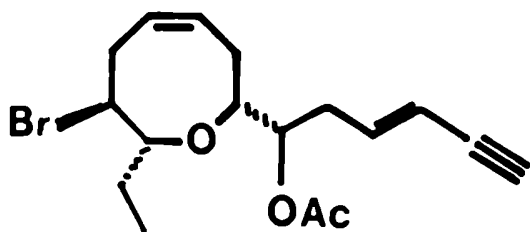
spiro-laurenona



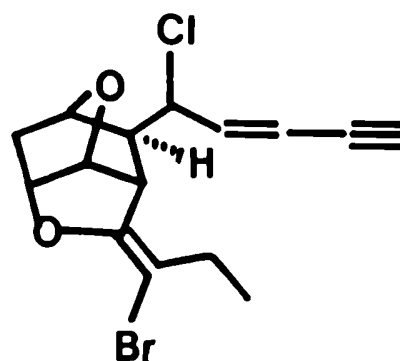
iodolaurinterol



snyderol



laurencina

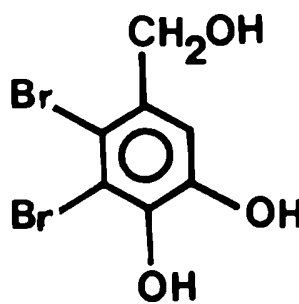
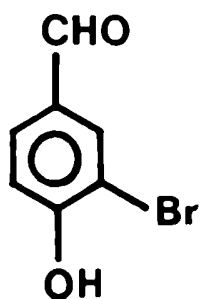


cis-maneoneno-B

Fig. 6: Algunos compuestos aislados de algas del género *Laurencia*.

En cuanto a los bromofenoles, estos compuestos son generalmente producidos por algas de los géneros *Polysiphonia*, *Rhodomela*, *Vidalia* y *Odonthalia*, en las cuales llegan a representar un 5 % en peso (base seca) [43-47].

En general se trata de C-7 fenoles, derivados de la tirosina.



lanosol

Fig. 7: Algunos C-7 fenoles aislados de Rhodomelaceae.

FAMILIA RHIZOPHYLLIDACEAE:

Es la familia químicamente mas rica en el orden de las Cryptonemiales. Sólo dos géneros han sido extensamente estudiados: *Chondrococcus* y *Ochtodes*.

En general estas algas son productoras de monoterpenos halogenados, la mayor parte de ellos monocíclicos, aunque en el caso del género *Chondrococcus* se han informado monoterpenos acíclicos.

Moore y colaboradores (Hawaii) [48-51], aislaron de *Chondrococcus hornemanii* una serie de monoterpenos halogenados, tanto cíclicos como acíclicos.

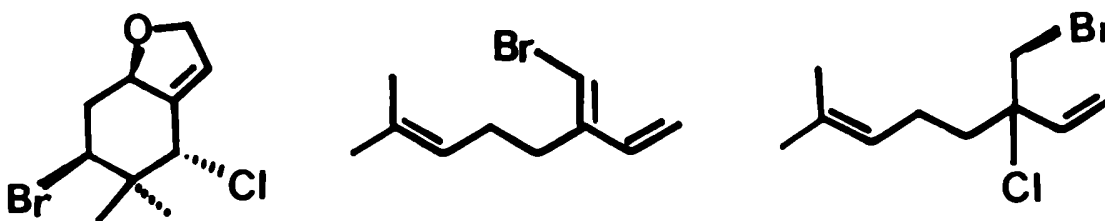


Fig. 8: Algunos monoterpenos aislados de *C. hornemanii*.

Fenical y colaboradores (La Jolla) [52,53], aislaron de *Ochtodes secundiramea* y *Ochtodes crockeri* quince compuestos con un novedoso esqueleto monoterpénico, el cual fue denominado "octodeno".

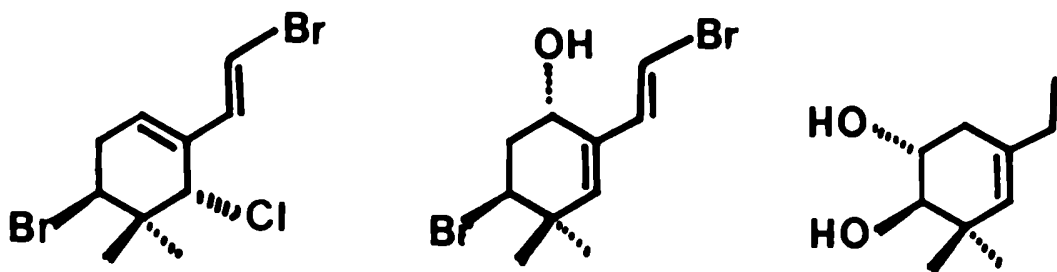


Fig. 9: Algunos compuestos aislados de *Ochtodes crockeri*.

RECOLECCION, TRATAMIENTO Y CONSERVACION DE ALGAS

Las algas en general se encuentran fijadas a las rocas del fondo marino, y como pueden ser de tamaños muy diversos, no es aconsejable el uso de rastras o redes de fondo para la recolección. Las dos formas que comunmente se usan para recolectar el material vegetal son: recolección a mano durante la marea baja o mediante buceo autónomo.

La región del litoral marítimo puede dividirse en cuatro zonas, de acuerdo al régimen de mareas:

- zona del supralitoral: normalmente no cubierta por las aguas, recibe las salpicaduras de las olas. Solamente es cubierta por el mar en el caso de crecientes excepcionales. En general solo crecen musgos y algunas algas verdes y azul-verdosas.
- zona del mesolitoral: tambien llamada zona intermareal ("intertidal"). Es la zona normalmente cubierta y descubierta por las aguas según el régimen de mareas. Se la puede dividir en tres "horizontes" (superior, medio e inferior),

relacionados con la altura de marea que los va dejando al descubierto. Es la zona normalmente más accesible para la recolección de algas a mano. En general se puede encontrar en esta zona algas rojas y verdes, y también una mayor variedad de fauna bentónica, principalmente crustáceos.

- zona del infralitoral: es la zona que normalmente queda cubierta por las aguas, aún en su punto de bajante máxima. Sólo se puede llegar a ella en el caso de bajantes excepcionales o mediante el muestreo en "pozos de marea". Lo más usual es efectuar el muestreo mediante buceo autónomo. Esta zona es la que presenta la mayor variedad tanto en flora como en fauna bentónica.
- zona del circalitoral: región cercana al talud continental. En general no se encuentra muy estudiada, debido a que las grandes profundidades (mayores de 30 m.) dificultan el buceo.

En el litoral marítimo bonaerense, el buceo está seriamente dificultado por la muy escasa visibilidad de las aguas (debido a la gran concentración de fitoplancton), por lo tanto es difícil el muestreo en la zona del infralitoral. Una ayuda suelen ser los "pozos de marea". Estos son excavaciones hechas por las aguas en las rocas del fondo o pequeñas lagunas rodeadas por rocas, que quedan expuestas por la marea baja. Estos pozos o lagunas conservan fauna y flora bentónica representativa de zonas más profundas, material que es fácilmente recolectable por acceso a las rocas que lo circundan durante la marea baja.

Para la recolección manual del material vegetal en la zona del mesolitoral hay ciertos factores que se deben tener presentes: el régimen de mareas (distinto en cada localidad), la altura de marea a partir de la cual se puede obtener un buen muestreo, la influencia de los vientos y temporales en la altura de marea y los horarios en que se produce la bajante.

Los factores expuestos reducen considerablemente el número de ocasiones anuales en que es posible efectuar un buen trabajo de recolección manual.

En particular, en las zonas en que se ha recolectado el material vegetal para este Trabajo de Tesis (Mar del Plata y Miramar) se toma como referencia el mareógrafo de Mar del Plata.

La altura normal de marea en esta localidad es de 0.90 m y las bajantes más convenientes para el muestreo son las que tienen una altura mínima de marea inferior a 0.40 m. Estas bajantes suelen ocurrir durante tres o cuatro días consecutivos, dos veces al mes, preferentemente desde setiembre hasta abril, que es la época del año en la que se observan las mayores amplitudes de marea.

Un aspecto esencial en el estudio de metabolitos secundarios de algas, es el referido a las condiciones de extracción del material vegetal.

En general, se ha observado que en muchos casos, los metabolitos secundarios no soportan el secado del material vegetal. Por lo tanto, es conveniente trabajar con el material fresco, y efectuar las extracciones en frío, preferiblemente el mismo día de la recolección o al poco tiempo de recolectado.

Un caso en el que se comprobaron las ventajas de esta metodología de trabajo fue el del alga verde *Caulerpa prolifera* [56]. En los primeros estudios realizados con este alga en los cuales se trabajó con material seco, sólo se había conseguido aislar caulerpina como único metabolito secundario.

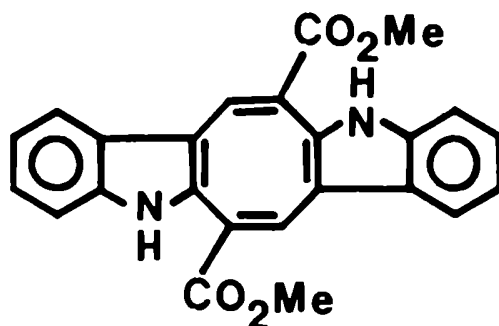


Fig. 10: caulerpina

Se comprobó luego que esta sustancia no era la responsable de la ictiotoxicidad exhibida por el alga. El trabajo con material fresco, permitió aislar diez sesquiterpenos, entre ellos la caulerpenina, que eran responsables de la actividad biológica del extracto [57].

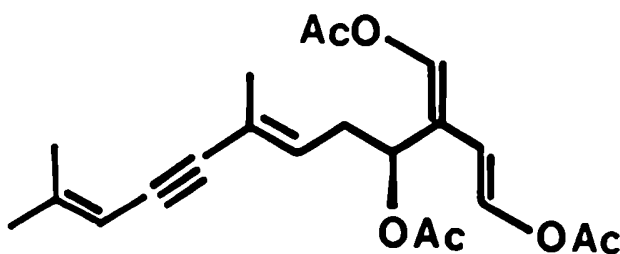


Fig. 11: caulerpenina

La extracción de material vegetal fresco y con una gran cantidad de agua en los tejidos, obliga a utilizar solventes miscibles con agua. En general se utilizan metanol, etanol, isopropanol, o mezclas cloroformo/metanol (3:1) o (2:1).

Dada la labilidad de muchos metabolitos aislados de organismos marinos es conveniente conservar a bajas temperaturas tanto el extracto como las fracciones y productos aislados.

ESTUDIOS QUIMICOS EN ALGAS DE LA FAMILIA CORALLINACEAE

La mayor parte de los estudios anteriores realizados en algas de esta familia incluyen el análisis de aminoácidos [58-61], ácidos grasos [62-64] y esteroides [65-67].

Bogger y Johansen [68] identificaron las plastoquinonas A,B y C en *Corallina officinalis* y otras algas de la familia Corallinaceae, por cromatografía en capa delgada y comparación con testigos, aunque no intentan el aislamiento o la cuantificación de los compuestos.

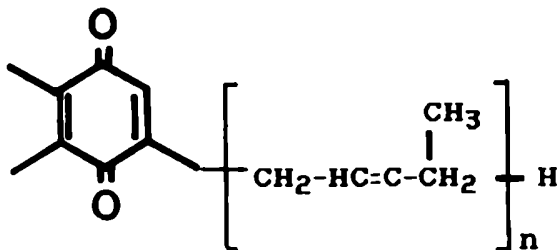
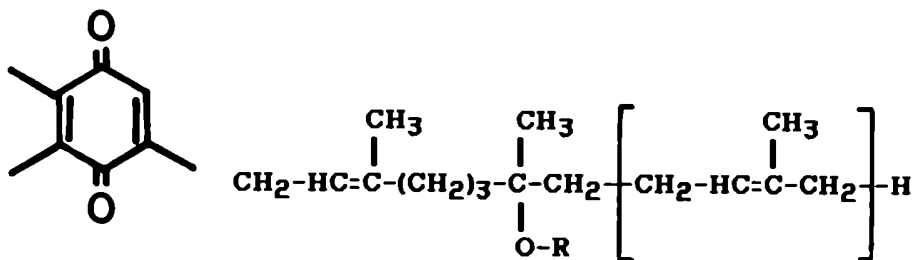


Fig. 12: plastoquinona-A



plastoquinona-B= R: acilo

plastoquinona-C= R: H

Fig. 13: Plastoquinonas B y C

Pedersén [45] en un estudio sobre compuestos fenólicos de algas rojas, identifica lanosol como único compuesto fenólico de *Corallina officinalis*. Esta identificación fue realizada por CGL-EM, partiendo de una muy pequeña cantidad (4 g) de material vegetal.

En un estudio sobre los productos naturales del alga roja *Marginisporum aberrans* (Corallinaceae), Ohta y Takagi [69], identifican p-hidroxibenzaldehído, dicloroacetamida, y 3,5-dinitroguayacol como responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos del alga.

Además de estos compuestos, los mismos autores [70] identifican cinco sesquiterpenos fenólicos halogenados: laurinterol, isolaurinterol, aplysina, aplysinol y aplysinal.

Estos cinco compuestos sólo habían sido obtenidos previamente de algas del género *Laurencia*.

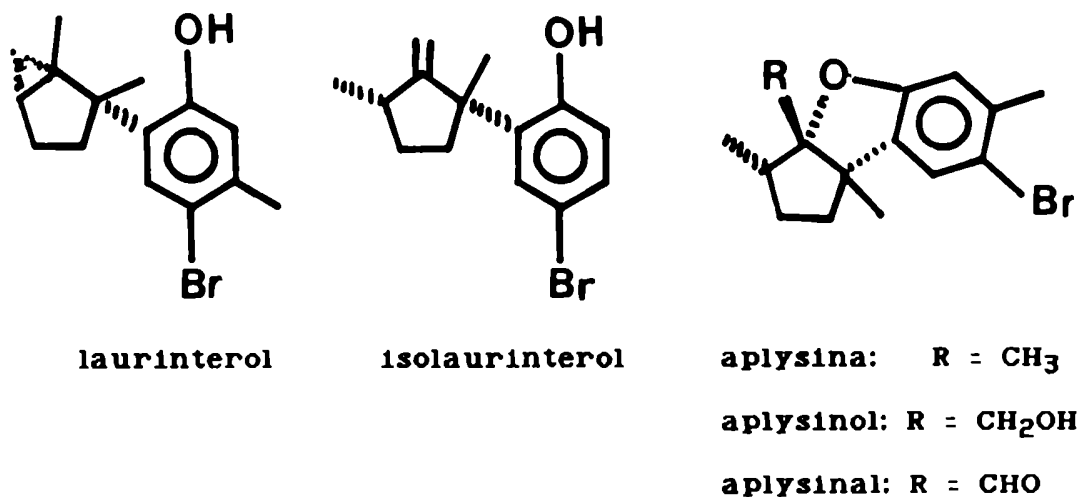


Fig. 14: sesquiterpenos halogenados aislados de *H. aberrans*.

Existe la posibilidad de que los compuestos hallados provengan de algas de este último género, abundantes en la localidad donde fueron recolectadas las Corallinaceas estudiadas por Ohta, mezcladas en el material vegetal estudiado.

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Los recursos del mar son sin duda una de las principales fuentes de riqueza con que cuenta nuestro país. El conocimiento de estos recursos incluye el estudio de los extractos obtenidos con solventes orgánicos tanto de sus especies vegetales como animales, para la identificación de los componentes de los mismos.

Los estudios realizados hasta el presente en nuestro país en el tema de productos naturales de algas, se ocuparon principalmente de los polisacáridos, muchos de ellos con importantes aplicaciones industriales. Por este motivo, se comenzó la línea de trabajo relacionada con el estudio de los metabolitos secundarios aislados de extractos con solventes orgánicos de algas marinas del litoral marítimo argentino [71-72]. En particular, en el presente Trabajo de Tesis se estudiaron algas de la familia Corallinaceae, teniendo en cuenta la posibilidad de encontrar en ellas metabolitos secundarios de interés y el hecho de ser una de las pocas familias de algas estudiadas taxonómicamente en el país.

Los trabajos de Ohta y Takagi [69,70] abren el interrogante sobre la presencia de sesquiterpenos halogenados en algas de esta familia. Por otra parte, en su trabajo de revisión de compuestos fenólicos de origen marino, Higa [47] comenta la necesidad de un estudio químico sistemático de la familia Corallinaceae. El litoral marítimo bonaerense ofrece un campo de estudio óptimo, ya que no se encuentran especies del género *Laurencia*, posibles productoras de los compuestos hallados por Ohta y Takagi.

Teniendo en cuenta por un lado lo expuesto, y por otro la accesibilidad y facilidad de recolección de este material vegetal, se encaró el estudio de *Corallina officinalis*, *Corallina elongata* y *Jania sp.*, como una contribución al mejor conocimiento de la flora de nuestro litoral marítimo, pleno de recursos naturales aún no explotados.

CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides de tipo poliénico de color amarillo a rojo, presentes en todos los organismos fotosintéticos. Hasta el presente, se encuentran descritos más de cuatrocientos carotenoides diferentes y más de cien de ellos han sido detectados en el ámbito marino.

La numeración utilizada actualmente para este tipo de compuestos toma como base al licopeno (IUPAC-IUB, 1974).

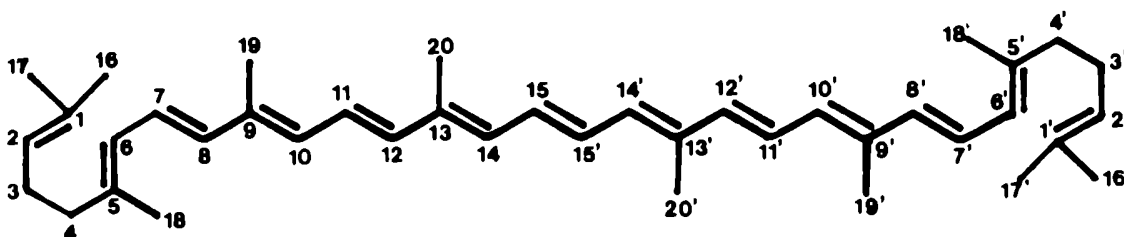


Fig. 15: Numeración de carotenoides.

CAROTENOIDES EN EL AMBITO MARINO

El color de las aguas marinas, sobre todo en zonas costeras, varía considerablemente debido a la variación estacional de las poblaciones de organismos fito- y zooplanctónicos, que poseen un alto contenido pigmentario (principalmente clorofilas). En aguas profundas la concentración de nutrientes disminuye, y por lo tanto también lo hace la población de organismos planctónicos, haciendo que las aguas se vean azuladas.

En zonas costeras, de alta productividad primaria, la concentración de organismos planctónicos puede ser tan elevada como para que las aguas adquieran tonos verdosos, amarillentos o pardos.

La producción anual de fitoplancton en los océanos se estima en alrededor de 4×10^{10} toneladas de materia orgánica (en base seca). De éstas, aproximadamente un 0.1 % (varios millones de toneladas) está constituido por carotenoides [73].

En ciertas épocas del año, ocurren grandes aumentos en la población de dinoflagelados. Estos poseen un elevado porcentaje de carotenoides, que producen una coloración rojiza en el agua, fenómeno conocido como "marea roja". Los carotenoides no se limitan a cumplir esta función de "señal de peligro", sino que contribuyen de manera importante a la belleza del mundo submarino. En efecto, la viva coloración de numerosos tipos de invertebrados (anémonas de mar, esponjas, moluscos, gorgonias, corales) y peces, se debe principalmente a la presencia de carotenoides. Esto tiene numerosas implicancias desde el punto de vista ecológico, ya que estas coloraciones pueden servir en algunos casos como mecanismos de atracción o de defensa. Asimismo, la coloración rosada típica de la carne de salmón y otros peces, también se debe a este tipo de compuestos.

Los carotenoides cumplen en algas [74-76] un rol de pigmentos fotosintéticos auxiliares. La luz solar es filtrada por el agua de mar a medida que aumenta la profundidad. La luz que se pierde en mayor proporción es la de longitudes de onda entre 200 y 500 nm.

Por lo tanto, la presencia de carotenoides (cuya zona de absorción se encuentra entre 450 y 550 nm) tiende a contrarrestar este efecto, permitiendo un mayor aprovechamiento de la luz solar y favoreciendo la fotosíntesis.

Otro rol importante es el de fotoprotección [77,78]. El oxígeno singulete, $^1O_2^*$, provoca oxidaciones que resultan perjudiciales para los organismos vivientes. En el caso de las algas, esta especie sería producida por el estado triplete de la clorofila, $^3Chl^*$, a través de la siguiente reacción:



Chl: clorofila

La acción fotoprotectora de los carotenoides se ejerce atrapando tanto 3Chl como 1O_2 en caso de que se hayan llegado a formar. Esta acción se llevaría a cabo pasando por el estado triplete, el cual volvería luego al estado fundamental sin emitir radiación.



Chl: clorofila

Car: carotenoide

Existen teorías sobre la acumulación selectiva de β,β -caroteno y fucoxantina en gametos masculinos y femeninos

respectivamente de algas pardas, que los vinculan con una función reproductiva, pero esto todavía no ha sido demostrado.

En el ámbito marino es donde se halla la mayor diversidad en cuanto a estructura de carotenoides. Estos se hallan presentes en bacterias, en todas las clases de algas, y también en vertebrados e invertebrados [79,80].

Los carotenoides son biosintetizados "de novo" por todos los organismos fotosintéticos, mientras que los vertebrados e invertebrados pueden modificar la estructura de los carotenoides ingeridos con la dieta. Esto permite concluir que:

a) Los carotenoides presentan un gran potencial como marcadores quimiotaconómicos en el ámbito marino. Estudios sistemáticos en distintos tipos de organismos han permitido encontrar compuestos característicos en cada uno de ellos. Además, en el caso de organismos fotosintéticos, la presencia o no de enzimas capaces de realizar ciertas transformaciones de grupos terminales puede ser indicativa de su posición en la escala evolutiva.

b) El hecho de que varias clases de algas sirvan de alimento a diversos tipos de animales marinos y que éstos no puedan sintetizar carotenoides "de novo" puede permitir el seguimiento de la cadena alimentaria, conociendo previamente la distribución de carotenoides en algas. Por ejemplo, la cantidad total de carotenoides del molusco *Mytilus edibilis*, varía con la frecuencia de las floraciones de dinoflagelados [81]. Se supone que la mytiloxantina, principal carotenoide del molusco, proviene de la transformación de la fucoxantina, ingerida con la dieta [82].

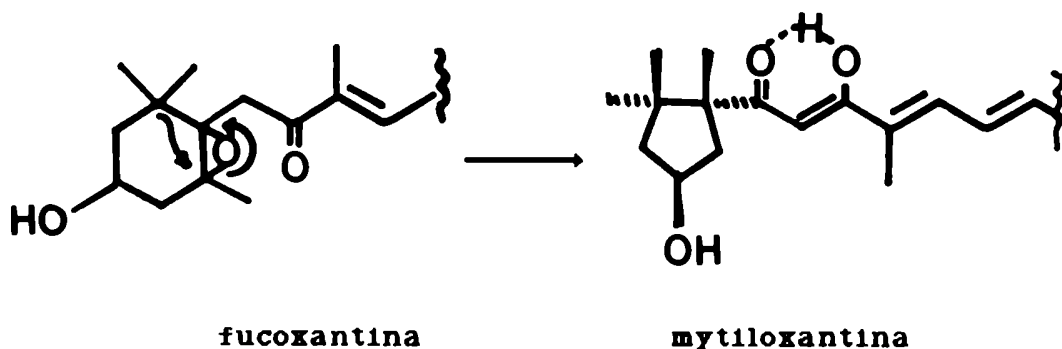


Fig. 16: Posible origen biosintético de la mytiloxantina.

BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES

A partir de la formación de geranyl-geraniol pirofosfato, la biosíntesis de carotenoides se puede dividir en tres secuencias biosintéticas:

a) Desde la condensación de dos unidades de geranyl-geraniol pirofosfato hasta la producción de licopeno o dehidrollicopeno [83].

b) Reacciones de ciclación o de cuasi-ciclación; la mayor parte de los pasos involucrados fueron estudiados por Goodwin y Britton [84,85].

c) Reacciones de elaboración o modificación de los grupos terminales. Este grupo de reacciones es el que ha sido menos estudiado. En el caso de las algas, ello se ve dificultado por la mayor eficiencia que presentan estos organismos respecto de las bacterias en la transformación de los precursores. Por lo tanto, se torna más difícil la detección de los productos intermedarios.

La mayor parte de estas reacciones no han sido todavía estudiadas. Una de las pocas transformaciones elucidadas, fue la que origina los grupos terminales alénicos. Milborrow y colaboradores [86], obtuvieron sistemas libres de células del dinoflagelado *Amphidinium carterae* mantenido en cultivo axénico. Al inocular zeaxantina-[^{14}C], obtuvieron neoxantina y diadinoxantina marcadas. Por otra parte, en experiencias con inoculación de mevalonato [$2\text{-}^{14}\text{C}$, $2\text{ RS-}2\text{-}^3\text{H}_2$] se pudo determinar que el átomo de hidrógeno de C-8 en el grupo alénico de la fucoxantina provenía del hidrógeno unido al C-2 del mevalonato. Este resultado excluiría la posibilidad de un grupo acetileno como precursor del grupo aleno.

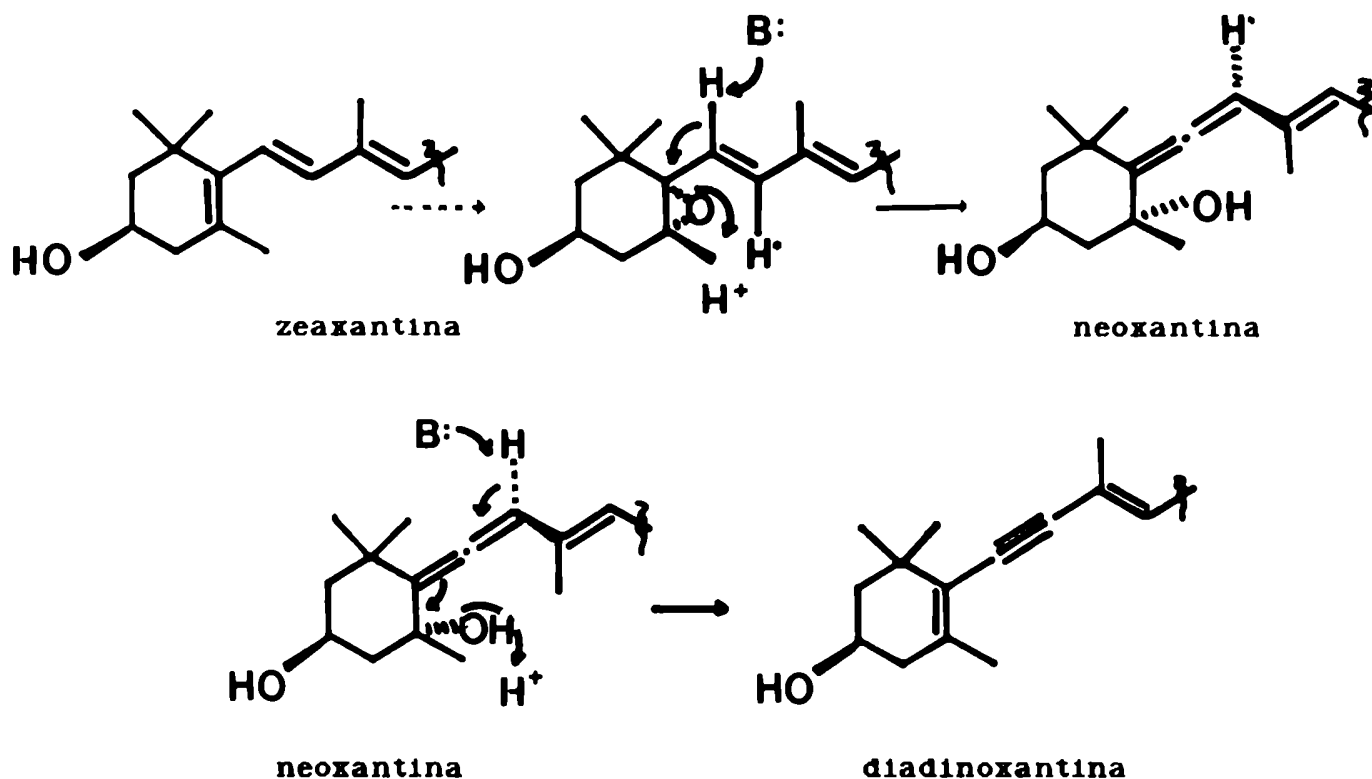


Fig. 17: Experiencias biosintéticas de Milborrow y colaboradores.

CAROTENOIDES DE ALGAS ROJAS

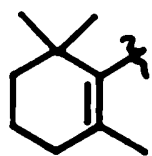
La mayor parte de los primeros estudios realizados (anteriores al año 1970), son cuestionables, ya que no incluyen el uso de técnicas de RMN-¹H o E.M.

Sin embargo, los trabajos posteriores de Björnland [87] y Liaaen-Jensen [79,80] han permitido comprobar que los resultados anteriores eran bastante acertados en cuanto a la escasa variedad de carotenoides encontrados.

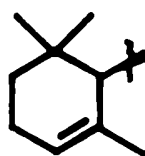
Existen cuatro carotenoides presentes en la mayor parte de las especies estudiadas: β,β -caroteno; β,ϵ -caroteno; zeaxantina, y luteína. La identificación de otros carotenoides ha sido informada ocasionalmente, y existen dudas acerca de que provengan de diatomeas, dinoflagelados u otros organismos contaminantes [87].

Esquema 1: Carotenoides de algas rojas.

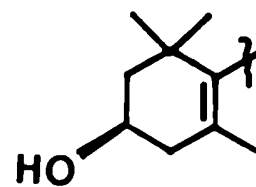
<u>Carotenoides comunes</u>	<u>Carotenoides poco frecuentes</u>
β,β -caroteno : a-P-a	α -criptoxantina : c-P-b
β,ϵ -caroteno : a-P-b	β -criptoxantina : c-P-a
zeaxantina : c-P-c	antheraxantina : e-P-c
luteína : c-P-d	violaxantina : e-P-e
	auroxantina : g-P'-g
	aurocromo : f-P'-f
	taraxantina : e-P-d
	neoxantina : e-P'-i
	fucoxantina : h-P'-j



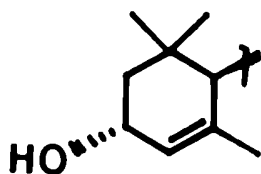
a



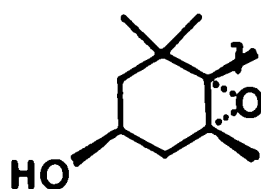
b



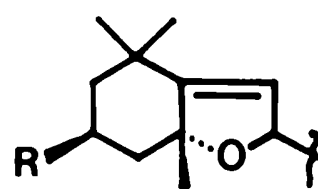
c



d

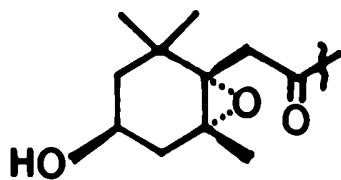


e

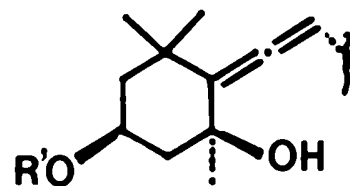


f: R = H

g: R = OH

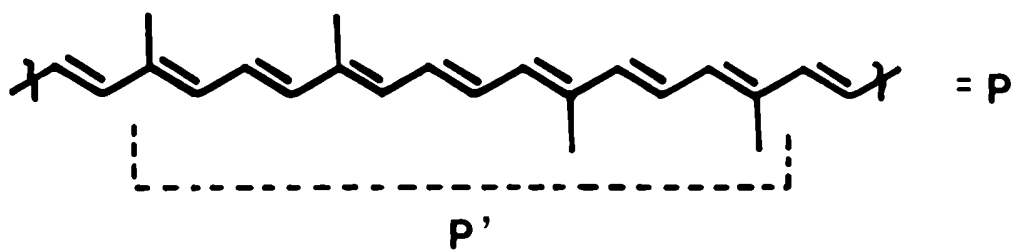


h



i: R = H

j: R = Ac



ACTIVIDAD FARMACOLOGICA Y APLICACIONES INDUSTRIALES

El hecho de que los carotenoides ejerzan un efecto fotoprotector en organismos fotosintéticos ha llevado a probar su acción en enfermedades de la piel causadas por una excesiva fotosensibilidad [88].

La administración de β,β -caroteno a pacientes de protoporfiria eritropoietica permitió observar un marcado incremento en la tolerancia a la luz [89,90].

También se ha informado el uso de β,β -caroteno en tratamientos de porfiria congénita (enfermedad de Gunther) con resultados positivos [91,92].

Actualmente se está estudiando la relación de la vitamina A, β,β -caroteno, y otros carotenoides como fuente de prevención de tumores de piel [93].

Los carotenoides tradicionalmente se han utilizado como colorantes naturales, tanto en alimentos como en medicamentos. Incluso, agregados en dosis extra en la dieta de salmones, mejoran considerablemente el color de su carne [94]. Las algas pardas del género *Sargassum*, se emplean en forma seca y molidas en alimentos para ganado como un método económico para introducir carotenoides en la dieta.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION

Los carotenoides son sensibles a la luz, calor, oxígeno, ácidos y peróxidos. Algunos, como la fucoxantina, son también

lábiles frente a los álcalis. Teniendo en cuenta estos factores, los métodos empleados para extracción y aislamiento deben ser muy cuidadosos.

Las extracciones se deben realizar en frío y a partir del tejido fresco (ya sea animal o vegetal) y la evaporación de los extractos debe efectuarse a temperaturas inferiores a 40°C. Durante los procesos de extracción y aislamiento, resulta fundamental guardar los extractos, las fracciones de purificación y los compuestos aislados a baja temperatura (-30°C) y en la oscuridad, contenidos en ampollas color caramelo, cerradas en atmósfera de nitrógeno. Estas precauciones aseguran una buena conservación de los productos durante períodos largos (un año o más) sin degradación apreciable.

El método tradicionalmente más empleado para purificación de carotenoides es la cromatografía, tanto en capa delgada como preparativa, realizándose incluso separaciones en la escala de microgramos.

A partir del año 1971 comenzó la aplicación de CLAR a la separación de carotenoides. Desde entonces, han sido desarrollados una gran cantidad de sistemas, siendo los más empleados, los de fase reversa (Rp-18) y los de fase nitrilo.

Los sistemas de fases móviles varían según la polaridad de los compuestos a separar, lográndose la resolución de mezclas muy complejas, inclusive de compuestos epiméricos [95].

Mediante la derivatización con ácido (-) camfánico o con (S)-(+)- α -(1-naftil) etilisocianato, se ha logrado la resolución

de mezclas racémicas y se ha conseguido probar el carácter racémico y meso de la astaxantina proveniente de distintas fuentes naturales [96-98].

El detector más utilizado para este tipo de técnica cromatográfica es el UV/Vis., debido al alto coeficiente de extinción de estos compuestos en la zona de absorción del visible.

ELUCIDACION ESTRUCTURAL

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

RMN-¹H:

Los espectros RMN-¹H de carotenoides presentan un aspecto característico, en el cual se destacan dos zonas:

a) Zona de campos altos (δ : 1 - 2.5): es la que brinda la mayor cantidad de información estructural, debido especialmente a las señales de los hidrógenos de los diferentes grupos metilo, las cuales aparecen generalmente como singuletes. Estas señales permiten en muchos casos individualizar los grupos terminales.

b) Zona de δ : 5 a δ : 7.2: las señales de esta zona se originan en los diferentes hidrógenos olefínicos. La escasa diferencia de desplazamiento químico y la diversa multiplicidad de estas señales genera un gran solapamiento de las mismas en espectros realizados a 100 MHz, situación que hace muy dificultosa la asignación de las señales.

Sin embargo, algunas de estas señales brindan importante información, como por ejemplo, en el caso de grupos terminales 5,8-epóxido (δ : 5-5.3). En espectros realizados a 400 MHz, las señales de esta zona aparecen lo suficientemente resueltas como para permitir en algunos casos, la asignación de desplazamientos y particiones para cada hidrógeno de la cadena poliénica [99].

En general se observa que las señales de H-11 y H-15 usualmente aparecen a campos mas bajos (alrededor de 6.7 ppm), y las de H-12, H-14 y H-10 a campos más altos. Esta desprotección de H-11 y H-15 se puede interpretar como debida a fuertes interacciones del tipo de Van der Waals con los hidrógenos pertenecientes a los metilos de la cadena poliénica.

Las señales de H-7, H-8 y H-10 son altamente dependientes del grupo terminal.

RMN-¹³C:

Esta técnica requiere el uso de una mayor cantidad de muestra que a veces es difícil de lograr, lo cual representa una limitación.

Los espectros RMN-¹³C también tienen un aspecto característico. Todos ellos presentan una zona densamente poblada entre 120 y 130 ppm debida a los carbonos olefínicos; pero son las zonas de 0-70 y 170-220 ppm las más indicadas para individualizar los grupos terminales, ya que permiten detectar la presencia de grupos funcionales característicos.

Con esta técnica se detectan con facilidad carotenoides simétricos, ya que el número de señales del espectro se reduce a la mitad.

IDENTIFICACION DE GRUPOS TERMINALES POR RMN

La identificación de los grupos terminales es de fundamental importancia para la elucidación estructural de carotenoides. Se observa que las señales de los dos grupos terminales son independientes entre sí debido a la distancia a que se encuentran. El largo de la cadena poliénica tampoco tiene influencia apreciable sobre estas señales. Estas observaciones permitieron la utilización de análogos sintéticos de cadena más corta para la asignación de grupos terminales modelo.

Englert y colaboradores [99-100] realizaron un trabajo de recopilación de asignaciones completas de grupos terminales, tanto en RMN-¹H como en RMN-¹³C, mediante el análisis de una gran cantidad de muestras naturales y sintéticas. Las tablas de asignaciones publicadas en estos trabajos, presentan 136 grupos terminales con sus señales de RMN-¹H totalmente asignadas y 92 de ellos con sus asignaciones de RMN-¹³C.

Estas tablas incluyen la información de las señales de posiciones 7, 8 y 10, debido a la mencionada influencia de los grupos terminales sobre estas señales. Para la asignación de las señales informadas se emplearon las siguientes técnicas:

- espectros NOE-diferencia [102].

- espectros resueltos 2D-J [103].
- la secuencia DID (Double Indoor Difference) [101], para la asignación de señales en espectros RMN-¹H complejos.
- espectros correlacionados 2D (COSY), homonuclear y heteronuclear [104,105].
- espectros RMN-¹³C utilizando la secuencia DEPT [106].
- espectros INADEQUATE-2D [107].

ESPECTROMETRIA DE MASA

La espectrometría de masa de compuestos carotenoides es un tema que ha sido muy estudiado como un aporte a su elucidación estructural y a los aspectos mecanísticos de las fragmentaciones características de este tipo de compuestos [108-112].

Las fragmentaciones observadas se pueden dividir en dos grandes grupos:

- a) fragmentos provenientes de la cadena poliénica, presentes en mayor o menor medida en los espectros de todos los carotenoides. Estos fragmentos tienen escaso valor diagnóstico (salvo el caso de los que provienen de la cadena poliénica de compuestos con grupos terminales epoxídicos).
- b) fragmentos característicos de los distintos grupos terminales de gran valor diagnóstico.

FRAGMENTACIONES DE LA CADENA POLIENICA

1) Eliminación de tolueno y xileno : $[M - 92]^+$ y $[M - 106]^+$

Ocurren en general en los espectros de todos los carotenoides y es la fragmentación mejor conocida para este tipo de compuestos.

El mecanismo aceptado [113] (basado en experiencias de marcación con deuterio) involucra los siguientes pasos:

- 1) una reacción electrocíclica conrotatoria de 8 electrones.
- 2) una reacción electrocíclica disrotatoria de 6 electrones.
- 3) apertura del anillo de cuatro miembros formado y eliminación de los fragmentos neutros.

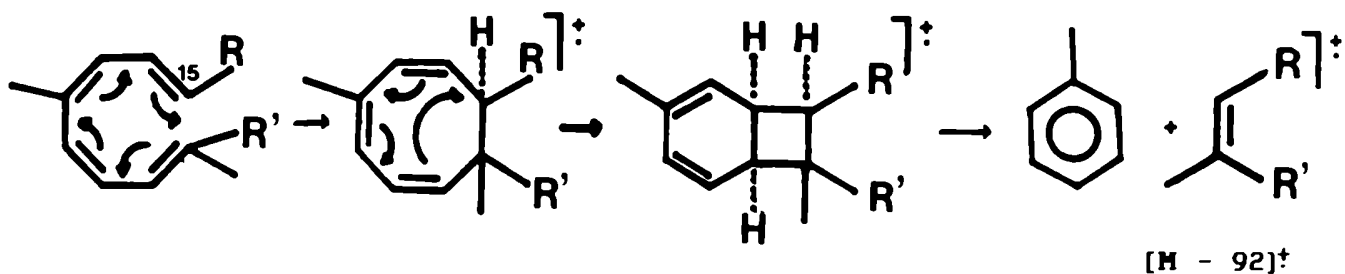


Fig. 18: Formación del ion $[M - 92]^+$.

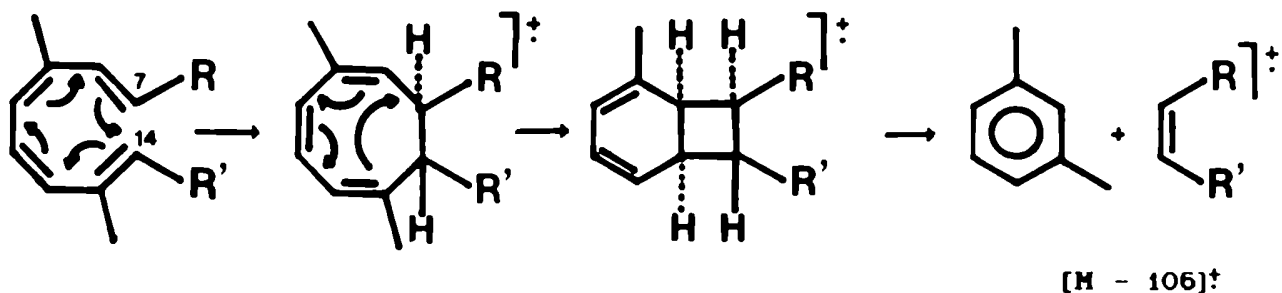


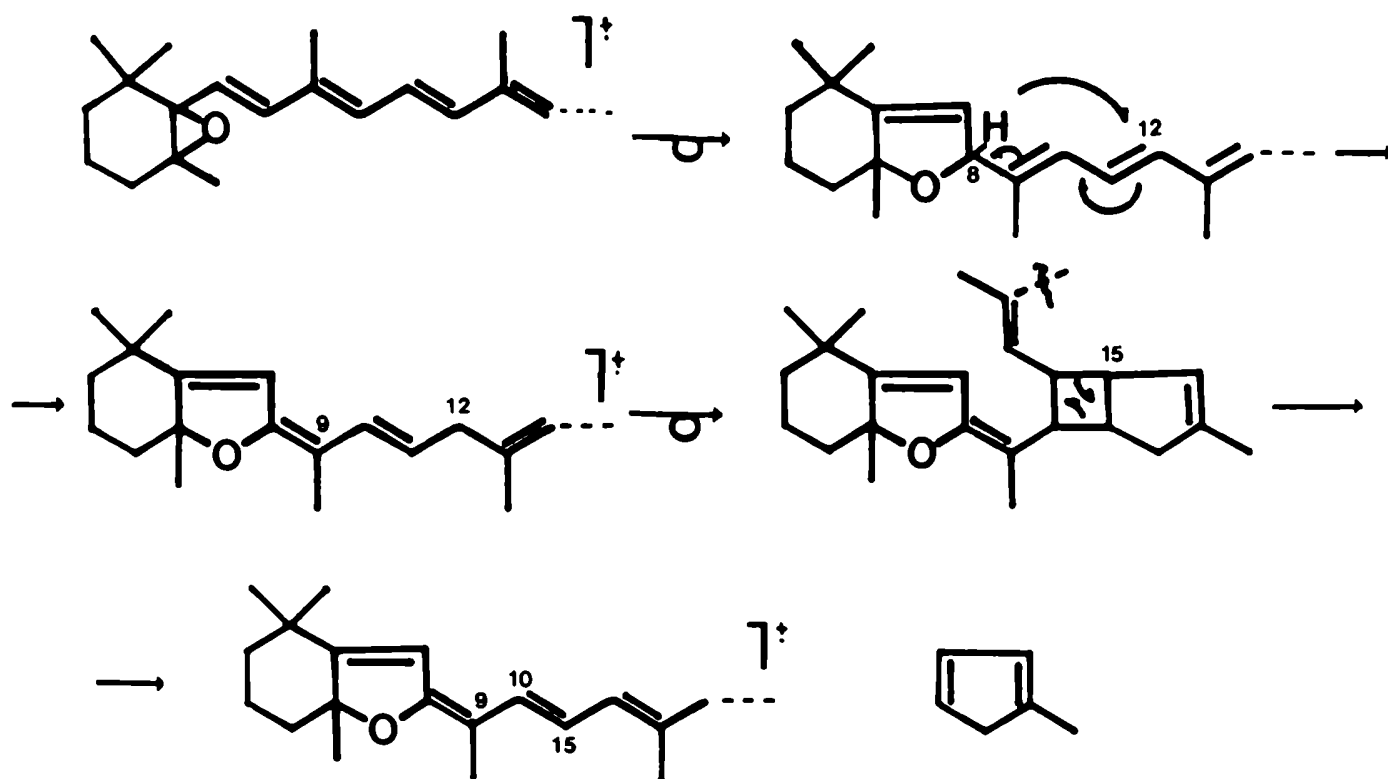
Fig. 19: formación del ion $[M - 106]^+$

11) Eliminación de $C_{12}H_{14}$: [M - 158][†]

Usualmente de baja abundancia y referida como eliminación de dimetildihidronaftaleno. Se ha demostrado que involucra solamente la porción de cadena entre C-10 y C-12' (o C-12 a C-10') [114].

111) Eliminación de fragmentos de cadena en compuestos con grupos terminales epoxídicos: [M-80][†], [M-106][†], [M-146][†], y [M-172][†]:

Estos iones indican la presencia tanto de 5,6 como de 5,8-epóxidos, ya que los primeros se reordenan para dar los segundos y por consiguiente presentan las mismas fragmentaciones [114].



[M - 80][†]

Fig. 20: Formación del ion [M - 80][†]

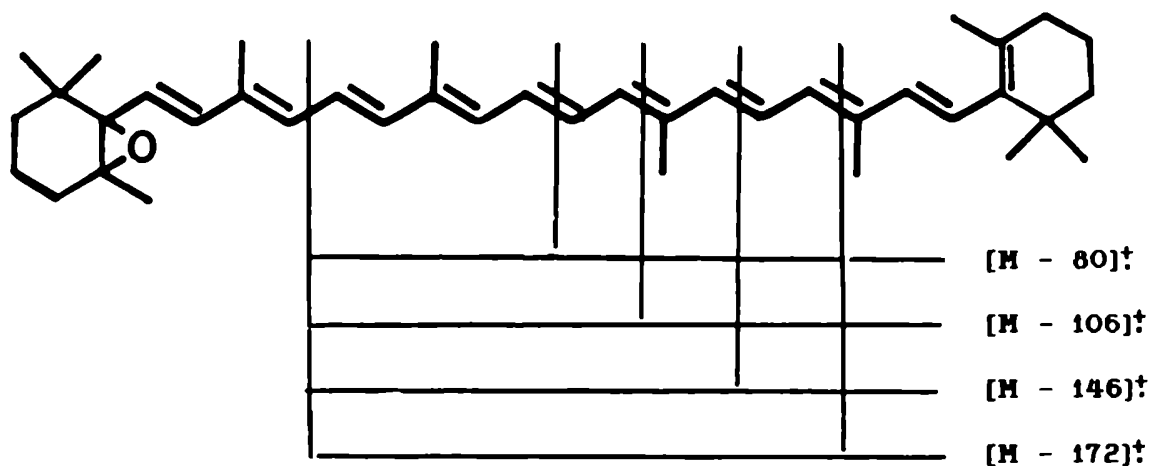


Fig. 21: Fragmentaciones de la cadena poliélica en carotenoides con grupos terminales epoxídicos.

FRAGMENTACIONES DE LOS GRUPOS TERMINALES

En general, cada grupo terminal presenta rupturas características. Se consideran a continuación sólo aquellos que pertenecen a carotenoides provenientes de organismos de origen marino.

1) Grupos terminales acíclicos:

Las fragmentaciones varían de acuerdo a la funcionalización que presenten. Así por ejemplo, la presencia de un grupo hidroxilo genera un ion [M-18][†] importante. Asimismo la presencia de un metoxilo genera [M-32][†].

Un grupo carbonilo conjugado con la cadena poliénica promovería rupturas α al mismo con retención de la carga en el fragmento de mayor m/z .

En el caso de grupos terminales no funcionalizados:

a) si existe conjugación total, presenta iones correspondientes a la ruptura de cada enlace entre C-3 y el centro de la cadena poliénica, con transferencia de hidrógeno.

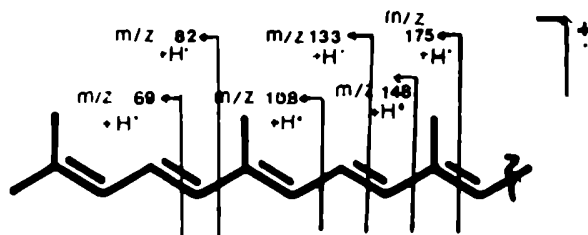
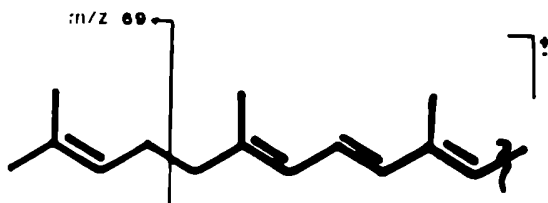


Fig. 22: Fragmentaciones en grupos acíclicos totalmente conjugados

b) si no existe conjugación total, las rupturas alílicas resultan muy importantes [115].



presenta $[m/z 69]^+$ pico base

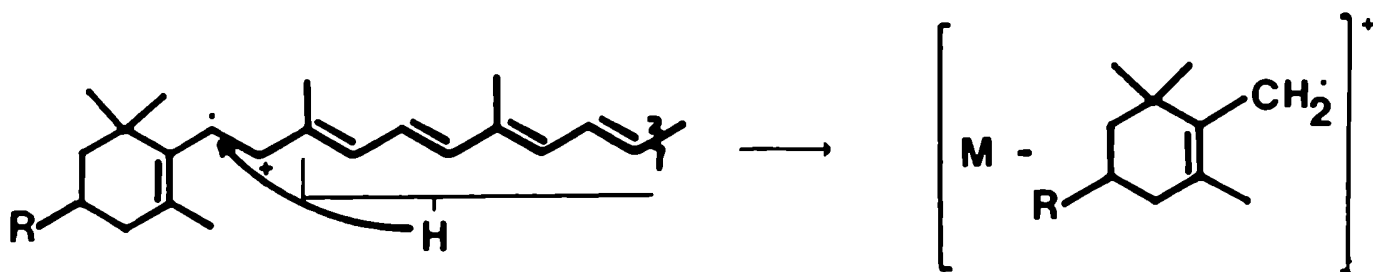
Fig. 23: Fragmentación alílica.

2) Grupos terminales cíclicos:

En general los iones de grupos terminales cíclicos poco funcionalizados son de baja abundancia.

1) grupos terminales con Δ 5:

En general la única fragmentación importante que presentan es la ruptura del enlace 7,8.



$[M - 137]^+$ si R: H

$[M - 153]^+$ si R: OH

Fig. 24: Ruptura del enlace 7,8.

La transferencia de hidrógeno no ocurre desde una posición específica de la cadena poliénica. Ha sido demostrado que un 40 % proviene de C-11 y el resto, de otras posiciones [115].

11) grupos cíclicos con Δ 4,5:

a) ruptura del enlace 7,8: es similar al caso de Δ 5- ciclohexenos.

b) ruptura del enlace 6,7: ocurre con transferencia de hidrógeno al fragmento de mayor m/z (a la inversa que en el caso del enlace 4,5).

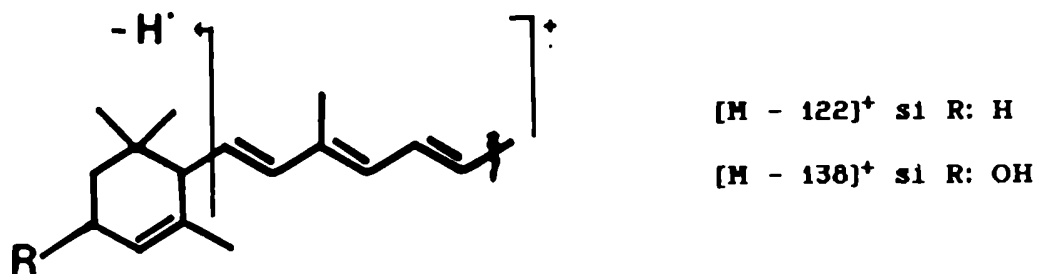


Fig. 25: Ruptura del enlace 6,7.

c) ruptura retro Diels-Alder: tiene poca importancia en espectros realizados a 70 eV, pero es importante para caracterizar este tipo de grupo terminal mediante técnicas de análisis de iones metaestables [116].

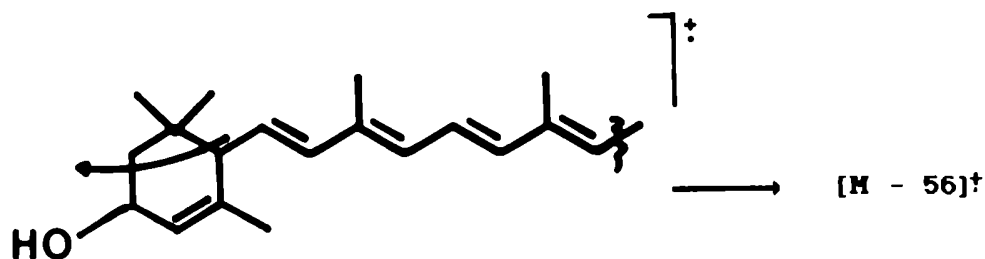


Fig. 26: Ruptura retro Diels-Alder.

111) Grupos terminales aromáticos:

La única fragmentación importante que presentan es la ruptura del enlace 7,8 [117].

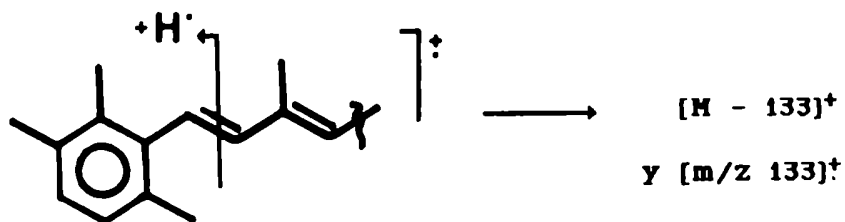


Fig. 27: Ruptura 7,8 en grupos terminales aromáticos.

iv) Grupos terminales de tipo ciclopentano:

En general prevalece la ruptura del enlace 5,6. Si la carga es retenida por el fragmento de menor m/z, éste da fragmentaciones posteriores [118].

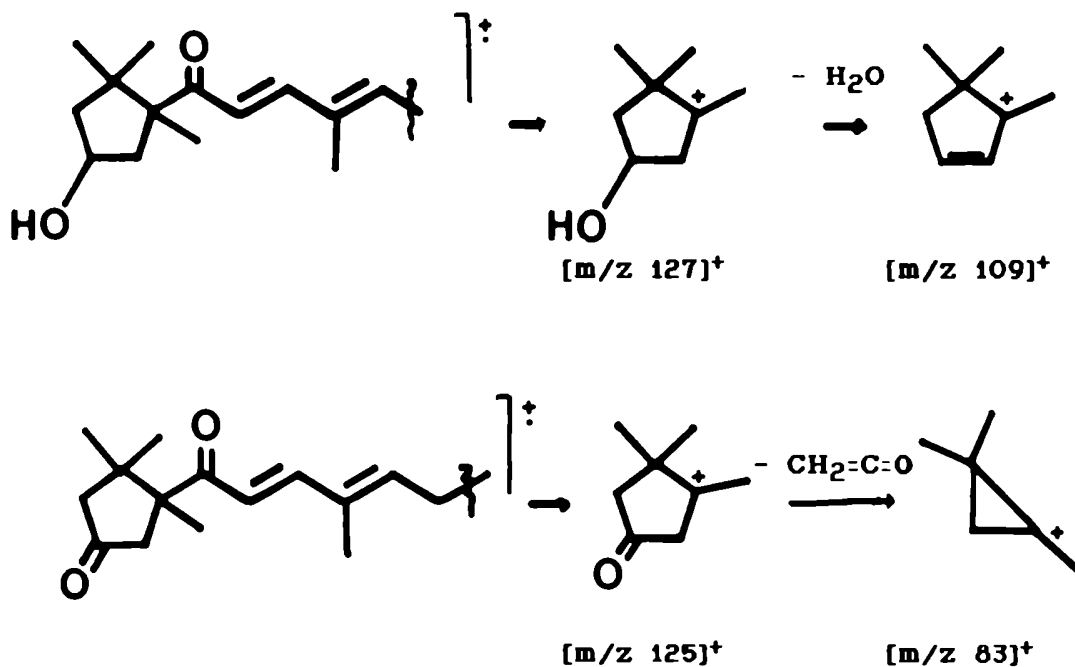


Fig. 28: Fragmentaciones de grupos terminales de tipo ciclopentano.

v) Grupos terminales epoxídicos:

Tanto los epóxidos en 5,6 como en 5,8 dan las mismas fragmentaciones, debido al reordenamiento indicado en la sección de fragmentaciones de la cadena poliénica [119].

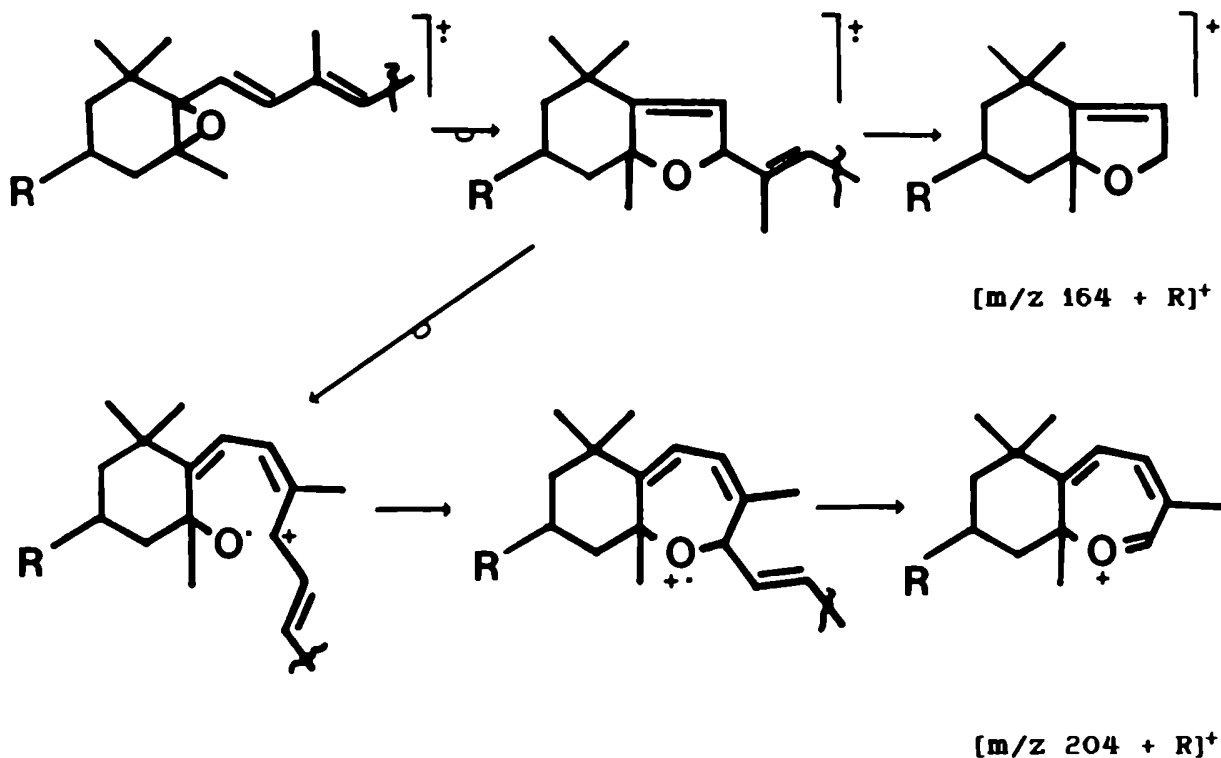


Fig. 29: Formación de $[m/z 164 + R]^+$ y $[m/z 204 + R]^+$.

Estos son los iones más importantes de una serie que se forma por la ruptura de los enlaces 8,9 - 9,10 - 10,11 , etc. La formación de los miembros más pesados de la serie (ruptura de enlaces más allá de C-15) involucra la pérdida de un radical hidrógeno. Por ejemplo:

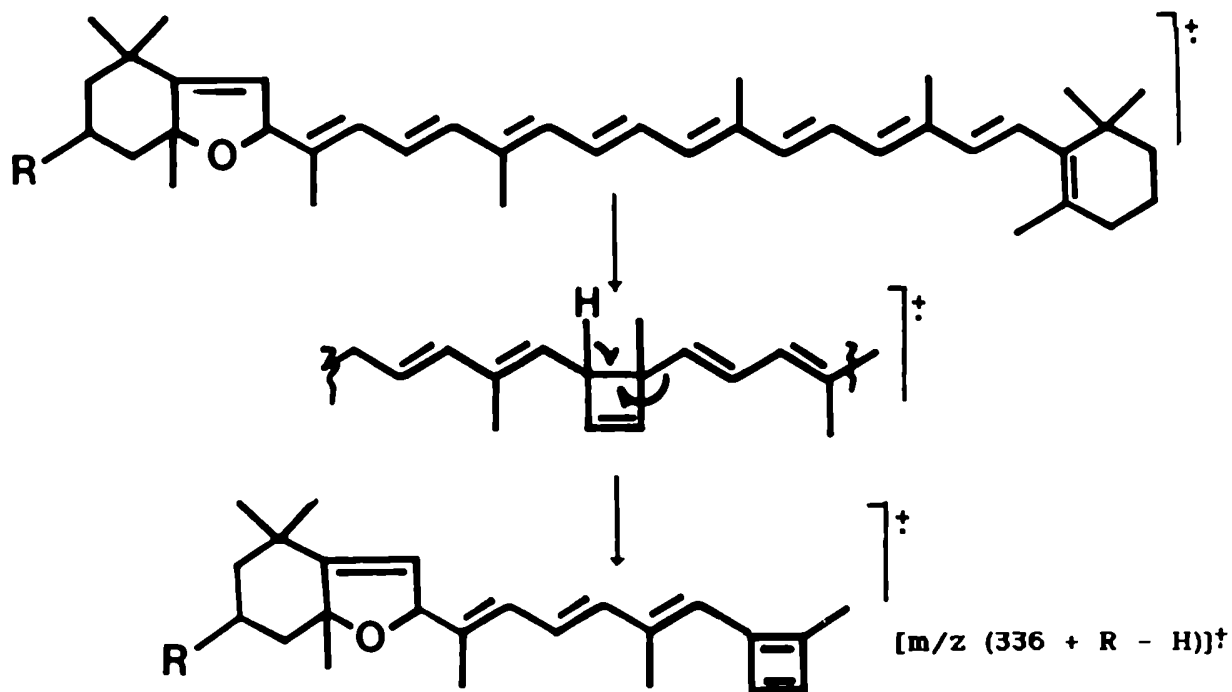


Fig. 30: Formación del ion $[m/z (336 + R - H)]^+$.

v1) Grupos terminales 3-hidroxi-4-cetociclohexenos o hexadienos:

En general presentan los iones $[M-16]^+$, $[M-42]^+$, $[M-44]^+$ y

$[M-58]^+$ [120].

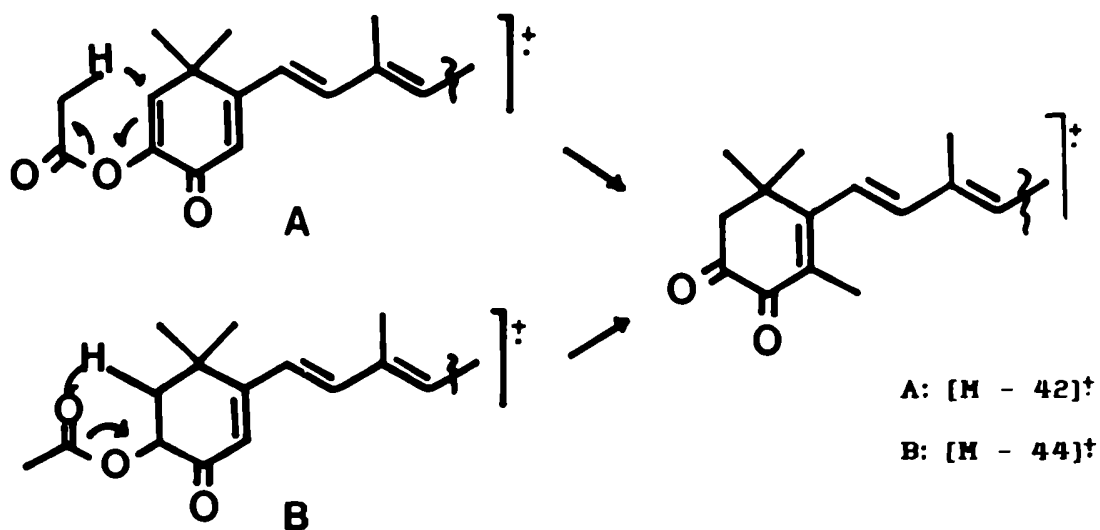


Fig. 31: Formación de los iones $[M-42]^+$ y $[M-44]^+$.

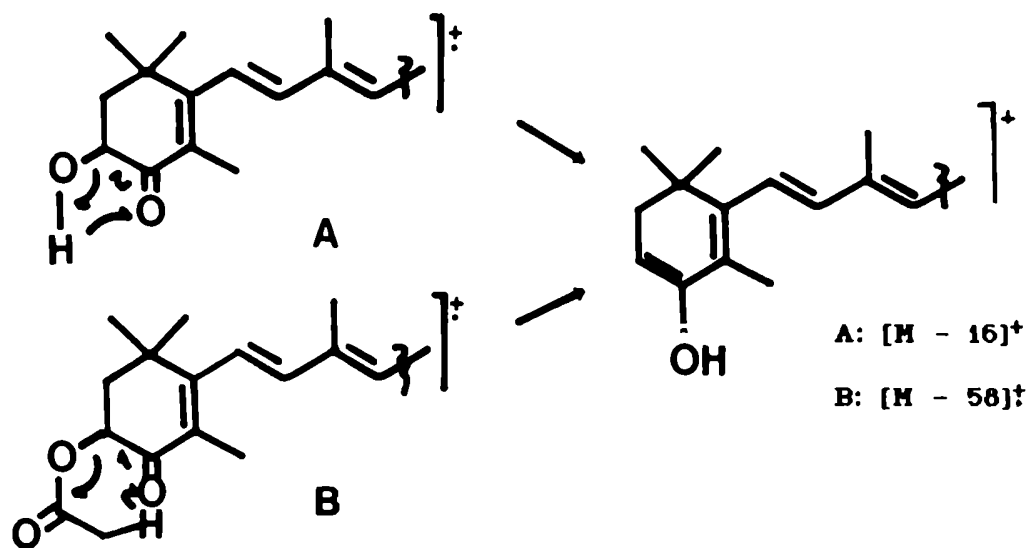


Fig. 32: Formación de los iones $[M-16]^+$ y $[M-58]^+$.

Además de estos iones de alto m/z, estos grupos también originan iones estables de bajo m/z. Por ejemplo:

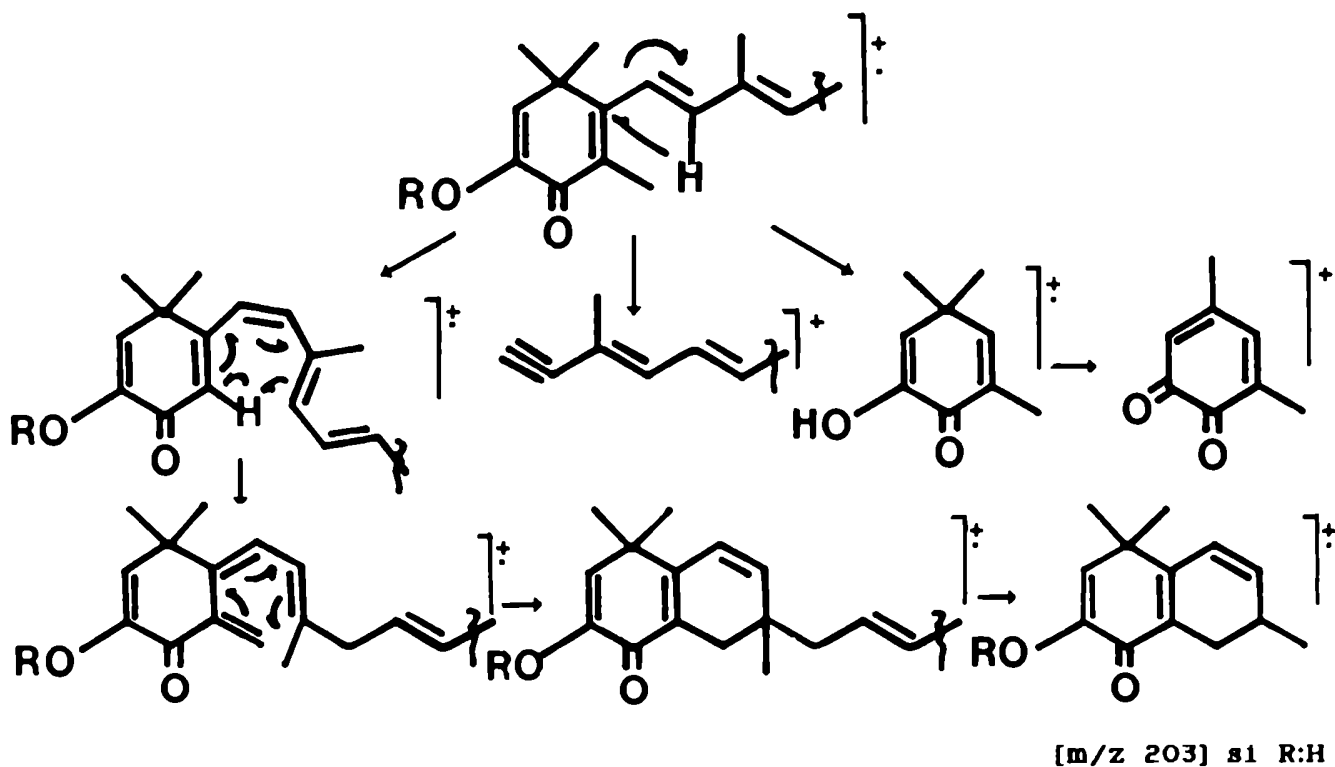


Fig. 33: Fragmentaciones de grupos 3-hidroxi-4-cetociclohexadienos.

vii) Grupos terminales alénicos:

Este tipo de grupo terminal, presente en fucoxantina, peridinina y otros carotenoides característicos del ámbito marino, en general posee grupos hidroxilo terciarios y acetatos, los cuales se pierden fácilmente originando $[M-18]^+$ y $[M-60]^+$ [121,122].

Otros iones característicos son los siguientes:

1)

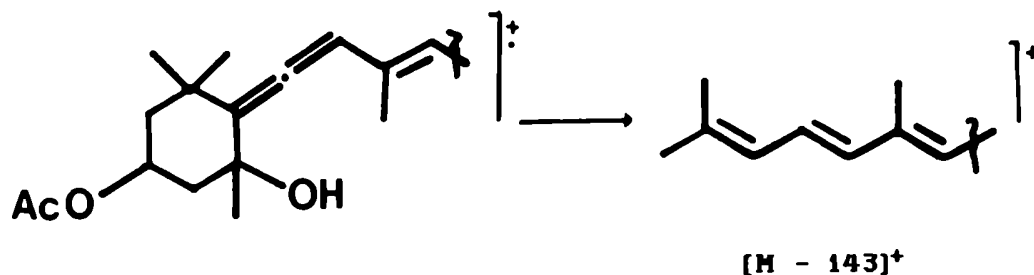


Fig. 34: Formación del ion $[M-143]^+$ en grupos terminales alénicos.

11) ruptura del enlace 11,12 con transferencia de hidrógeno.

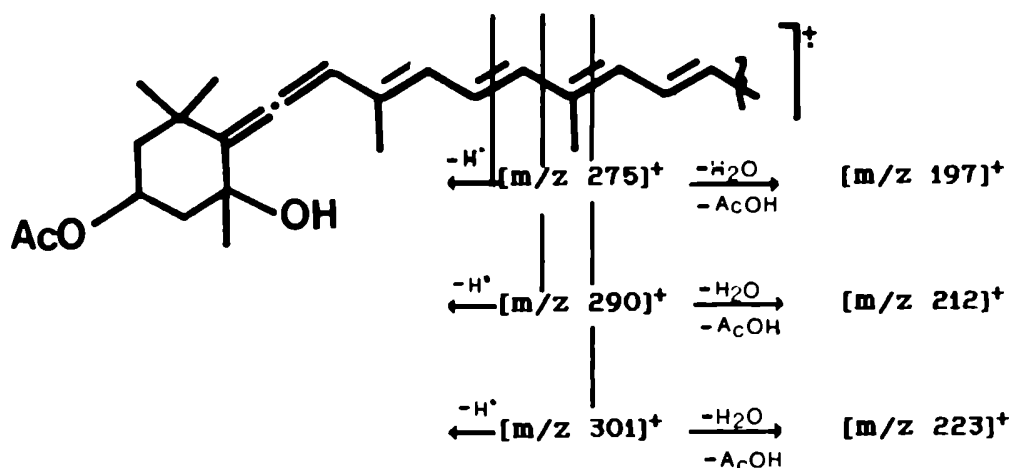


Fig. 35: Rupturas 11,12 - 12,13 y 13-14.

GALACTOSILDIGLICERIDOS

Los galactosildiglicéridos se encuentran presentes en todos los organismos fotosintéticos, principalmente como componentes de membrana. Las reacciones fotosintéticas se llevan a cabo en los cloroplastos y se pueden dividir en dos procesos distintos: la fijación de CO₂ ocurre en la porción soluble (estroma) del cloroplasto, mientras que las reacciones que involucran transporte de electrones, captura de energía y generación de potencial reductor, se llevan a cabo en una serie de membranas internas conocidas como tilacoides.

La composición de estas membranas es 50 % proteica y 50 % lipídica y es en esta porción de la célula donde se concentran las clorofilas, formando parte de complejos con proteínas [123].

Los componentes lipídicos mayoritarios de los tilacoides de cloroplastos son precisamente mono- y digalactosildiglicéridos, genéricamente 1,2-di-O-acil-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol, y 1,2-di-O-acil-3-O-(6-O-α-D-galactopiranosil-β-D-galactopiranosil)-*sn*-glicerol.

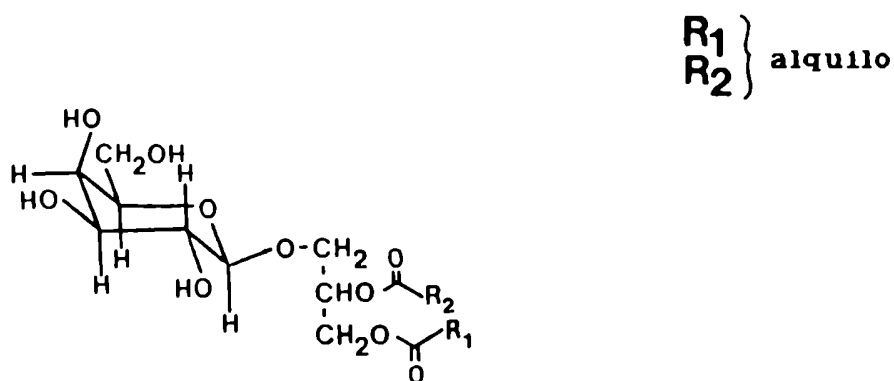


Fig.36: 1,2-di-O-acil-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

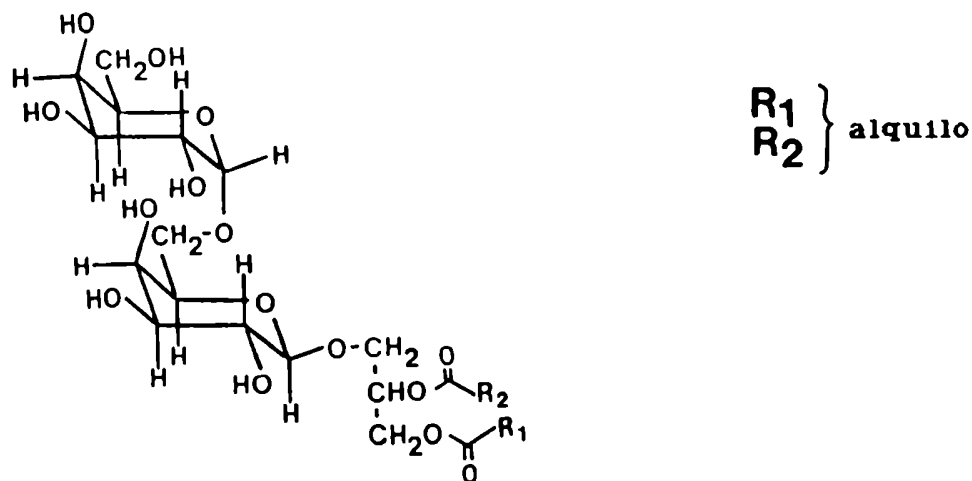


Fig. 37: 1,2-di-O-acil-3-O-(6-O-α-D-galactopiranosil-β-D-galactopiranosil)-*sn*-glicerol.

Estos compuestos no están uniformemente distribuidos en los cloroplastos. Los monogalactosildiglicéridos se encuentran preferentemente en las membranas tilacoides, mientras que los digalactosildiglicéridos se ubican en las envolturas de los cloroplastos.

Además de estas dos familias de compuestos, en cloroplastos se encuentran también sulfoquinovosildiglicéridos, fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina.

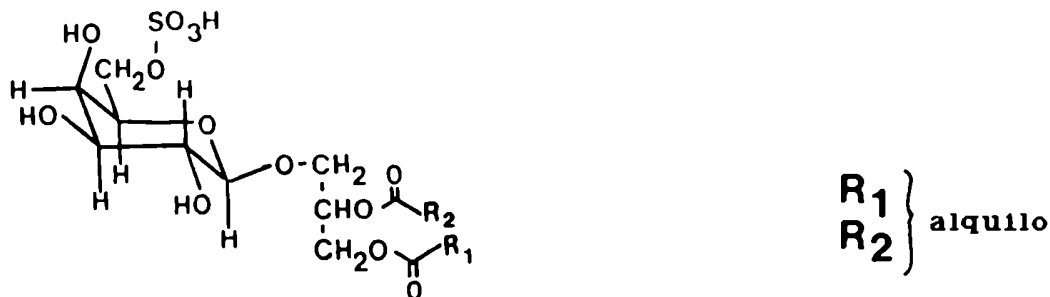


Fig. 38: 1,2-di-O-acil-3-O-(6-sulfoquinovosil)-*sn*-glicerol.

La naturaleza tanto lipofílica como hidrofílica de los mono- y digalactosildiglicéridos y los restantes lípidos de membrana tiene fundamental importancia en la estructura y actividad de la misma. En particular, la composición en ácidos grasos de los lípidos constituyentes de la membrana influye en la permeabilidad, movilidad y funcionamiento de la misma.

Este es uno de los motivos por el cual existen varios estudios sobre los ácidos grasos de galactolípidos de plantas superiores [124-128] y algas [129-130].

En general, tanto en plantas superiores como en algas y hongos, se puede observar un elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (en plantas superiores principalmente C_{16:3}). Estos valores son muy distintos de la composición en ácidos grasos de otras clases de lípidos.

Además se observa que esta tendencia es más acentuada en mono que en digalactosildiglicéridos, mientras que en sulfoquinovosildiglicéridos aumenta considerablemente el porcentaje de ácidos grasos saturados.

También se observa una distinta distribución de los ácidos grasos entre las posiciones *sn-1* y *sn-2* del glicerol, obteniéndose distintas especificidades no solo según la posición del organismo en la escala evolutiva, sino también según el tipo de galactolípido considerado. En efecto, se observaron diferencias entre monogalactosildiglicéridos, digalactosildiglicéridos y sulfoquinovosildiglicéridos, de las mismas especies.

En los primeros estudios realizados por Noda y Fujiwara [131], sobre hidrólisis enzimática de monogalactosildiglicéridos, se proponía que el factor determinante en cuanto a la distribución de los ácidos grasos era el grado de insaturación. Así, a mayor grado de insaturación, existía una mayor tendencia a ocupar la posición *sn-2* del glicerol.

Estudios posteriores, generalizados a todo el reino vegetal [124,129,132] permitieron concluir que el factor preponderante no era el grado de insaturación sino el largo de la cadena del ácido graso (ver tabla 1).

Se observó que los ácidos grasos de cadena de C-16, tendían a ubicarse en la posición *sn-2* del glicerol, independientemente de su grado de insaturación, mientras que los de C-18 o mayores tendían a ocupar la posición *sn-1* [133].

En casos en que no puede haber selección por longitud de cadena (como en *Anchusa sp.*), se observa una mayor tendencia de los ácidos grasos más insaturados a ocupar la posición *sn-2*.

En el caso de los digalactosildiglicéridos, se observa que si bien en algas se mantiene la tendencia de los C-16 a ocupar la posición *sn-2*, en plantas superiores la situación es diversa, ya que se encuentran casos de preferencias por la posición *sn-1*, *sn-2* o porcentajes comparables de ambas.

Estas distribuciones parecerían indicar distintas especificidades de las galactosiltransferasas presentes en los organismos estudiados.

Estas enzimas, responsables de glicosidar diglicéridos, parecerían elegir ciertos sustratos sobre otros, y así originar las distribuciones encontradas. Sin embargo, los pocos estudios realizados hasta el momento, no han permitido verificar en todos los casos esta hipótesis.

<u>Organismo</u>	<u>fracción</u>	<u>ácidos grasos (%)</u>							
		16:0	16:1	16:2	16:3	18:1	18:2	18:3	18:4
<i>Anabaena</i>	total	24	8	10	3	3	22	30	
<i>cylindrica</i>	<i>sn-1</i>	5	6	2	1	4	35	47	
(cyanófito)	<i>sn-2</i>	7	11	19	5	2	6	9	
<i>Anabaena</i>	total	15	6	6	13	2	6	52	
<i>flosaquae</i>	<i>sn-1</i>	6	7	2	3	5	9	69	
(cyanófito)	<i>sn-2</i>	28	5	11	26		2	28	
<i>Chlorella</i>	total	2	12	27	4	15	22	18	
<i>vulgaris</i>	<i>sn-1</i>	3	2	3		24	36	32	
(chlorophyta)	<i>sn-2</i>	2	20	55	9	4	5	4	
Espinaca	total	2			21	1	2	74	
(hojas)	<i>sn-1</i>				5	2	3	90	
	<i>sn-2</i>	4			38		2	56	
<i>Anchusa sp</i>	total	3					3	72	23
(hojas)	<i>sn-1</i>	5					3	90	3
	<i>sn-2</i>	1					2	59	38

Tabla 1: Distribución de ácidos grasos en galactosildiglicéridos.

BIOSINTESIS

Los pasos finales de la biosíntesis de galactolípidos están catalizados por galactosiltransferasas y presentan las siguientes características:

- UDP-galactosa actúa como donador de galactosilo [134,135].
- cada reacción de galactosidación de diglicéridos, monogalactosildiglicéridos y digalactosildiglicéridos, está catalizada por una enzima diferente [136-139].
- estas enzimas se encuentran localizadas en las envolturas de los cloroplastos.

Además del rol estructural asignado a los galactolípidos de membrana, existen resultados que sugerirían que estos compuestos cumplen roles de sustrato o de intermediarios en la biosíntesis de ácidos grasos.

La exacta naturaleza de esta participación aún no está clara en la mayoría de los casos. Las transformaciones que se han observado en estudios realizados con algas [129,140] y plantas superiores [141] son principalmente desaturaciones de C_{16:0} a C_{16:1} y luego a C_{16:2}, y de C_{18:0} hasta llegar a C_{18:3}.

Se han propuesto dos alternativas mecanísticas para esta participación:

- a) el ácido graso es modificado estructuralmente cuando todavía está formando parte de la molécula de galactolípido.
- b) el ácido graso es momentáneamente liberado, previo a la desaturación (la cual podría ocurrir en el ácido libre o en una

forma activada, p. ej: éster con CoA) y luego vuelto a incorporar a la molécula de galactolípido.

Los estudios realizados con el alga verde *Chlorella Vulgaris* [129] y con la cianófito *Anabaena Variabilis* [142] indicarían la ocurrencia del mecanismo a).

AISLAMIENTO Y PURIFICACION

Debido a su polaridad, los galactolípidos son fácilmente separables de otras clases de lípidos presentes en el extracto. Entre las técnicas tradicionalmente utilizadas para su aislamiento encontramos:

- cromatografía en columna de Silicagel [143], eluyendo con CHCl_3 (lípidos no polares), CHCl_3 /acetona (1:1) (monogalactosildiglicéridos) y acetona (digalactosildiglicéridos).
- cromatografía en columna de Florisil [144], eluida con los mismos solventes que en el caso anterior. Esta técnica permite una mejor eliminación de los pigmentos.
- combinación de cromatografía en columna de DEAE-celulosa y capa preparativa de Silicagel [145].
- cromatografía "flash" en columna seca, siguiendo la secuencia de solventes de elución empleadas en este trabajo de Tesis; se los obtiene en las fracciones eluidas con AcOEt y AcOEt/MeOH (1:1).

La purificación de los compuestos individuales de las mezclas crudas de galactolípidos se puede llevar a cabo por dos técnicas diferentes:

- a) cromatografía en capa delgada de silicagel impregnada en AgNO_3 . Esta técnica permite resolver los compuestos sobre la base del grado de insaturación que presenten las cadenas de ácidos grasos [146].
- b) técnicas de CLAR: en general se utilizan columnas de fase reversa, utilizando como eluyentes: MeOH, MeOH/H₂O y acetonitrilo/MeOH/H₂O [147-149].

ELUCIDACION ESTRUCTURAL

La hidrólisis ácida (HCl 2% en MeOH) o alcalina (KOH 4% en MeOH) permite obtener los ácidos grasos de cada compuesto aislado y proceder a su identificación por CGL o CGL-EM de sus ésteres metílicos.

Una vez identificados los ácidos grasos presentes en la molécula, se debe determinar a qué posición del glicerol se encuentra unido cada uno de ellos. Tradicionalmente, se empleaba para ello una hidrólisis enzimática con lipasa pancreática [132,150]. Esta enzima hidroliza selectivamente ésteres de alcoholes primarios, lo cual permite identificar al ácido graso unido a la posición *sn*-1 del glicerol.

Sin embargo, este método no es siempre efectivo en el caso de los ácidos C_{20:5}(ω -3), C_{20:4}(ω -6), y Δ^5 -C_{18:1}. Este hecho representaría una selectividad negativa para el caso de los ácidos grasos Δ^5 [151,152].

ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA

Debido a la baja volatilidad y a la labilidad térmica de estos compuestos, no es posible utilizar CGL-EM; en su lugar se emplea la introducción directa de la muestra. Para el análisis de mezclas de estos compuestos se puede realizar un termograma de masa [149], monitoreando distintos rangos de iones en función de la temperatura, obteniéndose espectros de masa enriquecidos en las diferentes especies moleculares.

Los espectros de masa de mono- y digalactosildiglicéridos brindan información no sólo sobre la identidad de los ácidos grasos presentes en la molécula sino además sobre la posición relativa que ocupan en el esqueleto del glicerol [149,153]. Los iones más característicos son los siguientes:

- a) ion acilo [RCO][†]: G1, proveniente de los ácidos grasos tanto en posición *sn*-1 como *sn*-2.

- b) ion aciloximetileno [CH₂-O-C(=O)-R][†]: G2, formado preferentemente por el ácido graso sustituyente en posición *sn*-1.

- c) ion [acilo + C₃H₆O₂][†]: G3

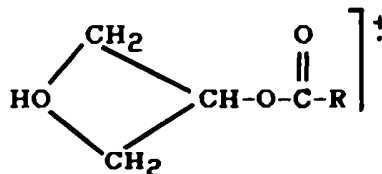


Fig. 39: Ion G3.

formado con el grupo acilo ubicado en posición *sn*-2

d) ion aciloxi $[R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O]^+$, proveniente de posiciones *sn-1* y *sn-2*

e) iones provenientes de los hidratos de carbono:

Entre ellos podemos nombrar:

m/z: 91: gliceraldehído	m/z 355: digalactosa + CH ₂
m/z: 96: 2-furfural	m/z 341: digalactosa
m/z: 98: alcohol furfurílico	m/z 179: galactosa
m/z:110: 5-metil-2-furfural	m/z 164: galactosa - O

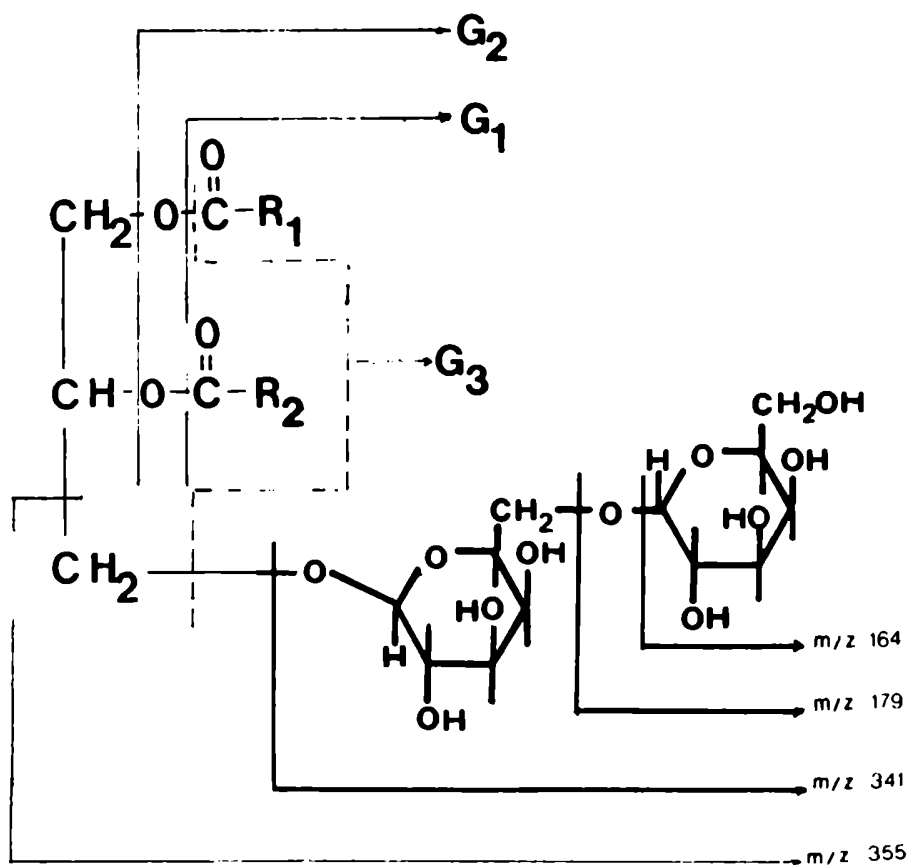


Fig. 40: Fragmentaciones en EM de galactolípidos.

ANALISIS POR ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

RMN-¹H

En general estos espectros no brindan demasiada información.

Presentan las siguientes características [154]:

- a) una zona muy compleja entre δ : 3,5 y δ : 5, originada por las señales de los hidrógenos de los hidratos de carbono y del glicerol.
- b) una señal muy intensa en la zona de metilenos (δ : 1,25)
- c) señales de los metilos terminales (δ : 0,9).
- d) señales de metilenos en posición α a carboxilo: triplete a δ : 2,3

e) señales provenientes de ácidos grasos poliinsaturados:

-CH=CH- multiplete a δ : 5 - 5,3

-CH=CH-CH₂-CH=CH- multiplete a δ : 2,8

Un dato importante que se puede obtener en el caso de ácidos grasos poliinsaturados es el número de insaturaciones y de metilenos entre insaturaciones, considerando las áreas de estas señales y comparándolas con las de los metilos terminales.

RMN-¹³C:

El ancho de las señales en los espectros de RMN-¹³C de mono- y digalactosildiglicéridos varía marcadamente con el solvente. Esto refleja la estructura secundaria de estos lípidos en los distintos solventes.

La asignación de los espectros RMN-¹³C de este tipo de sustancias fue llevada a cabo por Johns y colaboradores [155-158].

Para ello tomaron como modelo los productos de hidrólisis alcalina de mono- y digalactosildiglicéridos, 3-galactosil-*sn*-glicerol y 3-digalactosil-*sn*-glicerol. En los espectros realizados en CD₃OD, asignaron las siguientes señales:

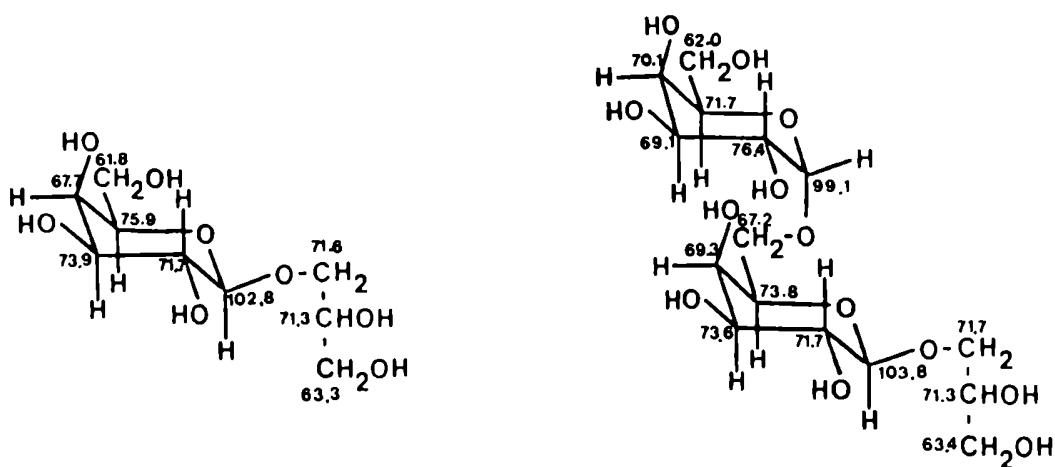


Fig. 41: Desplazamientos en RMN-¹³C de 3-galactosil-*sn*-glicerol y 3-O-digalactosil-*sn*-glicerol.

La señal a 103.8 ppm se puede asignar inequívocamente al C-1 de un β-galactósido. El corrimiento de 7.3 ppm a campos bajos con respecto al C-1 de β-D-galactopiranososa se debe a la presencia del sustituyente en β. Esto mismo justifica el corrimiento de 7.1 ppm a campos bajos del C-3 del glicerol (de 64.5 a 71.6 ppm)

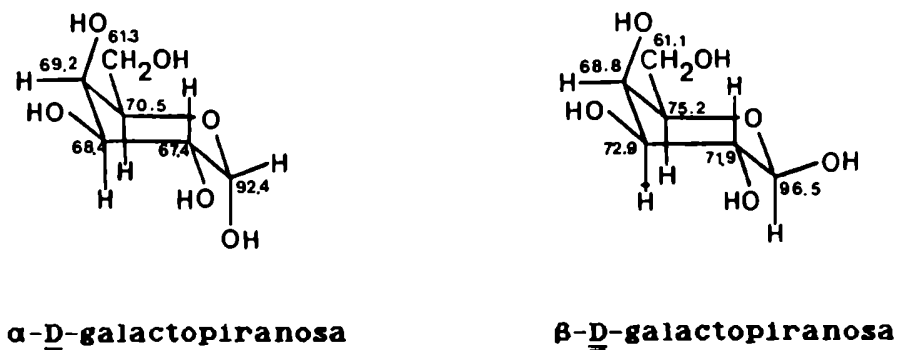


Fig. 42: Desplazamientos de α y β -D-galactopiranososa.

Por comparación de las señales del 3-galactosil-*sn*-glicerol con las de la β -D-galactopiranososa surge claramente que la unión es del tipo β y las asignaciones de los restantes carbonos se realiza fácilmente, quedando la única ambigüedad del C-2 de la galactosa y el C-2 del glicerol, cuyas asignaciones pueden estar intercambiadas.

El análisis de los espectros de mono- y digalactosildiglicéridos, indica un corrimiento de 3.3 ppm a campos altos para el C-3 del glicerol, el cual se debe a la presencia del grupo acilo en C-2. Estos resultados se corresponden con los corrimientos de 2.5 ppm observados en el C-3 del glicerol al comparar la señal de este compuesto (64.5 ppm) con la correspondiente al C-3 de hexadecanoilglicerol (62.0 ppm).

Las señales correspondientes a los carbonos de las cadenas de ácido graso, son en general coincidentes con las de los ácidos libres [159]. Se observa un corrimiento a campos altos de 6 ppm, en el carbono carboxílico debido a la esterificación.

Asimismo se observa la presencia de dos señales de éster, lo que indicaría la no equivalencia de los dos grupos acilo, aún en el caso de corresponder al mismo ácido graso.

La señal a campos altos (173.9 ppm) es asignada tentativamente al carbono carboxílico unido a la posición *sn*-2 del glicerol, ya que esta cadena es la que experimenta un mayor número de interacciones estéricas.

Una no-equivalencia similar se observa en las señales del carbono vecino al carboxílico en la cadena de ácido graso, aunque esta diferencia (0.1 ppm) es menor que en el caso de los carbonos carboxílicos.

La primera asignación total de un espectro de un monogalactosildiglicérido fue la del 1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-3-β-D-galactosil-*sn*-glicerol, efectuada por Johns y colaboradores [156].

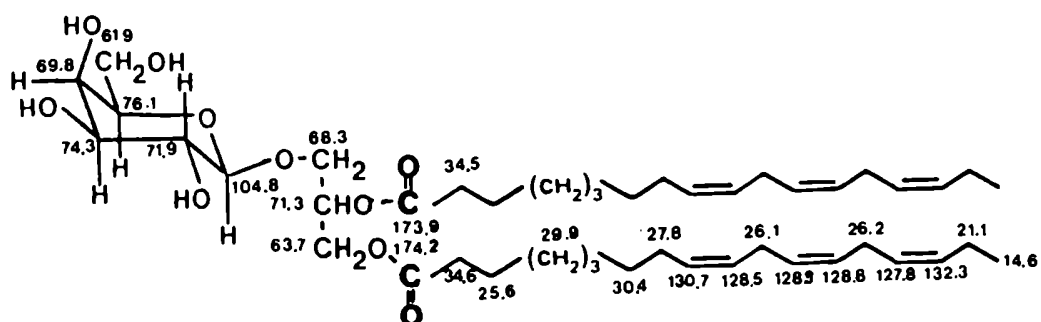


Fig. 43: Asignaciones en RMN-¹³C de monogalactosildiglicérido.

En el caso de los digalactosildiglicéridos, se observa también una diferencia de 0.4 ppm en los desplazamientos de los carbonos carboxílicos lo cual indicaría también una no-equivalencia de las cadenas de ácido graso. Las demás señales corresponden a lo observado en los espectros descritos anteriormente.

En el caso de 1,2-di-O-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil]-3-O-digalactosil-*sn*-glicerol, corresponderían las siguientes asignaciones:

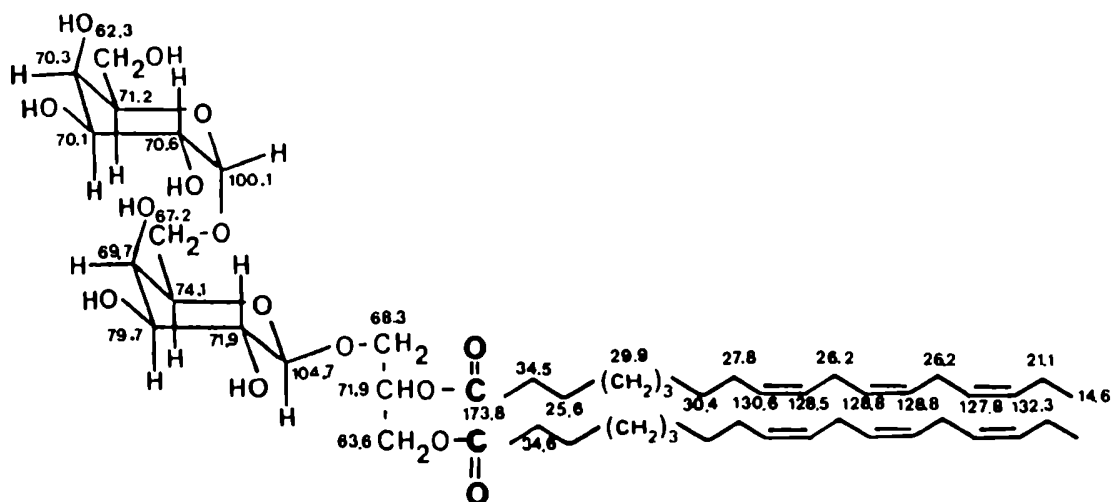


Fig. 44: Asignaciones en RMN-¹³C de un digalactosildiglicérido.

Johns y colaboradores [156] observaron asimismo que los desplazamientos de los carbonos correspondientes al glicerol y a la porción de hidratos de carbono de la molécula eran los mismos

independientemente de los ácidos grasos sustituyentes en las posiciones *sn-1* y *sn-2* del glicerol.

El cambio de solvente produce un ensanchamiento de las señales. En el caso de CDCl_3 , las señales son notoriamente mas anchas que en CD_3OD . En el caso de los digalactosildiglicéridos, al realizar los espectros en D_2O los ensanchamientos son aún mayores. Esto indicaría que ciertas porciones de la molécula (la porción de hidratos de carbono y el glicerol) presentan restricciones de movimiento, lo cual estaría revelando propiedades de la estructura secundaria, de micela invertida, de la molécula. Esto surge claramente de los valores de los tiempos de relajación de estos carbonos [156].

	<u>MGDG(CD_3OD)</u>	<u>MGDG(CDCl_3)</u>	<u>DGDG(CD_3OD)</u>	<u>DGDG(CDCl_3)</u>	<u>DGDG(D_2O)</u>
$T_1(\text{s})$	0.30 _± 0.03	0.04-0.05	0.15-0.20	0.03-0.04	c. 0.06
$\nu\%(\text{Hz})$	c. 3	c. 9	c. 5	c. 20	18 - 40

MGDG: monogalactosildiglicéridos.

DGDG: digalactosildiglicéridos.

Tabla 2: Tiempos de relajación y anchos medios de banda en espectros $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de galactolípidos realizados en distintos solventes.

La comparación de los valores indicados en la tabla anterior, indica la ventaja de realizar los espectros de galactosildiglicéridos en CD_3OD . En el caso de galactosildiglicéridos peracetilados el ancho de las señales disminuye notablemente, incluso en espectros realizados en CDCl_3 .

**DESCRIPCION DE LA
LABOR REALIZADA**

El procedimiento de extracción del material vegetal, y el procesamiento posterior de los extractos crudos fue similar en las tres especies estudiadas (ver parte experimental).

FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

El fraccionamiento de estos extractos, se efectuó por la técnica de cromatografía "flash" en columna seca ("dry column flash chromatography")[160] (ver parte experimental).

Esta técnica permite un fraccionamiento rápido y efectivo de extractos y mezclas complejas y es utilizable incluso para realizar separaciones cromatográficas de compuestos cuyas diferencias en r.f. sean hasta de 0.2.

Se colectaron las siguientes fracciones:

<u>FRACCION</u>	<u>SOLVENTE</u>
1	éter de petróleo
2	éter de petróleo / acetato de etilo (99:1)
3	éter de petróleo / acetato de etilo (95:5)
4	éter de petróleo / acetato de etilo (90:10)
5	éter de petróleo / acetato de etilo (80:20)
6	éter de petróleo / acetato de etilo (70:30)
7	éter de petróleo / acetato de etilo (60:40)
8	éter de petróleo / acetato de etilo (50:50)
9	acetato de etilo / éter de petróleo (60:40)
10	acetato de etilo / éter de petróleo (70:30)
11	acetato de etilo / éter de petróleo (80:20)

- | | |
|----|---|
| 12 | acetato de etilo / éter de petróleo (90:10) |
| 13 | acetato de etilo |
| 14 | acetato de etilo / metanol (90:10) |
| 15 | metanol |

En este capítulo se describirá el trabajo realizado y los compuestos obtenidos en cada fracción, en forma paralela para las tres especies estudiadas.

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN 1

Esta fracción, eluida con éter de petróleo, presentaba una coloración roja intensa, debida a la presencia de compuestos carotenoides. El análisis por c.c.d. reveló el mismo perfil cromatográfico en las tres especies estudiadas.

Por cromatografía "flash" en columna de silicagel, se obtuvieron tres subfracciones: 1a, 1b y 1c.

Subfracción 1a : Se obtuvo como un sólido blanco y amorfo. Por c.c.d. de sílica se observó una mancha cuyo r.f. coincidía con el frente del solvente, aún con ciclohexano y reveló de color marrón con H₂SO₄ 50%. El análisis de sus espectros IR y RMN-¹H, indicó la presencia de hidrocarburos lineales saturados. El análisis por CGL y CGL-EH, reveló la presencia de un compuesto prácticamente puro (I), el cual fue identificado como n-heptadecano por comparación contra compuestos patrón.

En el análisis por CGL-EM de estas subfracciones también se detectaron trazas de n-pentadecano y azufre en las tres especies estudiadas.

Subfracción 1b: Presentó el aspecto de un aceite incoloro, de olor característico. Por c.c.d. de sílica se observó una sola mancha que reveló de color marrón violáceo con H₂SO₄ 50%. El análisis por CGL de la misma indicó la presencia de un único compuesto (II), cuyo espectro IR era característico de un hidrocarburo insaturado, con dobles enlaces no conjugados.

El espectro RMN-¹H indicó la presencia de dobles enlaces (5.10 ppm, señal ancha) y de grupos metilo unidos a dobles enlaces, típico para una estructura isoprénica acíclica.

El espectro de masa del compuesto II presentó un ion molecular M⁺: 410 (12%) y sucesivas pérdidas de 69 u.m.a.: m/z 341 (M⁺-69, 7%); m/z 272 (m/z 341-69, 15%); m/z 203 (m/z 272-69, 21%); m/z 69 (100 %). Estos datos permitieron confirmar la presencia de una estructura triterpénica lineal de fórmula molecular C₃₀H₅₀, con seis insaturaciones.

La comparación de los datos obtenidos de los espectros RMN-¹H, RMN-¹³C y EM con datos de literatura permitieron identificar el compuesto II como escualeno, lo cual fue confirmado por comparación de su t.r. en CGL con el de un compuesto patrón.

Subfracción 1c: Presentó cristales de un color rojo intenso. El análisis por c.c.d. de sílica mostró una mancha de color rojo intenso, la cual reveló de color azul con H₂SO₄ 50 % en frío.

que el compuesto III presentaba grupos terminales del tipo β) y por lo tanto fue identificado como β,β -caroteno.

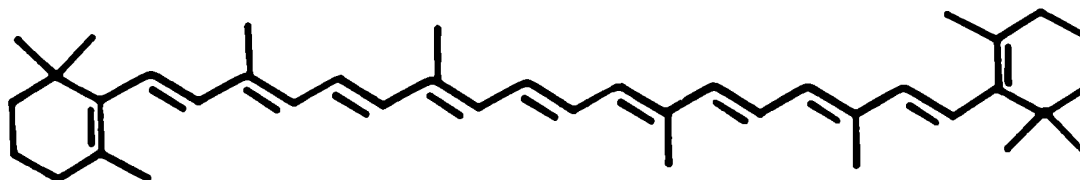


Fig. 46: Compuesto III: β,β -caroteno.

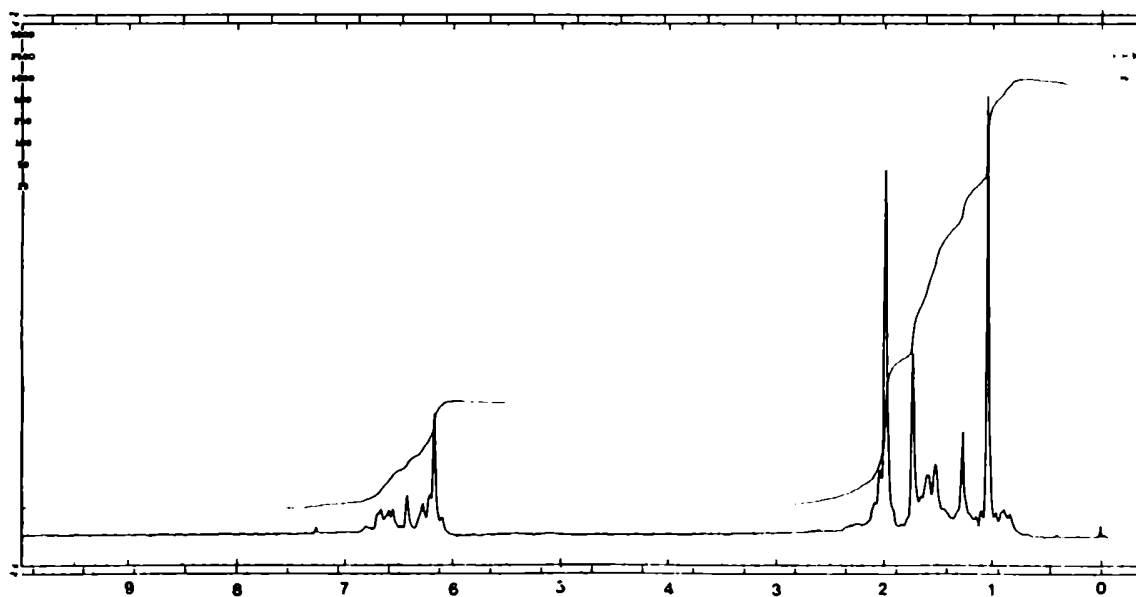


Fig. 47: Espectro RMN- ^1H del compuesto III (β,β -caroteno).

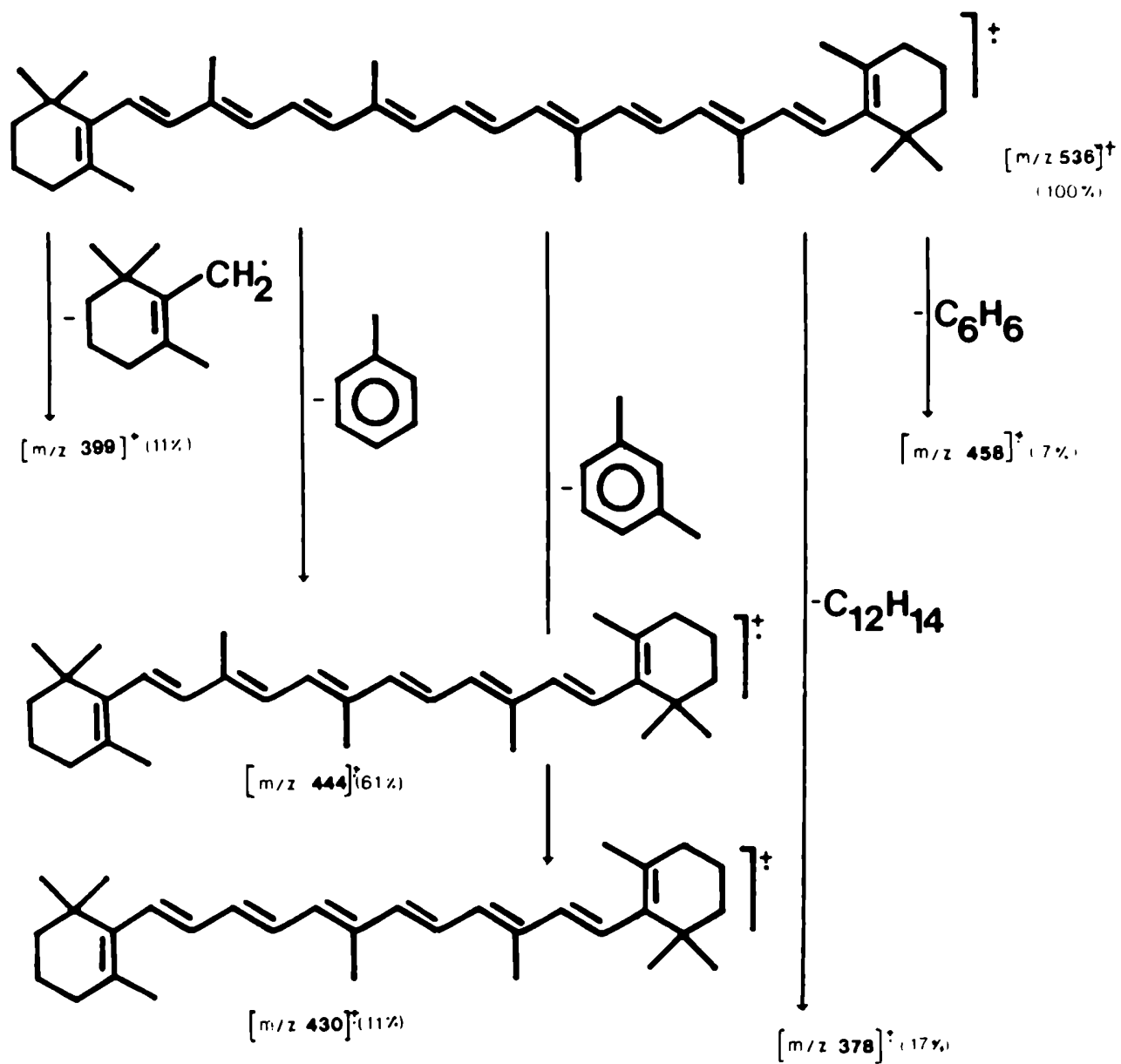


Fig. 48: Fragmentaciones del EM del compuesto III.

FRACCIONES 2 Y 3:

Estas fracciones fueron eluidas con éter de petróleo/acetato de etilo (99:1) y (95:5), respectivamente.

El análisis por c.c.d. y comparación con patrones indicó que ambas fracciones estaban compuestas por ceras en las tres especies y no interesó estudiarlas para el presente trabajo.

ANALISIS DE LA FRACCION 4:

Esta fracción fue eluida con éter de petróleo/acetato de etilo (90:10). El análisis por c.c.d. indicó que estaba constituida principalmente por ceras, pero además se detectó una mancha de menor r.f., la cual reveló de color gris oscuro con H₂SO₄ 50%. Este perfil cromatográfico de la fracción 4 se observó en las tres especies de algas estudiadas.

Por cromatografía en columna de silicagel H de la fracción 4 se obtuvieron dos subfracciones: 4a y 4b. La subfracción 4a estaba compuesta por ceras y no fue estudiada.

La subfracción 4b era un aceite amarillento, cuyo espectro RMN-¹H presentaba las siguientes características:

- una señal ancha centrada a 5.3 ppm y otra centrada a 2.8 ppm. Dichas señales indicaban la presencia de dobles enlaces separados por grupos metileno.
- un cuarteto centrado a 4.15 ppm (J = 7 Hz), indicativo de la presencia de un grupo etoxilo.
- un triplete ancho a 2.08 ppm (J = 7 Hz), indicativo de un grupo -CH₂-CH=CH₂-COOR.

El espectro IR de la subfracción 4b, presentó una banda característica a $\bar{\nu}$: 1730 cm^{-1} , indicativa de un grupo éster y las bandas correspondientes a dobles enlaces no conjugados.

El análisis por CGL-EM de la subfracción 4b, reveló la presencia de un compuesto mayoritario (IV), cuyo espectro de masa era similar al de un éster del ácido eicosapentaenoico (EPA) ($\text{C}_{20:5}$, ω -3). El ion M^+ : 330, permitió identificar el compuesto IV como eicosapentanoato de etilo. Este compuesto, se descomponía rápidamente aún conservado a bajas temperaturas, transformándose en un jarabe amarillo.



Fig. 49: Compuesto IV.

ANALISIS DE LA FRACCION 5:

Esta fracción fue eluida con éter de petróleo/acetato de etilo (80:20) y el análisis por c.c.d. de la misma indicó la presencia de dos manchas principales. La de mayor r.f., reveló de color marrón rojizo con H_2SO_4 50% y la de menor r.f., por sus características (forma de uña que se redondeaba al agregar

una gota de ácido acético al solvente de desarrollo) y por comparación con testigos pareció corresponder a una mezcla de ácidos grasos.

Este perfil cromatográfico de la fracción 5 se encontró en las tres algas estudiadas. Por cromatografía en columna de silicagel H, se separaron dos subfracciones: 5a y 5b.

Subfracción 5a: Fue purificada por cromatografía en columna de silicagel H, aislándose el producto principal (compuesto V), como un aceite incoloro. Los compuestos minoritarios de esta subfracción se encontraban en cantidades demasiado pequeñas como para proceder a su identificación.

El espectro IR del compuesto V, indicó la presencia de un alcohol primario (bandas a $\bar{\nu}$: 3500 y 1020 cm^{-1}) con dobles enlaces no conjugados.

El espectro RMN- ^1H de este compuesto, indicó la presencia de un grupo hidroximetileno alílico (4.15 ppm, d, 2H, J: 7 Hz) y un grupo metilo en posición vinílica a doble enlace (1.68 ppm, s, 3H).

El espectro de masa indicó un ion M^+ :294. Este ion podía corresponder a una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}$ característica de un alcohol diterpénico. Por comparación con datos de literatura, el compuesto V fue identificado como *trans*-fitol.

Una de las principales diferencias espectroscópicas entre el *cis*- y *trans*- fitol, es el desplazamiento químico en RMN- ^1H de las señales correspondientes al grupo hidroximetileno alílico. Este grupo aparece como un doblete a 4.15 ppm (J: 7 Hz) en el caso del isómero *trans* y a 4.45 ppm (J: 7 Hz) en el caso del isómero *cis* [161].

En el caso del compuesto V, los espectros tanto RMN-¹H como RMN-¹³C indicaron únicamente la presencia del isómero *trans*.

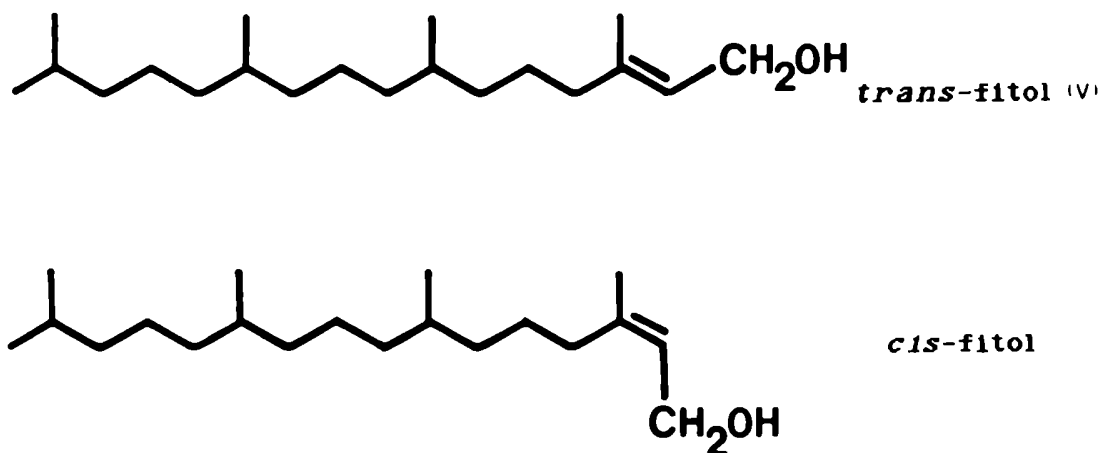


Fig. 50: *cis*- y *trans*-fitol.

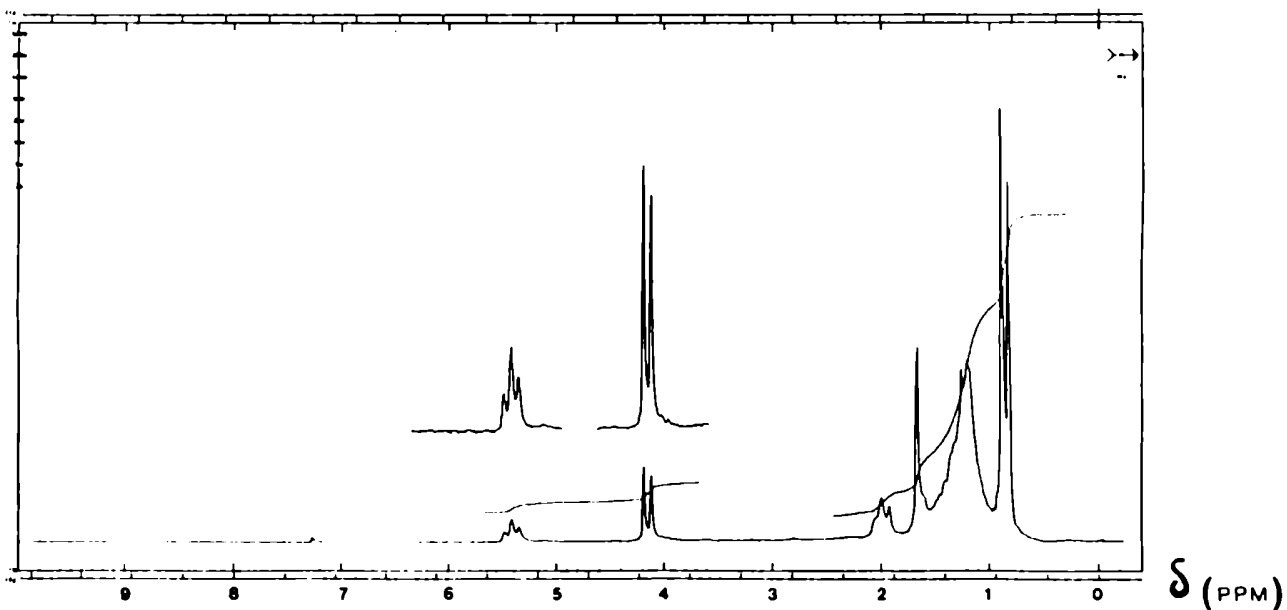


Fig. 51: Espectro RMN-¹H del compuesto V (*trans*-fitol).

Subfracción 5b: Su análisis indicó que estaba constituida por ácidos grasos libres, los cuales fueron analizados conjuntamente con los de las fracciones 6, 7 y 8.

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN 6

Esta fracción fue eluida con éter de petróleo/acetato de etilo (70:30) y el análisis por c.c.d. y comparación con compuestos patrón indicó que estaba constituida por esteroides, ácidos grasos libres y clorofilas.

Se efectuó el subfraccionamiento por cromatografía "flash" en columna de silicagel, obteniéndose las mezclas crudas de ácidos grasos libres y de esteroides.

Análisis de los ácidos grasos libres:

Los ácidos grasos libres de la subfracción 5b y los aislados de las fracciones 6, 7 y 8 fueron reunidos en una fracción de ácidos grasos libres totales. Una alícuota de esta fracción fue metilada con CH_2N_2 , según la técnica descrita en la Parte Experimental. La mezcla de ésteres metílicos fue analizada por CGL y comparada con testigos de ácidos grasos saturados e insaturados.

El perfil cromatográfico observado en CGL fue similar para las tres especies estudiadas.

<u>Acido graso</u>	<u>% C. officinalis</u>	<u>% C. elongata</u>	<u>% Jania sp.</u>
C _{16:0}	61.2	64.6	59.1
C _{18:1}	14.3	15.1	16.3
C _{20:5ω-3}	7.0	7.3	6.8
C _{20:4ω-6}	5.9	6.0	6.8
C _{16:1}	5.1	3.1	3.2
C _{18:0}	3.3	2.0	3.1
C _{14:0}	2.6	1.1	2.8
C _{15:0}	0.6	0.8	0.9

Tabla 3 : Distribución de ácidos grasos libres en las tres especies estudiadas.

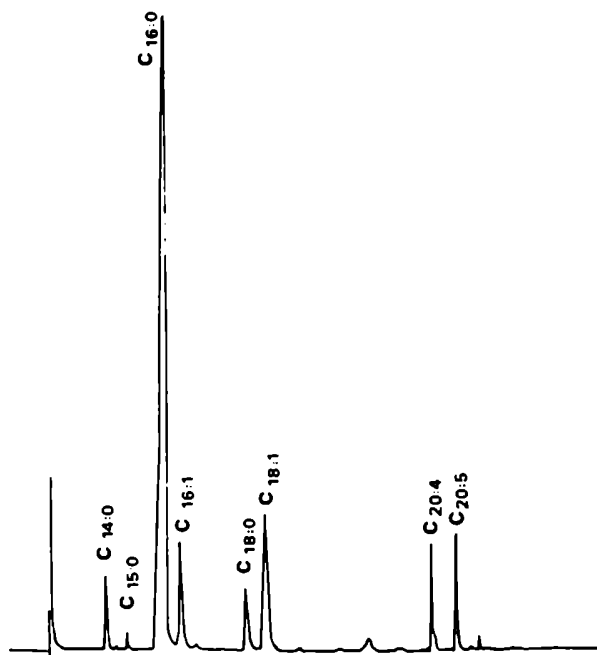


Fig. 52: CGL de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres de *Jania sp.*
columna capilar SP-2340
temp: 160 → 235 °C; 10 °C/min

Análisis de la mezcla de esteroides libres:

Los esteroides libres, aislados de las fracciones 6, 7 y 8 fueron reunidos como fracción de esteroides libres totales, ya que por c.c.d. no se observaban diferencias entre ellos y por lo tanto fueron estudiados en conjunto.

El análisis por CGL de las mezclas esteroidales indicó un mismo perfil cromatográfico para las tres especies estudiadas. En los tres casos se detectó la presencia de colesterol (VI) como componente mayoritario, en porcentajes superiores al 90 % y la presencia de los mismos componentes minoritarios en las tres especies, en porcentajes menores al 2 %.

Las mezclas crudas de esteroides fueron fraccionadas en los tres casos por CLAR, utilizando columnas de fase reversa Rp-18, y metanol como eluyente. En algunos casos se utilizó una mezcla ternaria : acetonitrilo/acetato de etilo/metanol (2:2:1), para favorecer la disolución de los esteroides en el solvente de inyección.

De acuerdo al cromatograma obtenido por CLAR, similar en los tres casos, se colectaron 7 fracciones: A,B,C,D,E,F y G. El análisis por c.c.d. de estas fracciones indicó que las fracciones A y G eran mezclas muy complejas que no contenían esteroides y dado que la cantidad aislada era muy pequeña, no se procedió a su análisis.

El análisis por CGL de la fracción E (mayoritaria) permitió comprobar que estaba compuesta sólo por colesterol (VI), identificado por sus espectros RMN-¹H y EM.

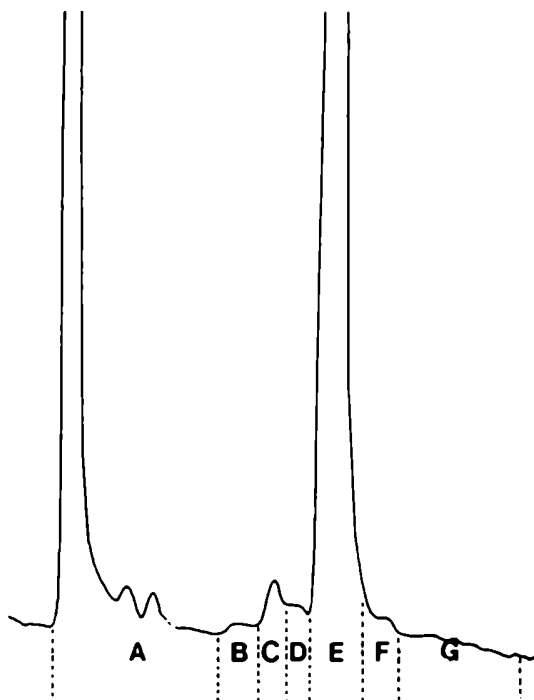


Fig. 53: CLAR de las mezclas crudas de esteroides de las tres especies estudiadas, y las fracciones colectadas.
 col.: Alltech R Sil C-18
 500 mm x 10 mm; sv: MeOH;
 8 ml/min

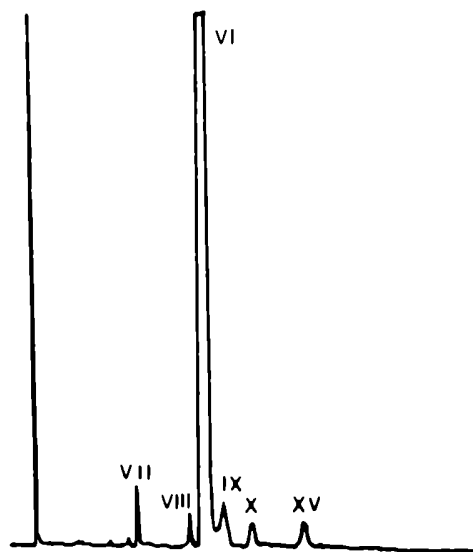


Fig. 54: CGL de la mezcla cruda de esteroides libres de *C. officinalis*, similar al obtenido de *C. elongata* y *Jania Sp.* Columna capilar HP-5; isotérmica, T: 260 °C

Los componentes de las restantes fracciones fueron caracterizados por EM y comparación de sus t.r.r. (relativos al colesterol) en CGL con los de patrones auténticos.

Análisis de la fracción B:

El componente principal de la fracción B, compuesto VII, presentó en EM un ion M^+ 370 y los iones m/z 355 (M^+-CH_3), m/z 352 (M^+-H_2O). Además de ellos, los iones m/z 300, m/z 273, m/z 271 y m/z 255, fueron indicativos de un esteroil con núcleo insaturado en posición 5 [162], y cadena lateral insaturada (Δ^{22}) [163,164]. Los datos reunidos permitieron identificar el compuesto VII como 24-nor-22-trans-colesta-5,22-dien-3 β -ol.

Los componentes minoritarios de esta fracción fueron analizados en las fracciones siguientes.

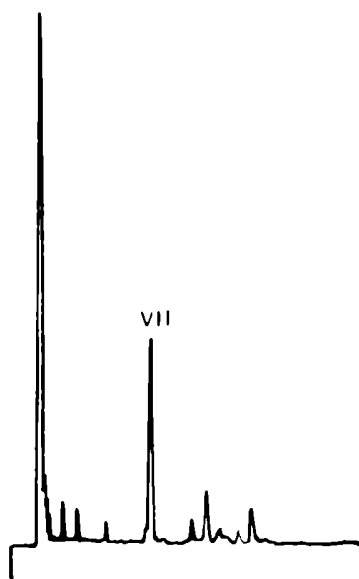


Fig. 55: CGL de la fracción B.
condiciones: ver Fig. 54 (pág. 78)

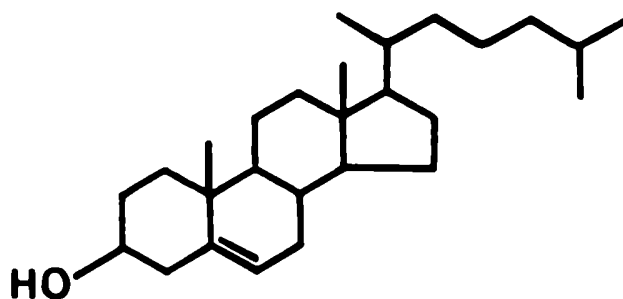


Fig. 56: Compuesto VI.

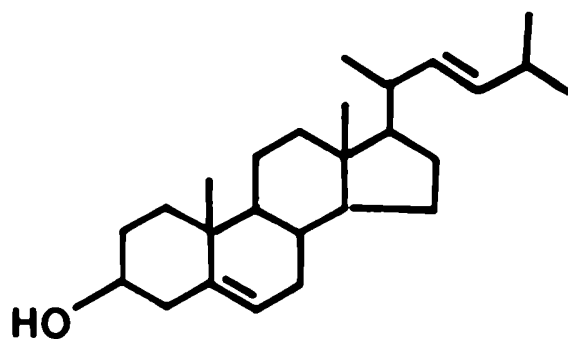


Fig. 57: compuesto VII.

Análisis de la fracción C:

El análisis por CGL de esta fracción permitió detectar cuatro componentes mayoritarios, de t.r.r. (relat. colesterol), 0.71, 0.93, 1.08, y 1.23 respectivamente.

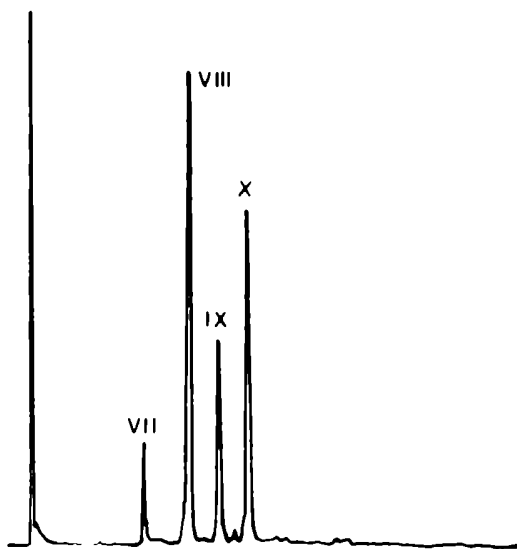


Fig. 58: CGL de la fracción C.
condiciones: ver Fig. 54, pág. 78

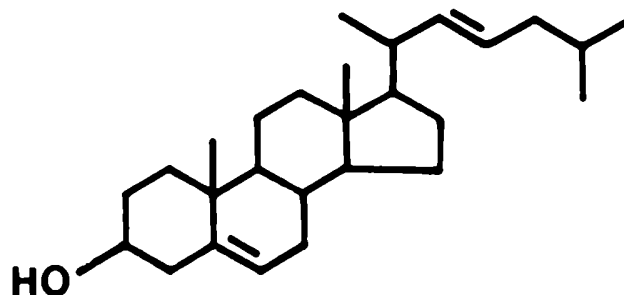


Fig. 59: Compuesto VIII.

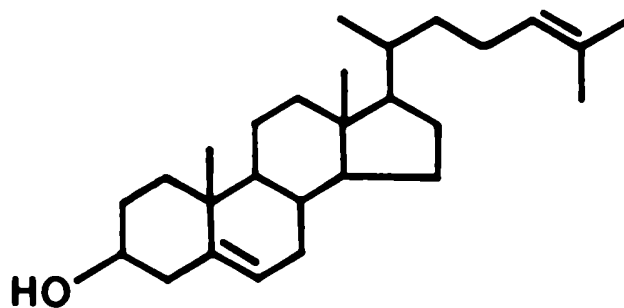


Fig. 60: Compuesto IX.

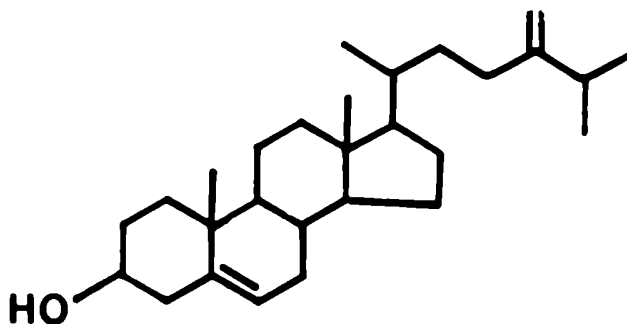


Fig. 61: Compuesto X.

El compuesto de menor t.r.r. fue identificado como VII por CGL-EM y el de t.r.r. 0.93 fue identificado como 22-*trans*-colesta-5,22-dien-3- β -ol (VIII) (22-dehidrocolesterol) por el mismo método.

El EM de este compuesto presentó los iones m/z 384 (M^+), m/z 369 ($M^+ - CH_3$), m/z 366 ($M^+ - H_2O$), m/z 351 ($M^+ - CH_3 - H_2O$). Además se observaban los iones m/z 300 y m/z 255, indicativos de un núcleo esteroideal insaturado en posición 5, y una cadena lateral insaturada en C-22 o C-24. En particular la baja abundancia del ion m/z 271, permitió descartar la posibilidad de un doble enlace en posición 24 [165].

El EM del compuesto de t.r.r. 1.08 permitió identificarlo como colest-5,24-dien-3- β -ol (IX) (desmosterol). En este caso, además del ion M^+ 384, la presencia del ion m/z 271 como pico base del espectro resultó concluyente para asignar una estructura con doble enlace en posición 24 [165].

El compuesto de mayor t.r.r. de esta fracción fue identificado por CGL-EM como 24-metil-colest-5,24(28)-dien-3- β -ol (24-metilencolesterol) (X). En este caso, los iones m/z 398 (M^+), m/z 314 (100%) y m/z 271, resultaron claves para la asignación de la estructura. En particular, el ion m/z 314 pico base del espectro permitió asignar el doble enlace en posición 24(28) [166].

Análisis de la fracción D:

Esta fracción estaba compuesta por un producto principal, colesterol (VI), y tres compuestos minoritarios, entre los que se identificaron por CGL-EM los compuestos VIII, X y uno de t.r.r. 1.16, el cual fue caracterizado como 22-*trans*-24-metilcolest-5,22-dien-3- β -ol (XI) (brassicasterol) [162].

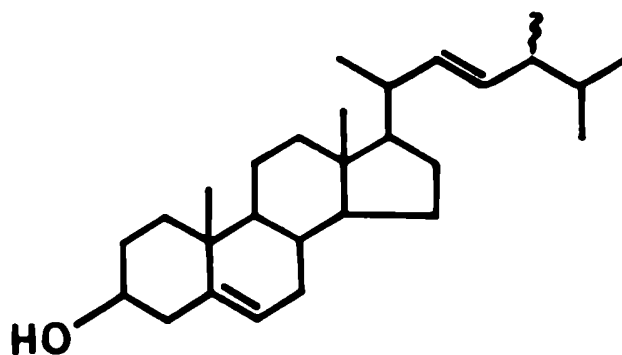
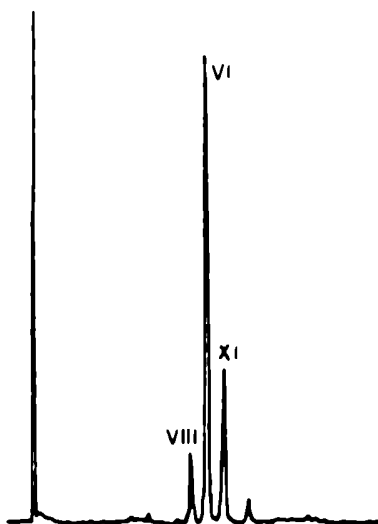


Fig. 63: Compuesto XI

Fig. 62: CGL de la fracción D.
condiciones: ver Fig. 54, pág. 78

Análisis de la fracción F:

Esta fracción estaba constituida por más de un 90 % de colesterol (VI), y otros componentes en muy baja proporción. Se subfraccionó por CLAR, utilizando una columna Rp-18 de alta resolución (Altex Ultrasphere), obteniéndose dos subfracciones: **F1** y **F2**.

La subfracción **F1** estaba constituida por colesterol (VI) y en la subfracción **F2** se pudieron identificar por CGL-EM los siguientes compuestos:

- | | | |
|--|----------------|--------|
| 24ξ-metilcolest-5-en-3-β-ol | (campesterol) | (XII) |
| 24ξ-metil-5α-colestan-3-β-ol | (campestanol) | (XIII) |
| 24-trans-24-etilcolesta-5,24(28)-dien-3-β-ol | (fucosterol) | (XIV) |
| 24ξ-etilcolest-5-en-3-β-ol | (β-sitosterol) | (XV) |

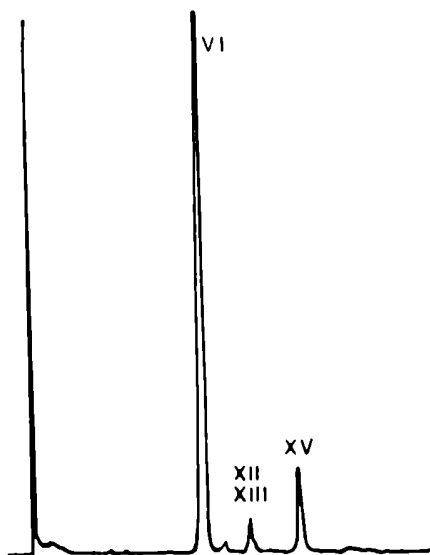


Fig. 64: CGL de la fracción **F**
condiciones: ver Fig. 54, pág. 78

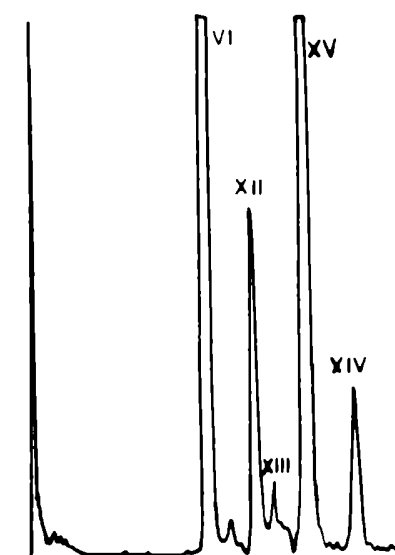


Fig. 65: CGL de la fracción **F2**.

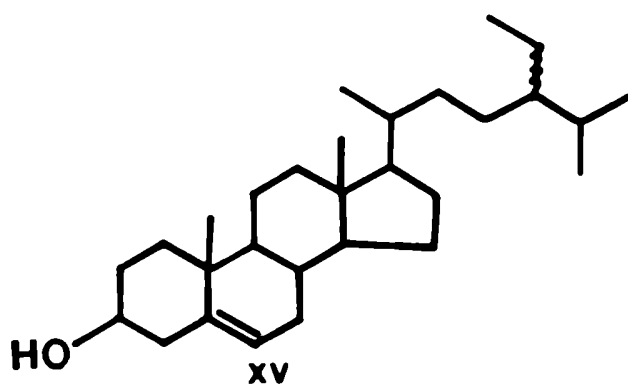
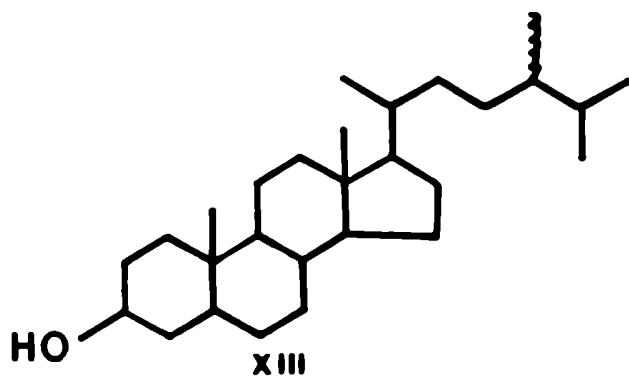
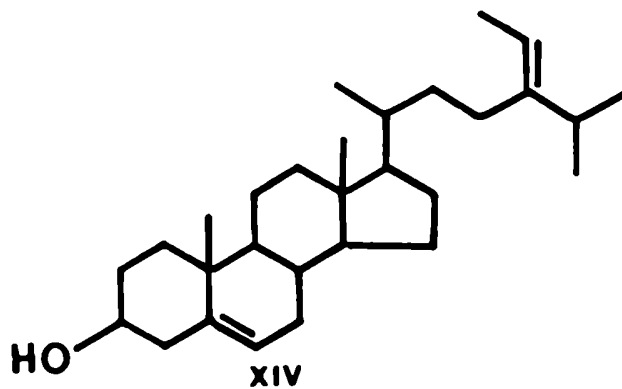
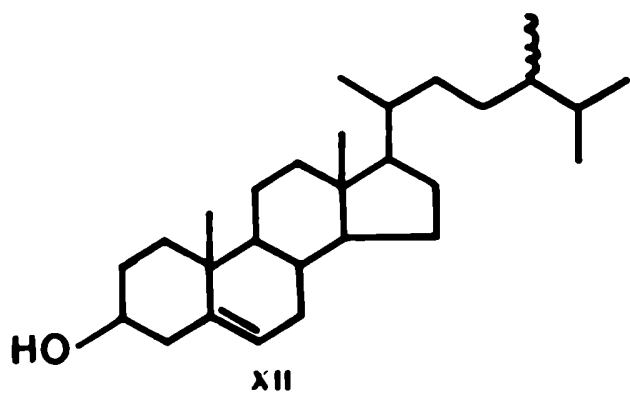


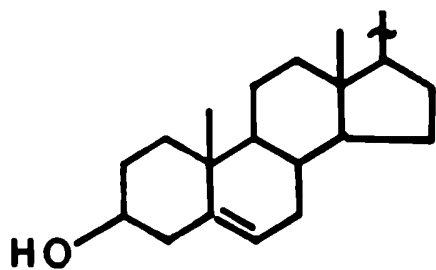
Fig. 66: Compuestos XII, XIII, XIV y XV.

El EM del compuesto XII presentó un ion molecular M^+ 400 como pico base del espectro, pérdidas de CH_3 y H_2O (m/z 385 y m/z 382 respectivamente) y fragmentaciones características de esteroides con cadena lateral saturada (m/z 315, m/z 273, m/z 255 y m/z 231) [162].

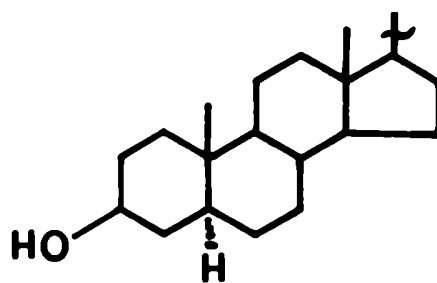
El EM del compuesto XIII presentó M^+ 402 y la pérdida de CH_3 (m/z 387). La presencia de los iones m/z 275, m/z 233 y m/z 234 y la ausencia de pérdida de agua a partir del M^+ permitió caracterizarlo como un estanol [162]. El compuesto XIII es el único estanol detectado en las tres especies estudiadas.

El compuesto XIV presente a nivel de trazas, mostró en su EM, además de M^+ 412, las fragmentaciones características de esteroides con doble enlace 24(28): m/z 314 (100 %), m/z 296, m/z 271 [166].

El compuesto XV, β -sitosterol, fue identificado además de por sus fragmentaciones en EM, por comparación de su t.r.r. en CGL con el de un compuesto patrón. En este caso resultaron de valor diagnóstico los iones M^+ 414, m/z 399, m/z 396, m/z 381 y m/z 303 [162].

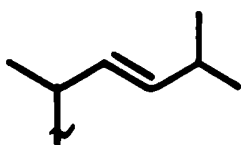


Núcleo 1



Núcleo 2

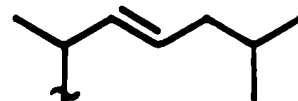
Cadenas laterales:



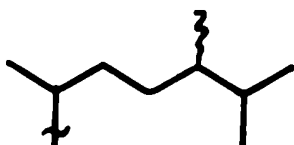
a



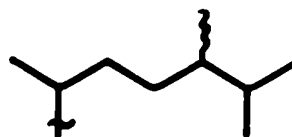
b



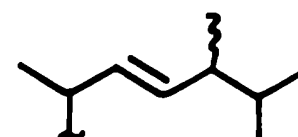
c



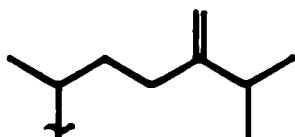
d



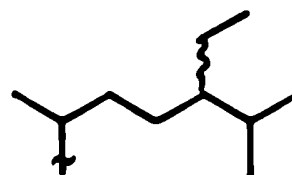
e



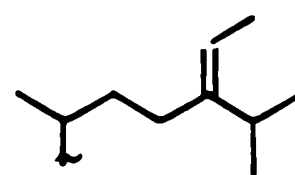
f



g



h



i

	<u>COMPUESTO</u>		t.r.r.	%C.o	%C.e	%J.
VI	colest-5-en-3 β -ol	<u>1b</u>	1.00	95.6	95.3	93.3
IX	colesta-5,24-dien-3 β -ol	<u>1d</u>	1.08	1.0	0.6	1.4
VIII	22- <i>trans</i> -colesta-5,22-dien-3 β -ol	<u>1c</u>	0.93	0.9	0.4	1.0
X	24-metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol	<u>1g</u>	1.23	0.7	0.8	1.3
VII	24- <i>nor</i> -colesta-5,22-dien-3 β -ol	<u>1a</u>	0.71	0.2	0.6	1.0
XV	24- ξ etilcolest-5-en-3 β -ol	<u>1h</u>	1.48	0.5	1.3	0.8
XI	22- <i>trans</i> -24 ξ -metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol	<u>1f</u>	1.16	0.6	0.2	0.3
XII	24- ξ -metilcolest-5-en-3 β -ol	<u>1e</u>	1.22	0.5	0.2	0.3
XIII	24- ξ -metil-5 α -colestan-3 β -ol	<u>2e</u>	1.31	tr.	tr.	tr.
XIV	24- <i>trans</i> -24-etilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol	<u>1i</u>	1.40	tr.	tr.	tr.

t.r.r.: tiempo de retención en CGL relativo al colesterol.

%C.o. : % en *Corallina officinalis*.

%C.e. : % en *Corallina elongata*.

%J. : % en *Jania sp.*

tr. : trazas.

Tabla 4: Composición esteroideal de las especies estudiadas.

ANALISIS DE LA FRACCION 7:

Esta fracción, eluida con éter de petróleo/acetato de etilo (60:40), estaba constituida como la fracción 6, principalmente por ácidos grasos y esteroides que fueron purificados y analizados conjuntamente con los de la fracción anterior.

En el caso de *Corallina officinalis* y *Corallina elongata* se detectaron en los productos aislados de ejemplares obtenidos en ciertas épocas del año, una serie de compuestos fenólicos.

En un extracto de *C. officinalis* recolectada a fines del mes de mayo, se observó por c.c.d. de esta fracción, la presencia de una mancha de r.f. menor que el correspondiente a esteroides y que reveló de color violeta con H_2SO_4 50%. Esta sustancia fue aislada por cromatografía en columna de silicagel H y el análisis por c.c.d. indicó que era una mezcla con uno de sus componentes mayoritario. Tanto este compuesto como varios de los minoritarios revelaron de color violeta con $FeCl_3$ 2% en etanol, indicando una probable estructura fenólica para los mismos.

Por cromatografía en capa preparativa se purificó el componente principal (XVI). El espectro IR de este compuesto indicó una probable estructura de aldehído fenólico p-sustituído. El espectro RMN- 1H del compuesto XVI presentó en la zona de campos bajos el perfil característico de un sistema AA'BB' y un singulete a 9.90 ppm, indicativo de un grupo aldehído.

El espectro de masa de este compuesto permitió confirmar que era p-hidroxibenzaldehído.

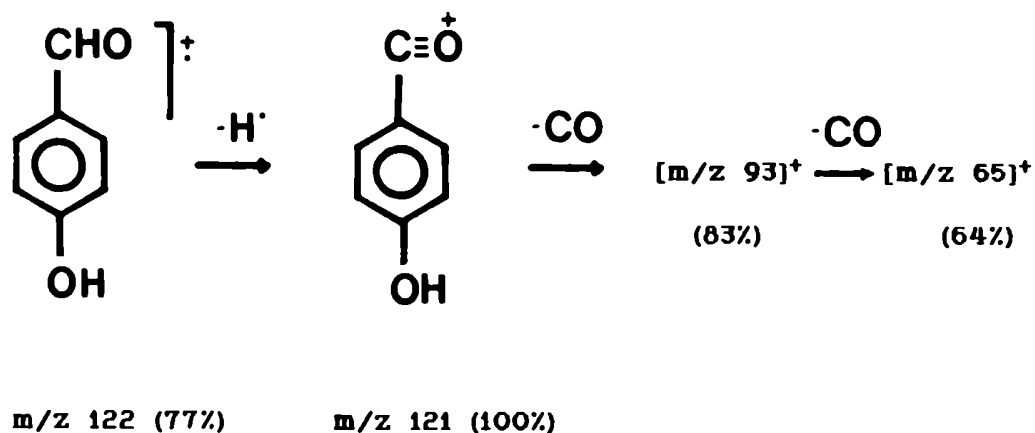
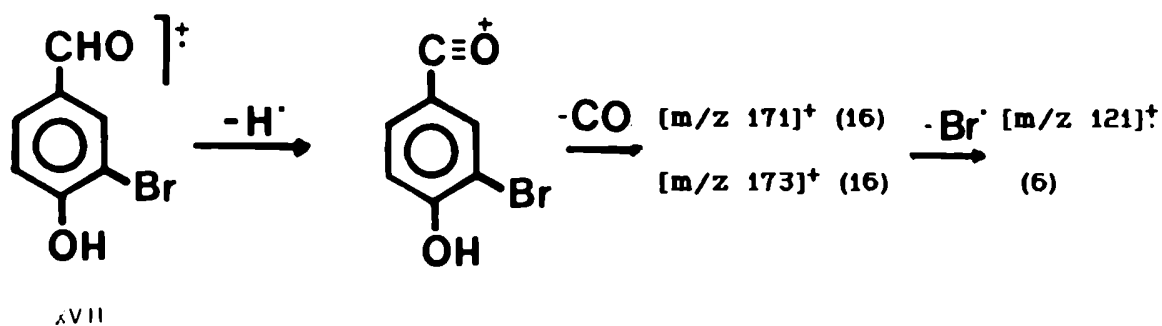


Fig. 67: Espectro de masa del compuesto XVI.

La cromatografía en capa preparativa permitió eluir, además del compuesto XVI, tres bandas, A, B y C que contenían los compuestos fenólicos minoritarios. Dada la baja cantidad obtenida de estas mezclas de compuestos fenólicos y la complejidad de las mismas, tal como se comprobó por CGL, sólo se pudo efectuar el análisis de estos compuestos por CGL-EH.

El análisis por CGL-EH de los compuestos de la banda A, permitió identificar además del compuesto XVI, un derivado halogenado de este último (XVII). El espectro de masa de XVII evidenció la presencia de un átomo de bromo, por la distribución isotópica en la zona del ion molecular. Se observó el ion M^+ 200 (73 %) y su correspondiente ($M^+ + 2$) 202 (68 %). Esta distribución isotópica se observó también en los iones ($M^+ - 1$), [m/z 199 (99 %) y m/z 201 (100 %)] y en los iones ($M^+ - 29$), [m/z 171 (16 %) y m/z 173 (16 %)], los cuales eran indicativos de una estructura de aldehído fenólico bromado. Se observó además el ion m/z 121 (6 %), correspondiente a la pérdida de Br·, característico de compuestos fenólicos de siete átomos de carbono.

La presencia del ion m/z 92 (17 %) fue indicativa de un compuesto fenólico disustituído, lo cual permitió asegurar que el bromo se encontraba directamente unido al anillo aromático. No fue posible determinar con los datos del espectro de masa las posiciones relativas de los tres sustituyentes en el anillo aromático. Sobre la base de consideraciones biosintéticas [167,168], se ubicaron el grupo hidroxilo y el grupo aldehído en posiciones 1 y 4 respectivamente, teniendo en cuenta que se había identificado *p*-hidroxibenzaldehído en la misma fracción. El átomo de bromo fue asignado en posición 3, teniendo en cuenta que en todos los C-7 fenoles halogenados de origen marino informados hasta el momento, el átomo de halógeno se encuentra en esta posición [47]. Por lo tanto sobre la base de estos datos, se identificó tentativamente al compuesto XVII como 3-bromo-4-hidroxibenzaldehído



m/z 200 (73)

m/z 199 (99)

m/z 202 (68)

m/z 201 (100)

Fig. 68: Espectro de masa del compuesto XVII.

El análisis por CGL-EM de los compuestos de la banda C permitió detectar, además del compuesto XVIII, otros dos productos fenólicos que fueron identificados como ácido p-hidroxifenilgloxílico (XIX) y ácido p-hidroxifenilpirúvico (XX).

Las fragmentaciones observadas en el EM del compuesto XIX, permitieron caracterizarlo como un ácido hidroxifenilgloxílico. Asimismo, el espectro EM del compuesto XX, permitió caracterizarlo como un ácido hidroxifenilpirúvico. La asignación del grupo hidroxilo en posición *para*, se debe a que ha sido demostrado que estos compuestos son intermediarios en la biosíntesis de p-hidroxibenzaldehído a partir de tirosina [167] (ver cap. discusión).

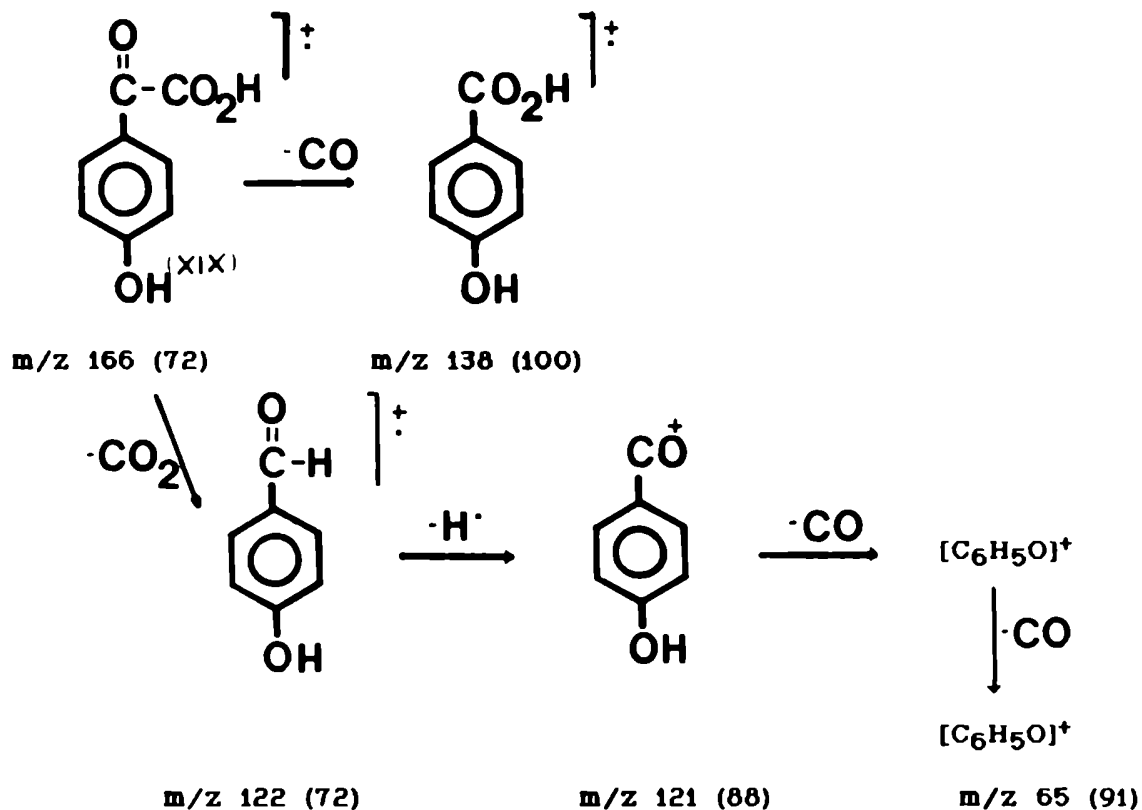


Fig. 70: Espectro de masa del compuesto XIX.

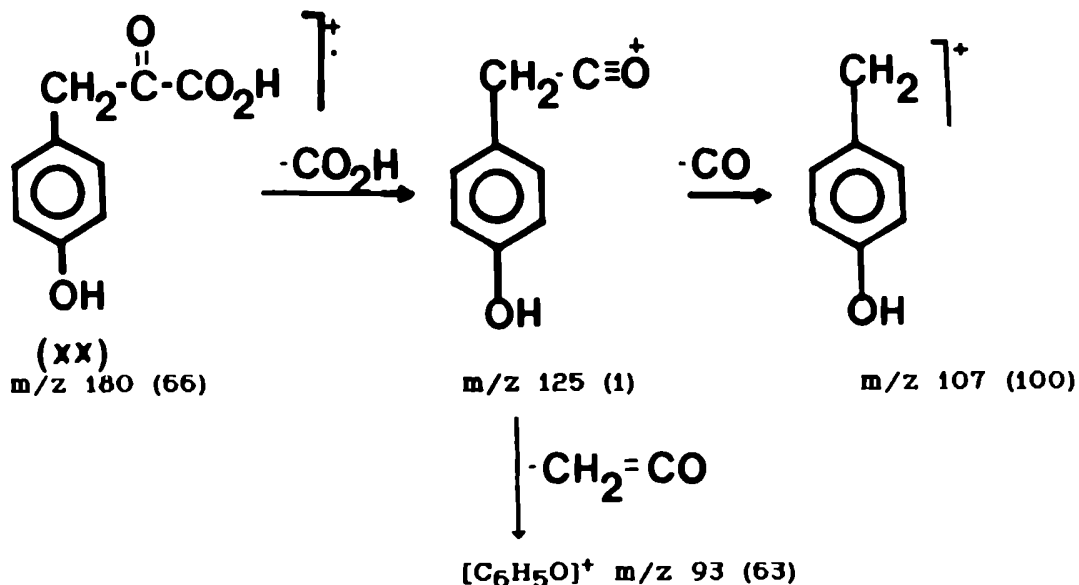


Fig. 71: Espectro de masa del compuesto XX.

En extractos de *C. officinalis* colectadas durante otras épocas del año se observó una variación en el contenido de compuestos fenólicos. En plantas colectadas en el mes de marzo sólo se detectó el compuesto XVI como único derivado fenólico, mientras que en el mes de diciembre, XVI estaba presente a nivel de trazas.

En el caso de *C. elongata*, en el extracto de una cosecha efectuada en el mes de abril, se pudo identificar el compuesto XVI y trazas del compuesto XVII, mientras que en extractos de material colectado en el mes de marzo solo se pudieron detectar trazas del compuesto XVI.

En el caso de *Jania sp.* el material vegetal fue recolectado en el mes de diciembre y no se detectaron compuestos fenólicos. Estos resultados parecerían sugerir una variación estacional en la producción de compuestos fenólicos (ver cap. discusión).

ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN 8:

El análisis por c.c.d. de la fracción 8, eluida con éter de petróleo/acetato de etilo (50:50), indicó la presencia de clorofilas, trazas de ácidos grasos, esteroides y un compuesto de color anaranjado, que reveló de color violeta con H₂SO₄ 50 %.

La purificación de esta fracción por cromatografía en columna de silicagel H, permitió obtener una fracción enriquecida en carotenoides. Los ácidos grasos y esteroides fueron analizados conjuntamente con los obtenidos en las fracciones anteriores.

La separación de carotenoides y clorofilas resultó sumamente difícil de efectuar por cromatografía en columna de sílica. Teniendo en cuenta la labilidad de ciertos carotenoides se intentó la purificación mediante la técnica de permeación por geles de Sephadex LH-20, utilizando metanol como solvente. La separación de las bandas conteniendo los distintos componentes se efectuó teniendo en cuenta la coloración característica de los mismos y luego de sucesivas permeaciones fueron eliminadas totalmente las clorofilas.

La purificación final de esta fracción se llevó a cabo por CLAR obteniéndose un carotenoide puro XXI, identificado como zeaxantina. Este compuesto se detectó en las tres especies estudiadas.

Su espectro RMN-¹H presentó las siguientes características:

- tres singuletes a campos altos, debidos a los grupos metilo, lo cual indicaba una estructura de carotenoide simétrico.

- señal ancha centrada a 4.01 ppm, que integraba para dos hidrógenos, indicando la presencia posible de dos grupos 3-β-hidroxilo.
- ausencia de señales entre 5 y 6 ppm, lo cual permitió descartar la presencia de dobles enlaces en posición 4.
- singulete a 1.74 ppm, que integraba para seis hidrógenos, que podría corresponder a metilos unidos a dobles enlaces en posición 5.
- el conjunto de señales a campos bajos era similar a las del β,β-caroteno, lo cual indicaba la presencia de una cadena poliénica *todo-trans* [99].

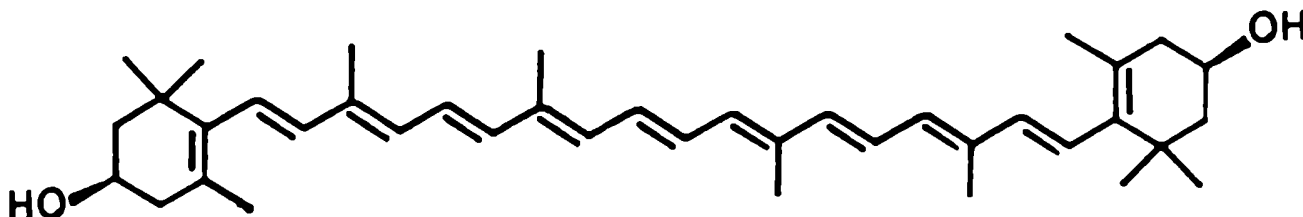


Fig. 72: Compuesto XXI (zeaxantina).

El EM mostró muy pocas fragmentaciones relevantes. Tanto el ion molecular (M^+ 568) como los iones M^+-92 (m/z 476) y M^+-106 (m/z 462) eran de baja abundancia. Se observó la presencia de un ion m/z 550, correspondiente a la pérdida de H_2O .

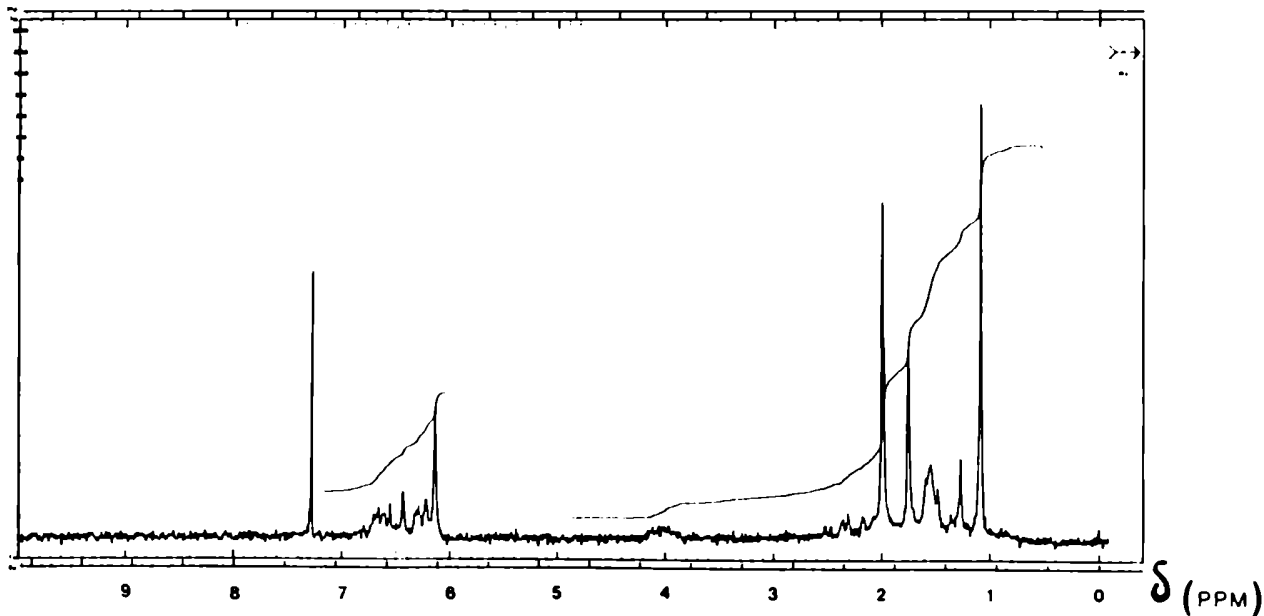


Fig. 73: Espectro RMN-¹H del compuesto XXI.

ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES 9 Y 10:

Estas fracciones fueron eluidas con éter de petróleo/acetato de etilo (40:60) y (30:70) respectivamente. Dado que el análisis por c.c.d. reveló una composición similar para ambas fracciones, fueron analizadas de manera conjunta. Presentaron además de clorofilas, una serie de carotenoides polares del tipo de las xantinas. Estos compuestos, de coloración roja, amarilla o anaranjada, revelaron de color azul o violáceo con H₂SO₄ 50%.

Dada la labilidad de estos compuestos frente a la sílica, se los purificó por permeación por geles de Sephadex LH-20, de la misma forma que el compuesto XXI.

Las distintas bandas eluidas fueron monitoreadas por c.c.d., comprobándose una buena separación de carotenoides y clorofilas. Se obtuvieron distintas bandas de pigmentos verdes que fueron descartadas, una fracción enriquecida en compuestos que revelaron de color marrón con H₂SO₄ 50% (subfracción 9/10a) y otra enriquecida en carotenoides (subfracción 9/10b).

La purificación final de los componentes de estas subfracciones se realizó por CLAR, utilizando columnas de fase reversa Rp-18. Los compuestos identificados en 9/10a y 9/10b fueron detectados en las tres especies estudiadas, aunque no en las mismas cantidades.

Análisis de la subfracción 9/10a:

Para la purificación de los componentes por CLAR se utilizó una columna de fase reversa Rp-18 y como eluyente MeOH/H₂O (90:10). Se aislaron dos componentes principales XXII y XXIII caracterizados por RMN-¹H como monoglicéridos.

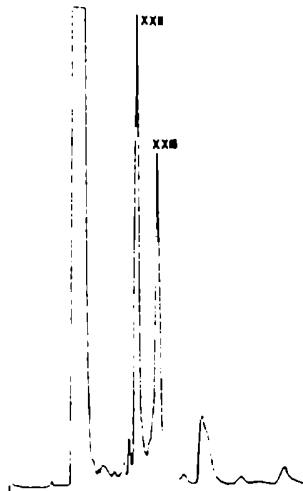


Fig. 74: CLAR de la subfracción 9/10a
columna: Alltech R-Sil C-18
(250 x 10 mm). sv: MeOH/H₂O
(90:10); flujo: 5 ml/min

Los espectros RMN-¹H de estos compuestos mostraron el mismo grupo de señales en la zona de δ : 3.5- 4.3, característico de monoglicéridos con el grupo acilo en posición *sn*-1 . Las señales correspondientes a la posición *sn*-1 del esqueleto del glicerol aparecían como un grupo complejo de señales centrado a 4.18 ppm, las correspondientes a la posición *sn*-2 como un multiplete centrado a 3.90 ppm y las de la posición *sn*-3, centradas a 3.65 ppm.

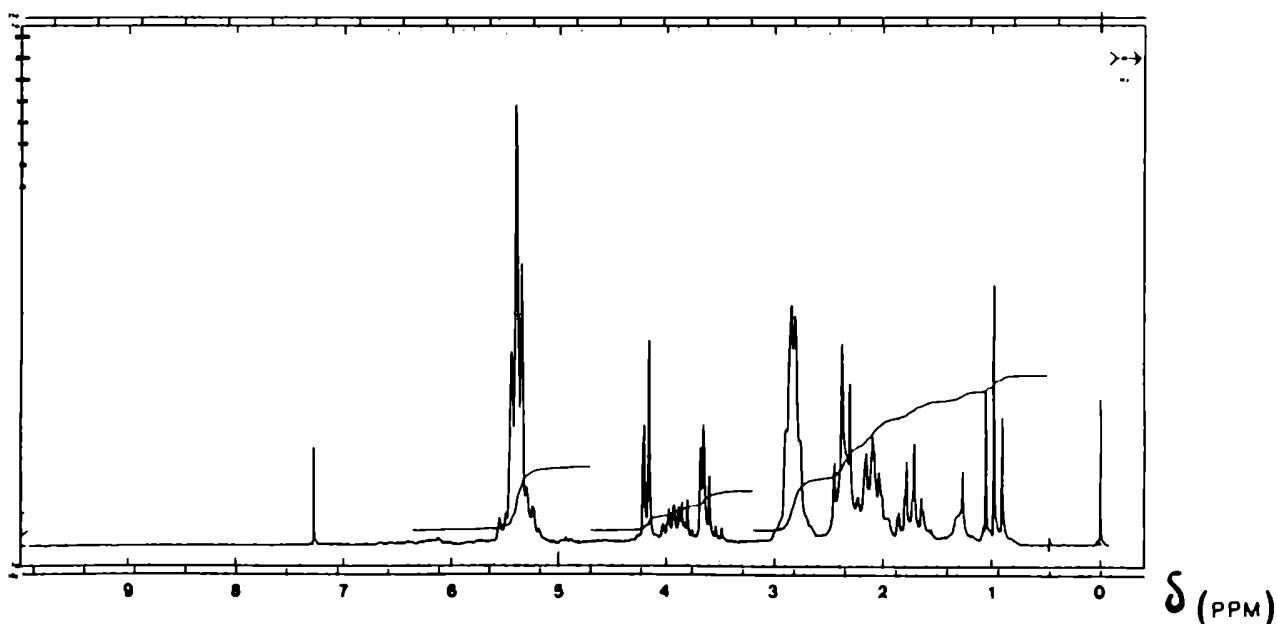


Fig. 75: Espectro RMN-¹H del compuesto XXII.

El espectro RMN-¹H del compuesto XXII presentó además señales características de dobles enlaces aislados por grupos metileno (señales complejas a 5.40 y 2.82 ppm). El grupo metilo terminal del ácido graso apareció como un triplete ($J= 8$ Hz), característico de una cadena de ácido insaturado ω -3.

Por otro lado la integración de estas señales indicó la presencia de cinco dobles enlaces separados por cuatro grupos metileno.

Por otra parte, la presencia en el EM de un ion molecular M^+ : 376, llevó a postular la presencia del ácido eicosapentaenoico ($C_{20:5,\omega-3}$; EPA).

El espectro RMN- 1H del compuesto XXIII presentó gran semejanza con el del compuesto XXII. Se observaron las mismas señales correspondientes al esqueleto del monoglicérido y también las señales características de ácidos grasos poliinsaturados. La diferencia entre ambos espectros radicaba en la integración de estas señales, la cual indicaba para el compuesto XXIII cuatro dobles enlaces separados por grupos metileno. La señal del grupo metilo terminal de la cadena del ácido aparecía como multiplete en lugar de triplete, hecho que indicó que no se trataba de un ácido graso insaturado $\omega-3$. La presencia en EM de un ion molecular M^+ : 398, permitió suponer la presencia de ácido araquidónico, $C_{20:4,\omega-6}$.

Para confirmar la identidad de los ácidos grasos se efectuó la saponificación de los monoglicéridos (ver parte experimental), metilación de los ácidos grasos obtenidos con CH_2N_2 y posterior análisis por CGL y comparación con patrones.

Los datos obtenidos permitieron identificar el compuesto XXII como 1-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-sn-glicerol

El compuesto XXIII fue identificado como 1-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-sn-glicerol.

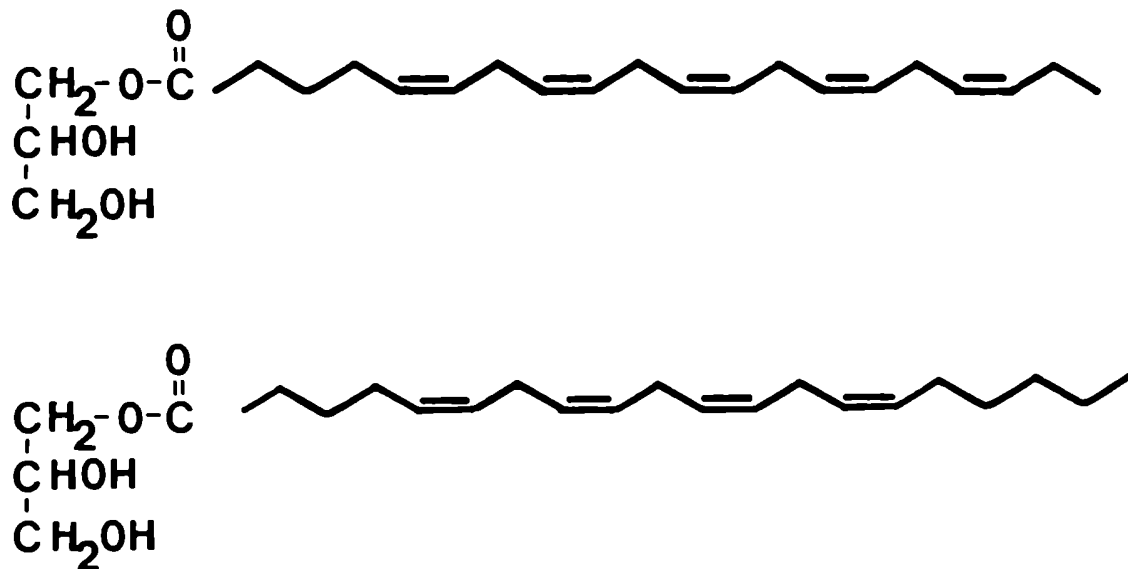


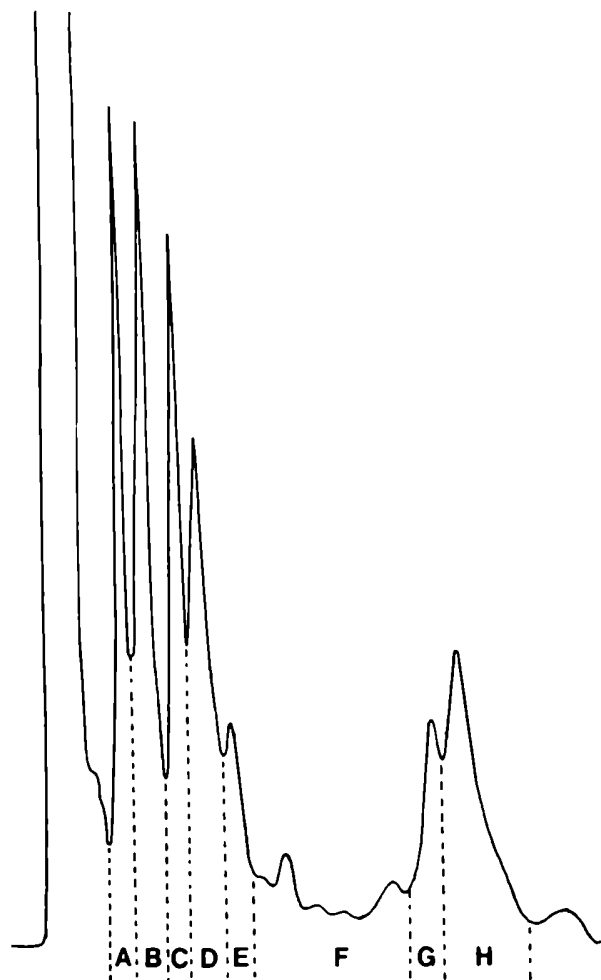
Fig. 76: Compuestos XXII y XXIII

Análisis de la subfracción 9/10b:

Esta mezcla fue fraccionada por CLAR utilizando una columna Rp-18 y como eluyente MeOH/H₂O (95:5). El cromatograma obtenido fue similar en las tres algas estudiadas. Se recogieron ocho fracciones: A,B,C,D,E,F,G y H.

Las fracciones A y B eran de color ambarino, la C era de color rojo intenso, la D y E de color anaranjado, la F amarillo pálido y las dos últimas de color amarillo intenso.

El análisis de las fracciones A y B permitió comprobar la presencia de los compuestos XXII y XXIII respectivamente, ya identificados en la subfracción 9/10a.



**Fig. 77:CLAR de la subfracción
9/10b.**

columna Alltech R-Sil C-18

(10 μ , 250 x 10 mm)

sv: MeOH/H₂O (95:5);

flujo: 5 ml/min.

La fracción C fue cromatografiada nuevamente por CLAR, utilizando una columna Rp-18 (5 μ m). Se obtuvo un compuesto mayoritario XXIV, en forma de cristales de color rojo intenso, el cual fue caracterizado como un carotenoide por su espectro RMN-¹H. El número de singuletes en la zona de campos altos que presentaba el espectro, indicó una estructura de carotenoide no simétrico.

El espectro IR del compuesto XXIV presentó las siguientes bandas importantes:

$\bar{\nu}$: 3600 cm^{-1} ancha	(estiramiento O-H)
$\bar{\nu}$: 1930 cm^{-1} débil	(estiramiento C=C=C)
$\bar{\nu}$: 1740 cm^{-1} fuerte	(estiramiento C=O éster)
$\bar{\nu}$: 1680 cm^{-1} fuerte	(estiramiento C=O conjugado)
$\bar{\nu}$: 1600 cm^{-1} media	(estiramiento C=C conjugado)

Estas bandas indicaron la presencia de grupos hidroxilo, éster y un carbonilo conjugado, probablemente con la cadena poliénica. La banda a $\bar{\nu}$ 1930 cm^{-1} resultó particularmente interesante, ya que indicó la presencia de un grupo alénico, característico en carotenoides de organismos marinos.

El EM del compuesto XXIV mostró un ion M^+ 658, el cual podía corresponder entre otras, a una fórmula molecular $C_{42}H_{58}O_6$, o a un carotenoide C_{40} con mayor contenido de oxígeno. En el caso de la primera fórmula molecular podía tratarse de un carotenoide C_{40} acetilado. La banda a $\bar{\nu}$ 1740 cm^{-1} en IR, la señal a 2.05 ppm (s, 3H) en RMN- 1H , a 170.0 ppm en RMN- ^{13}C y la presencia de iones M^+-H_2O-60 y M^+-2H_2O-60 en EM confirmaron esta hipótesis.

Por otra parte, la presencia en EM de iones M^+-18 y M^+-36 , indicaron la presencia de dos grupos hidroxilo. Todos estos datos permitieron identificar el compuesto XXIV como fucoxantina, comprobado por comparación de sus características espectroscópicas con datos de literatura [121].

El espectro RMN- 1H del compuesto XXIV presentó dos dobletes a 2.60 y 3.65 ppm ($J = 18$ Hz), correspondientes a los hidrógenos de C-7, características de grupos terminales 5,6-epóxido-8-ceto.

La señal centrada a 3.65 ppm se encontraba parcialmente superpuesta a la señal ancha correspondiente al hidrógeno de C-3 [99].

En la zona de campos bajos la señal a 7.12 ppm correspondiente al hidrógeno de C-10, indicó la presencia de un grupo ceto conjugado con la cadena poliélica, también evidenciado por la señal a 197.5 ppm en RMN- ^{13}C [100].

La presencia del grupo aléico quedaba evidenciada por la señal a 6.06 ppm en RMN- ^1H (hidrógeno aléico de C-8') [99] y la señales a 117.4, 202.1 y 103.3 ppm en RMN- ^{13}C (C-6', C-7' y C-8' respectivamente) [100].

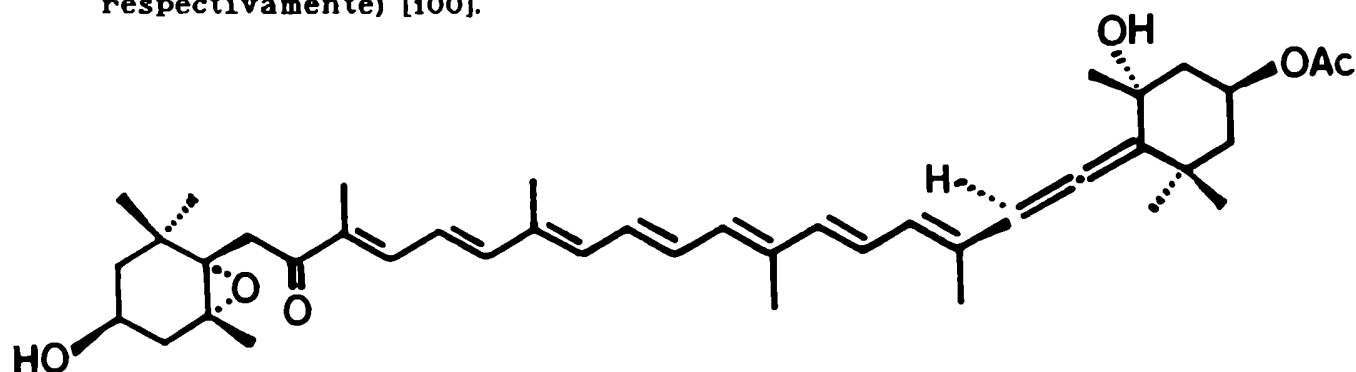


Fig. 78: Compuesto XXIV (fucoxantina).

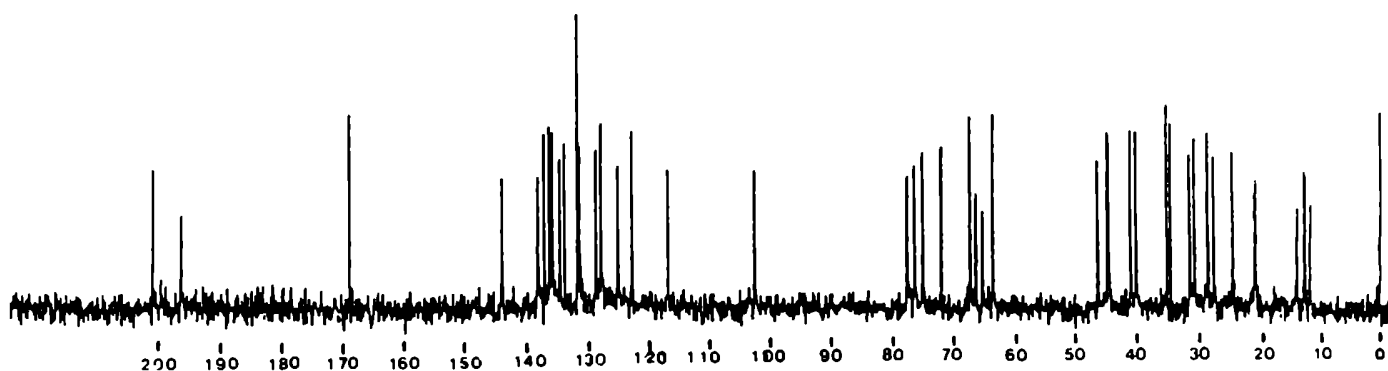


Fig. 79: Espectro RMN- ^{13}C del compuesto XXIV.

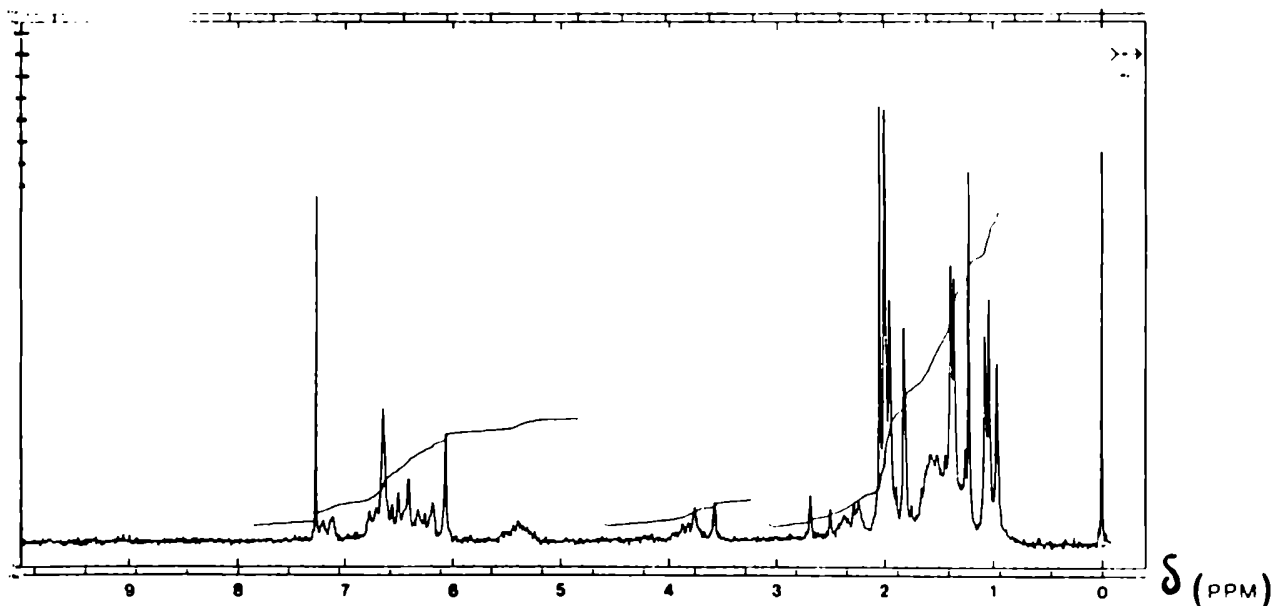


Fig. 80: Espectro RMN-¹H del compuesto XXIV.

La fracción D fue subfraccionada en las mismas condiciones que la anterior y de ella se pudieron aislar cuatro sustancias en las señales principales: D1, D2, D3 y D4.

La sustancia detectada en D1 fue identificada como fucoxantina (XXIV), ya descrita en el análisis de la fracción anterior.

Los compuestos correspondientes a las señales D2 y D3, XXV y XXVI respectivamente, fueron caracterizados como monoglicéridos, por su espectro RMN-¹H característico, semejante al de los compuestos XXII y XXIII.

En el caso del compuesto XXV, la ausencia de señales de hidrógenos olefinicos en RMN-¹H, permitió suponer la presencia de un grupo acilo saturado. En cambio, el espectro RMN-¹H del compuesto XXVI presentó una señal a 5.30 ppm, que integró para dos hidrógenos, lo cual permitió suponer la presencia de un grupo acilo monoinsaturado.

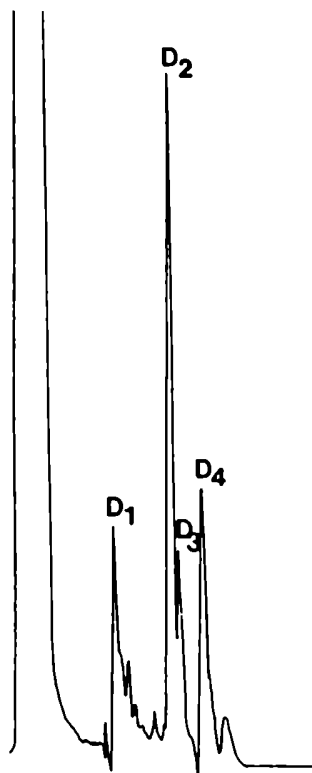


Fig. 81: CLAR de la fracción D.
 columna Altex Ultrasphere ODS (5 μ m)
 (250 x 10 mm)
 sv: MeOH/H₂O (95:5); flujo: 3 ml/min

Los EM de los compuestos XXV y XXVI presentaron iones moleculares M^+ 330 y 356 respectivamente. Esto permitió suponer la presencia de un grupo acilo C_{16:0} en el compuesto XXV y un grupo C_{18:1} en el compuesto XXVI.

Los ácidos grasos constituyentes de estos monoglicéridos fueron identificados como sus ésteres metílicos por saponificación de los compuestos, metilación con CH₂H₂, análisis por CGL y comparación con patrones. Se pudo caracterizar de esta forma ácido palmítico en el caso del compuesto XXV y ácido oleico en el caso del compuesto XXVI.

El compuesto XXV fue identificado como 1-O-[hexadecanoil]-*sn*-glicerol y el compuesto XXVI como 1-O-[(9Z)-octadeca-9-enoil]-*sn*-glicerol.

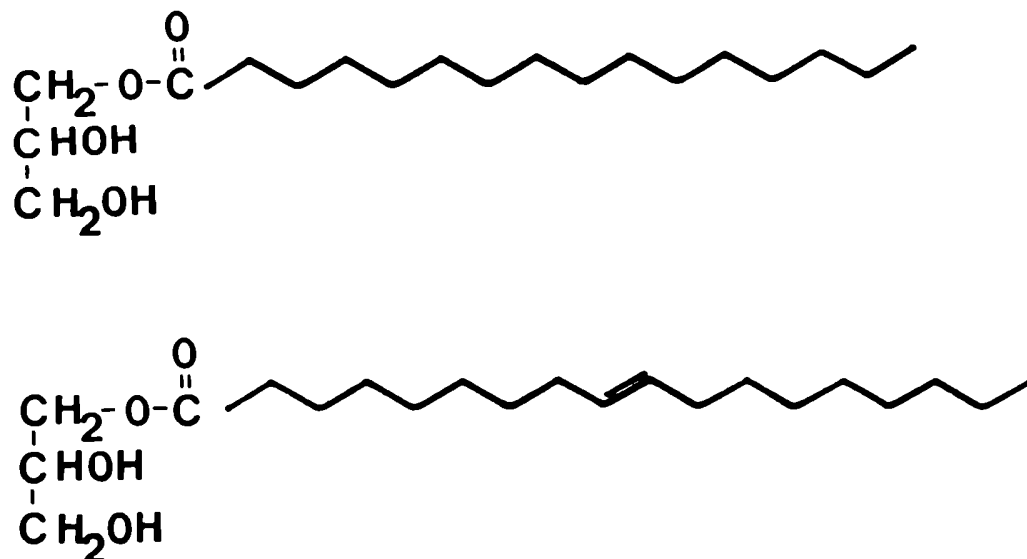


Fig. 82: Compuestos XXV y XXVI.

El compuesto obtenido de la fracción de CLAR D4 fue aislado también de la fracción E, en muy baja cantidad en ambos casos. Este compuesto, XXVII, de color rojo, en c.c.d. reveló de color azul con H₂SO₄ 50% indicando una posible estructura de carotenoide.

El EM de este compuesto, muy similar al de la fucoxantina, presentó también un ion molecular M⁺ 658, dos pérdidas de agua y una pérdida de ácido acético.

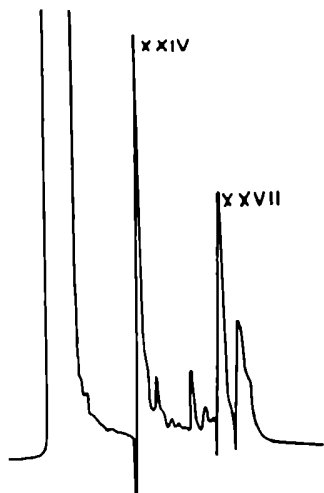


Fig. 83: CLAR de la fracción E.
condiciones: ver Fig. 81, pág.104

El espectro RMN-¹H del compuesto XXVII resultó también muy similar al de la fucoxantina, sobre todo en la zona de campos altos. Solo se observaron pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos de los grupos metilo C-16' y C-17'. La única diferencia importante se observó en la zona de campos bajos, donde la señal a 6.06 ppm, correspondiente al hidrógeno alénico de C-8', experimentó un corrimiento de 0.5 ppm a campos bajos. Por comparación con datos de literatura [169], se concluyó que el compuesto XXVII era un epímero de la fucoxantina, con diferente configuración en el grupo alénico. Esto explicaría el notorio corrimiento a campos bajos del hidrógeno alénico y las pequeñas variaciones en los desplazamientos de los grupos metilo mas próximos al grupo alénico. En particular, los datos espectroscópicos del compuesto XXVII coincidían con los del epímero obtenido por estereomutación catalizada por I₂ de la fucoxantina.

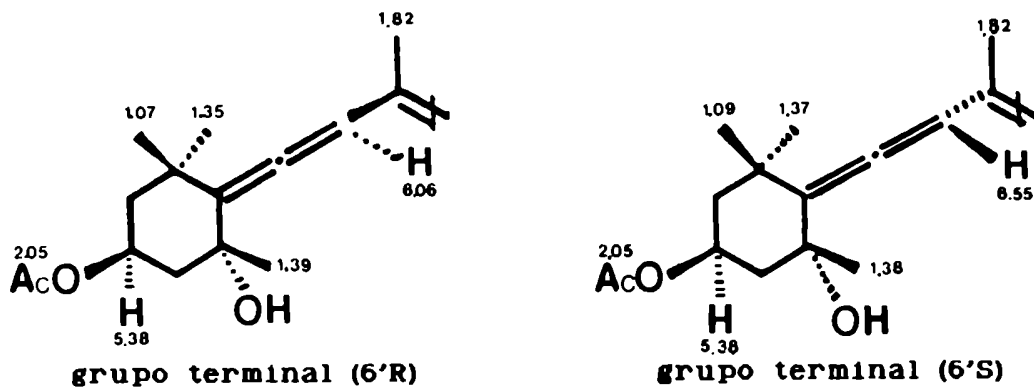


Fig. 84: Desplazamientos químicos en RMN-¹H de grupos terminales alénicos.

Sobre la base de estos datos, el compuesto XXVII fue identificado como (3S, 5R, 6S, 3'S, 5'R, 6'S)-fucoxantina.

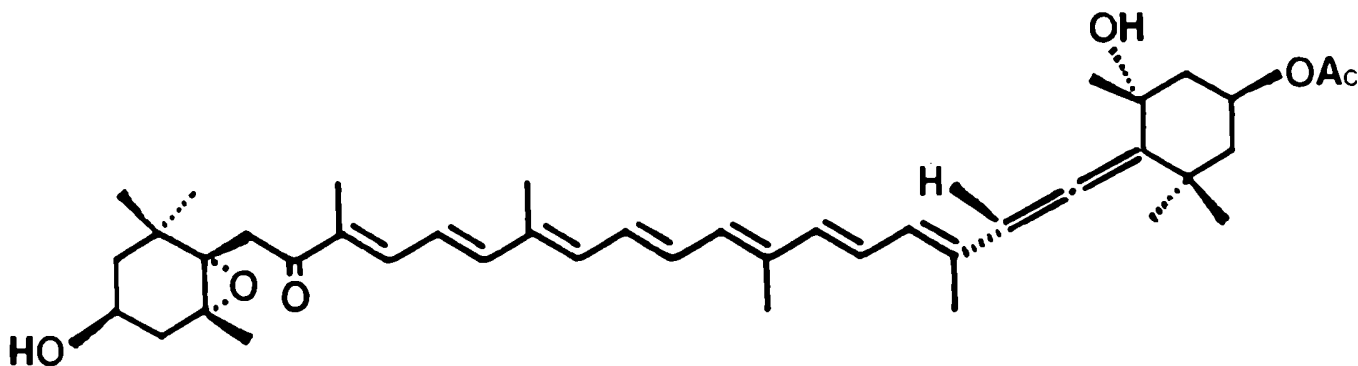


Fig. 85: Compuesto XXVII.

Este compuesto fue detectado como producto minoritario en extractos del alga parda *Fucus serratus* (ver discusión).

La fracción F fue descartada, ya que se la obtuvo en muy baja proporción y el análisis por c.c.d. reveló una gran complejidad.

Los compuestos pertenecientes a las fracciones G y H fueron purificados y analizados sólo en los extractos de *Corallina officinalis* y *Jania sp.* En el caso de *Corallina elongata* estos compuestos fueron detectados a nivel de trazas.

Estas fracciones fueron recromatografiadas por CLAR, utilizando una columna Rp-18 (Altex Ultrasphere) para la purificación final de sus componentes.

Se observó que la fracción G estaba enriquecida en un componente mayoritario, XXVIII.

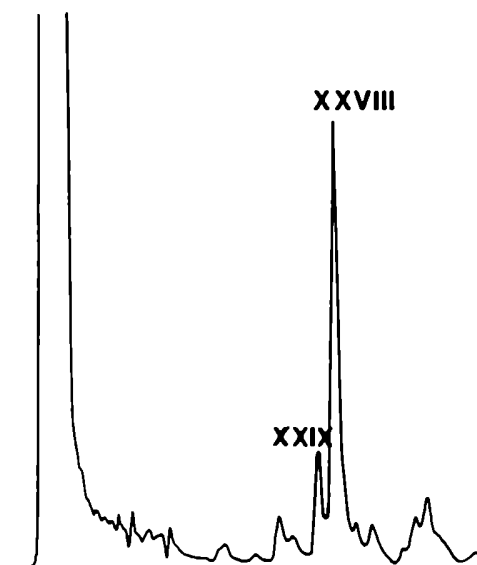


Fig. 86: CLAR de la fracción G; condiciones: ver Fig. 81, pág. 104.

La fracción H en cambio, consistía en una mezcla (1:2) del compuesto XXVIII, y otro compuesto, XXIX, que a su vez era uno de los componentes minoritarios de la fracción G. Se observó al utilizar una columna Altex Ultrasphere, una inversión en el orden de elución de los compuestos XXVIII y XXIX respecto del que presentaban en la columna Alltech R-Sil C-18.

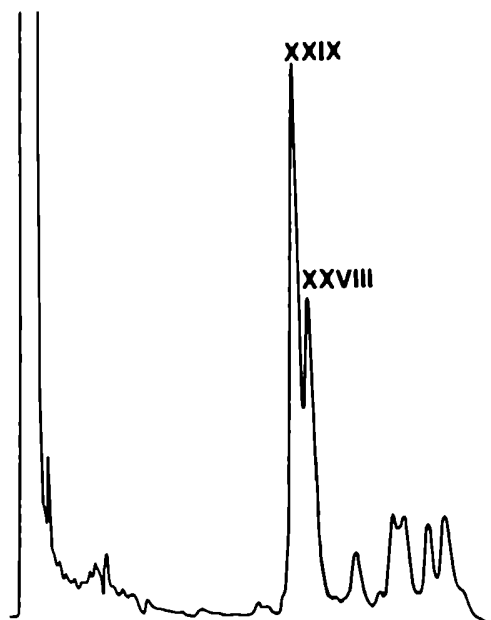
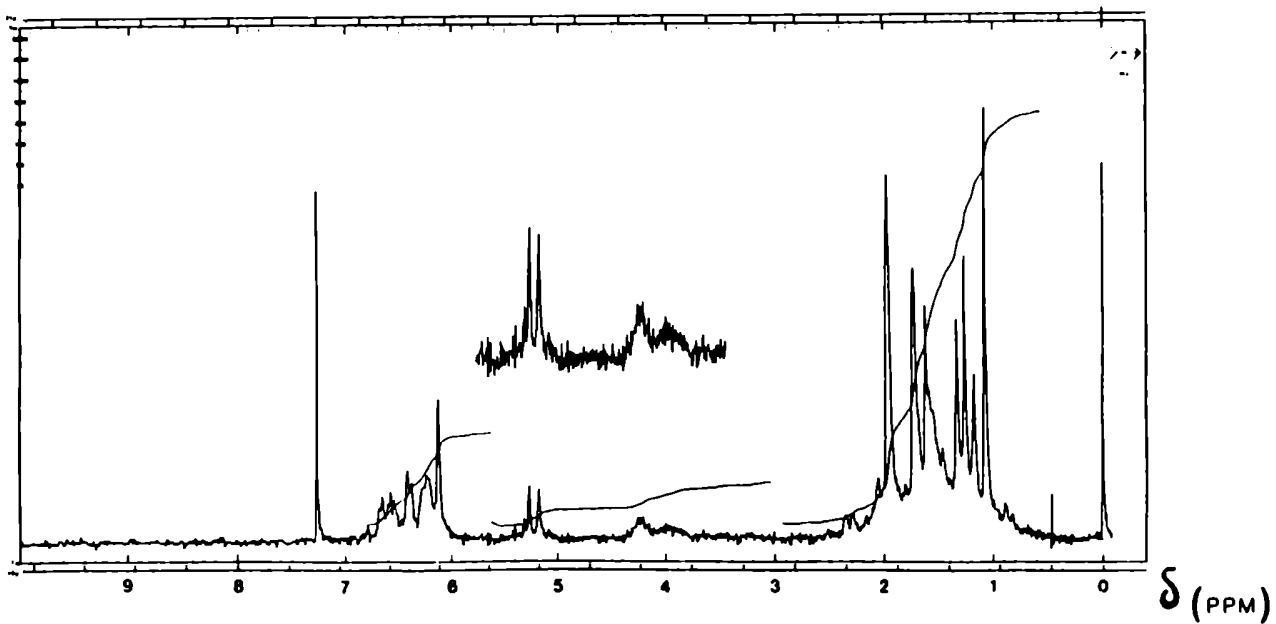


Fig. 87: CLAR de la fracción **H**; condiciones: ver Fig. 81, pág. 104.

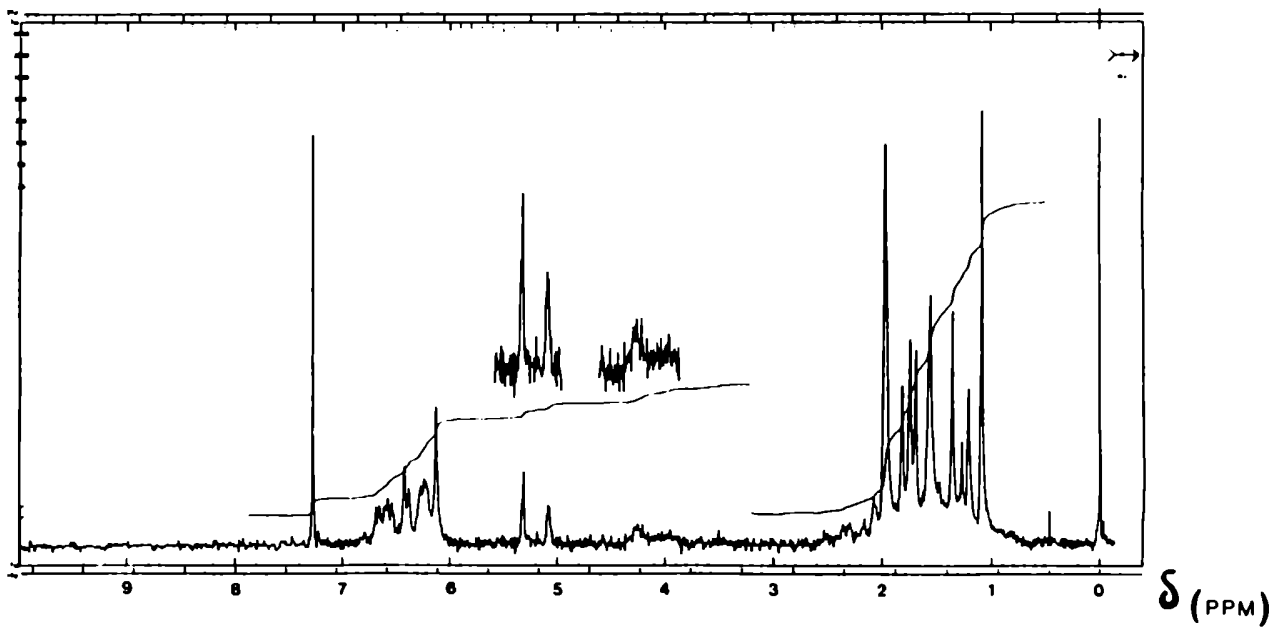
Los compuestos **XXVIII** y **XXIX**, carotenoides de color amarillo-anaranjado intenso, fueron los únicos que pudieron ser aislados de estas fracciones en cantidad suficiente como para proceder a su identificación.

Los espectros RMN-¹H de estos compuestos resultaron muy similares.

Se observó al comparar ambos espectros, un aspecto similar en la zona de 6 - 7 ppm, lo cual indicaba una similitud en la cadena poliénica de ambos compuestos. También se observaron pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos de algunos grupos metilo y dos señales anchas, centradas a 4.00 y 4.25 ppm, que indicaban la presencia de dos grupos hidroxilo no equivalentes. Asimismo, el número de señales debidas a grupos metilo permitió concluir que se trataba de carotenoides no simétricos.



XXVIII



XXIX

Fig. 88: Espectros RMN- ^1H de los compuestos XXVIII y XXIX.

El aspecto mas notable que presentaron los espectros RMN-¹H de estos compuestos fue sin duda las señales entre 5 y 6 ppm.

En particular, el compuesto XXVIII presentó dos singuletes anchos a 5.18 y 5.26 ppm, que integraban para un hidrógeno cada uno. El compuesto XXIX presentó dos dobletes (J = 2 Hz), centrados a 5.08 y 5.33 ppm, que integraban para un hidrógeno cada uno.

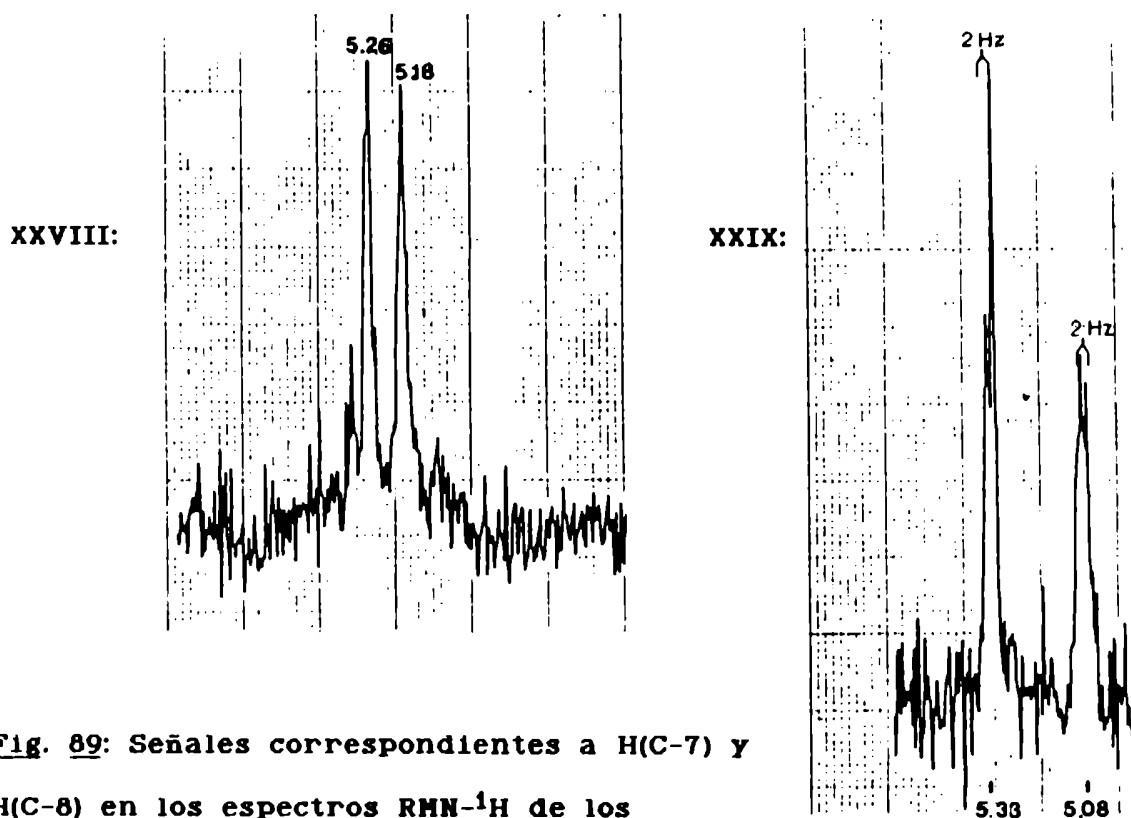
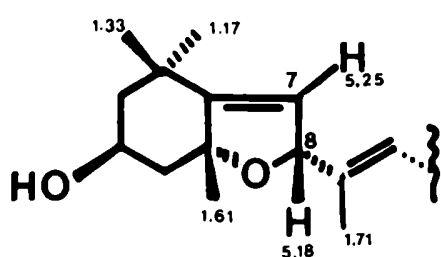


Fig. 89: Señales correspondientes a H(C-7) y H(C-8) en los espectros RMN-¹H de los compuestos XXVIII y XXIX.

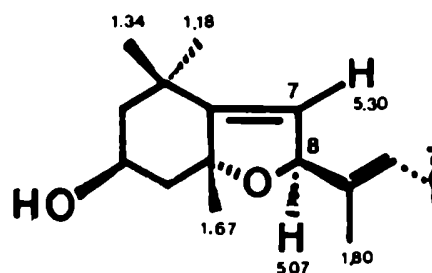
Estas señales son características de carotenoides con grupos terminales 5,8-epóxido y corresponden a los hidrógenos de las posiciones 7 y 8.

Por comparación con los siguientes datos de literatura [100,170-172] se concluyó que ambos compuestos poseían un grupo terminal 3 α -hidroxi-5,8-epoxi y que eran isómeros en C-8. En particular el compuesto XXVIII poseía el grupo con configuración (8R) y el XXIX con configuración (8S). Asimismo, se pudo afirmar que el metilo C-18 se encontraba en la cara β en ambos compuestos.



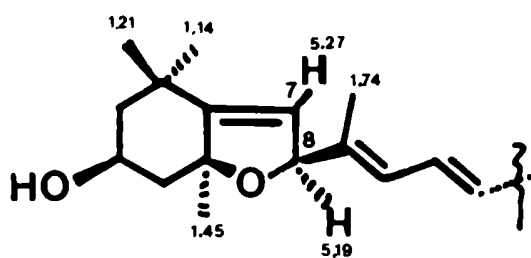
grupo (8R), 18 β

H-7 y H-8: s. ancho



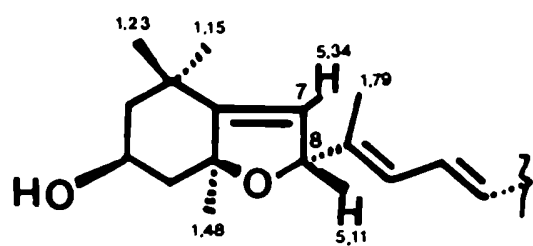
grupo (8S), 18 β

H-7 y H-8: d, J: 1.8 Hz



grupo (8S), 18 α

H-7 y H-8: s. ancho



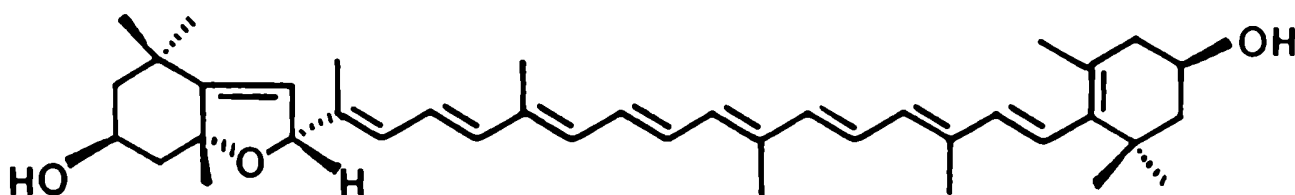
grupo (8R), 18 α

H-7 y H-8: d, J: 1.8 Hz

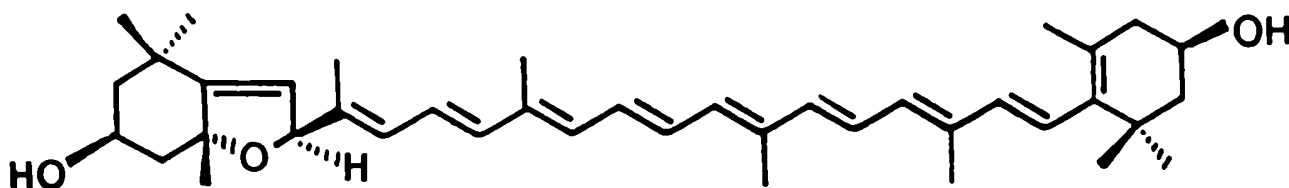
Fig. 90: Desplazamientos químicos en RMN-¹H de grupos terminales 3 α -hidroxi-5,8-epoxi.

Los EM de los compuestos XXVIII y XXIX eran idénticos, lo cual permitió postular que se trataba de dos compuestos epiméricos en C-8. Se observó en ambos casos un ion M^+ 584, además de los iones m/z 504 (M^+-80), m/z 181 y m/z 221, característicos de fragmentaciones de grupos terminales 3-hidroxi-5,8-epóxido [112,114,117].

Considerando una fórmula molecular $C_{40}H_{56}O_3$, la presencia de un grupo terminal 3-hidroxi-5,8-epóxido y un grupo hidroxilo adicional en C-3', el restante grupo terminal podría ser 3'-hidroxi, Δ^4 o Δ^5 . La ausencia de señales en RMN- 1H a 5.4 - 5.6 ppm permitió descartar la posibilidad de un grupo Δ^4 . Por lo tanto, el compuesto XXVIII fue identificado como (8R)-mutatoxantina y el compuesto XXIX como (8S)-mutatoxantina. La identidad de ambos compuestos fue verificada por comparación con datos espectroscópicos de literatura [173,174].



XXVIII: (8R)-mutatoxantina



XXIX: (8S)-mutatoxantina

Fig. 91: Compuestos XXVIII y XXIX.

FRACCION 11 :

Esta fracción, eluida con acetato de etilo/éter de petróleo (80:20), resultó poco significativa en las tres especies estudiadas. Se aisló en muy baja cantidad y estaba compuesta por los monoglicéridos XXII y XXIII y clorofilas, por lo cual su análisis no aportó ningún aspecto de interés.

ANALISIS DE LAS FRACCIONES 12 Y 13:

Estas fracciones fueron eluidas con acetato de etilo/éter de petróleo (90:10) y acetato de etilo puro respectivamente. El análisis de ambas por c.c.d. reveló un mismo perfil cromatográfico para ambas, y por lo tanto fueron estudiadas en forma conjunta.

Por c.c.d. se observó, además de clorofilas, la presencia de dos carotenoides, uno de ellos mayoritario. El subfraccionamiento de esta fracción fue realizado por permeación por geles de Sephadex LH-20, utilizando metanol como solvente.

De esta forma, fue posible obtener una fracción enriquecida en carotenoides, la cual fue subfraccionada por CLAR, utilizando una columna Alltech R-Sil C-18 y como eluyente, MeOH/H₂O (90:10). Se colectaron las subfracciones A, B, C y D. La subfracción A estaba constituida sólo por el carotenoide mayoritario XXX y por lo tanto no requirió ulterior purificación. Los componentes de las subfracciones C y D se encontraban en cantidades demasiado pequeñas y no pudieron ser identificados.

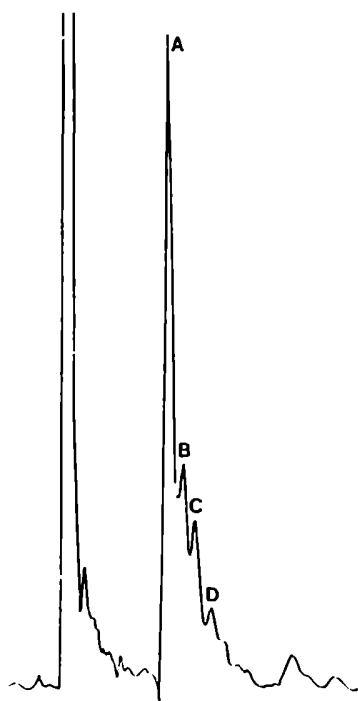


Fig. 92: CLAR de las fracciones 12 y 13; columna Alltech R-S11 ODS (10 μ) (250 x 10 mm);
solvente: MeOH/H₂O (90:10);
flujo: 5 ml/min

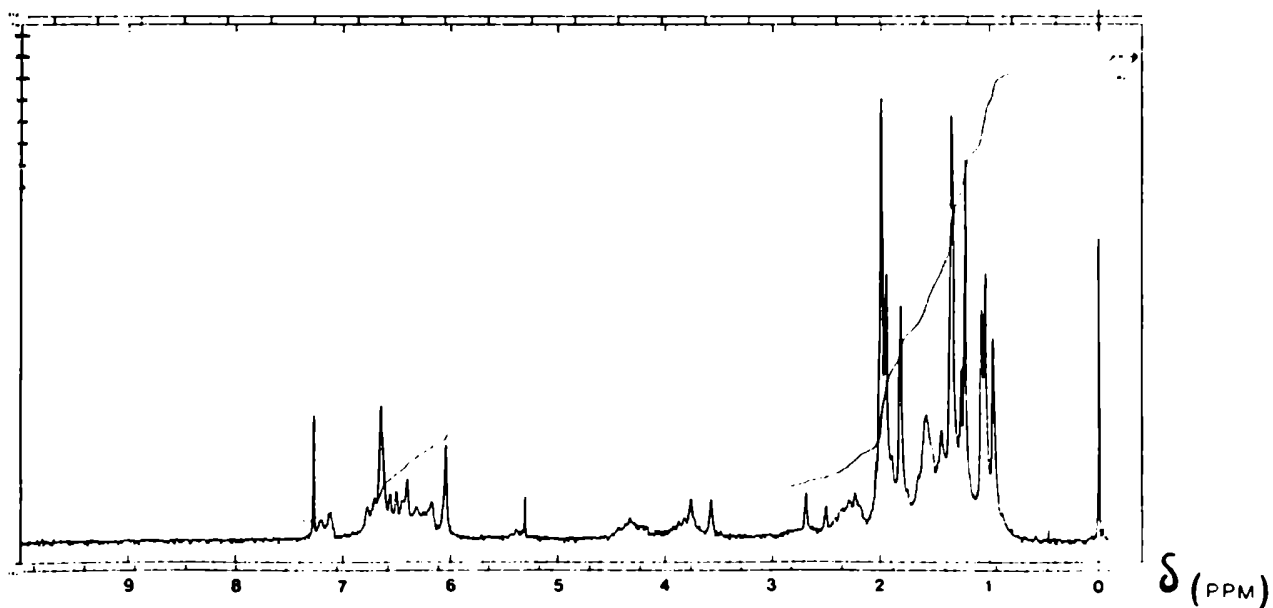


Fig. 93: Espectro RMN-¹H del compuesto XXX.

El espectro RMN-¹H del compuesto XXX era muy similar al de la fucoxantina. Se apreciaban solo tres diferencias notables:

no se observaba la señal a 5.40 ppm, y en su lugar presentaba una señal ancha centrada a 4.30 ppm, que integraba para un hidrógeno.

- no se observaba el singulete a 2.05 ppm, característico del grupo metilo de acetato.
- los singuletes debidos a los grupos metilo 17' y 18' (1.36 y 1.39 ppm en la fucoxantina) aparecían como un singulete ancho, no resuelto, a 1.35 ppm.

En el espectro RMN-¹³C del compuesto XXX, si bien se observaban las señales de C-6', C-7' y C-8' correspondientes a un grupo terminal alénico (117.6, 202.2 y 103.1 ppm respectivamente) no se observaba la señal correspondiente al grupo carbonilo del acetato a 170.5 ppm.

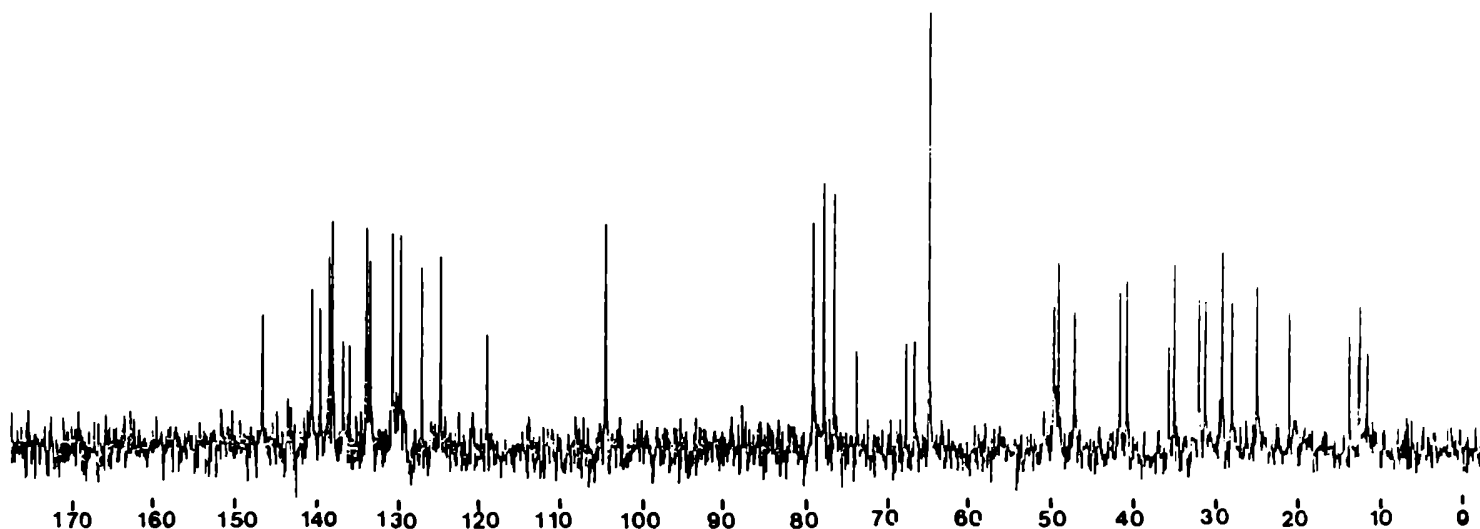


Fig. 94: Espectro RMN-¹³C del compuesto XXX.

El espectro IR del compuesto XXX presentó las siguientes bandas:

$\bar{\nu}$: 1930 cm^{-1} estiramiento C=C=C

$\bar{\nu}$: 1680 cm^{-1} estiramiento C=O conjugado

No se observó la banda a $\bar{\nu}$ 1730 cm^{-1} debida al grupo éster.

Todos estos datos indicaban una estructura similar a la de la fucoxantina, con un grupo terminal 3'-hidroxi en lugar de 3'-acetoxi y permitieron identificar el compuesto XXX como fucoxantínol. La identidad de este compuesto fue comprobada por comparación con datos de literatura [100].

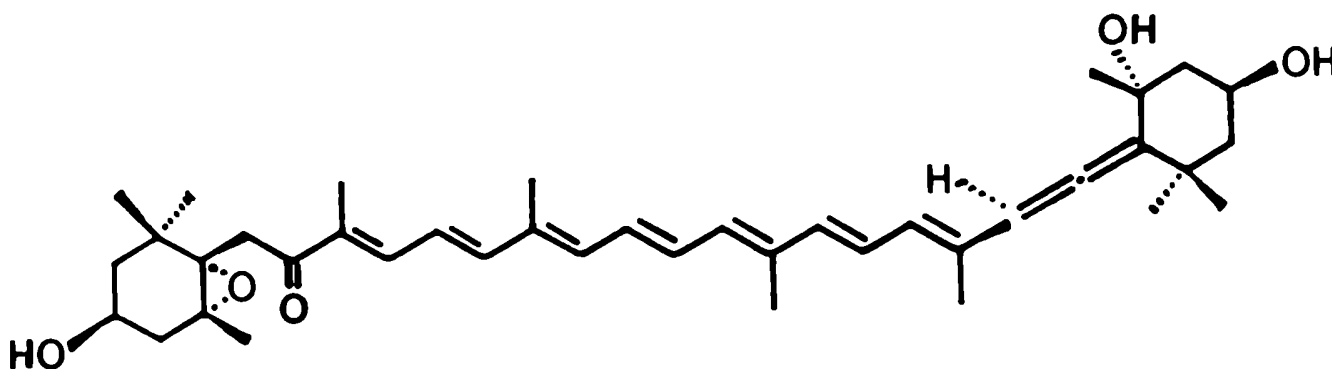


Fig. 95: Compuesto XXX (fucoxantínol).

El EM del compuesto XXX mostró un ion M^+ 616 (3%) y se observaron también tres pérdidas de H_2O : m/z 598 (77%), m/z 580 (12%) y m/z 562 (3%).

La subfracción B fue purificada por CLAR utilizando una columna Rp-18 de alta resolución (Altex Ultrasphere ODS-2) y una mezcla $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10) como eluyente. Se consiguió de esta forma aislar una pequeña cantidad del carotenoide XXXI.

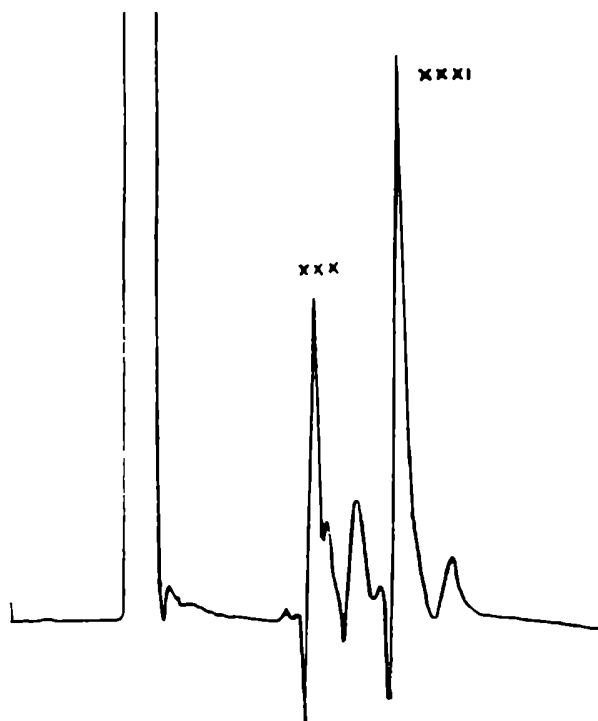


Fig. 96: CLAR de la subfracción
12/13 B. columna: Altex Ultrasphere
 ODS-2 (5 μm); (250 x 10 mm).
 sv: MeOH/H₂O (90:10); flujo: 3 ml/min

Este compuesto presentó un espectro RMN-¹H similar al del fucoxantíol (XXX), salvo por tres diferencias:

- la señal a 6.06 ppm, correspondiente al hidrógeno de C-8' (alénico), experimentó un corrimiento de 0.5 ppm a campos más bajos.
- las señales correspondientes a los grupos metilo C-16' y C-18' (las cuales no se resolvían en el espectro del fucoxantíol) se observaron como singuletes a 1.35 y 1.38 ppm respectivamente.
- la señal correspondiente al grupo metilo C-17', experimentó un corrimiento de 1.07 a 1.10 ppm.

El EM del compuesto XXXI resultó idéntico al del fucoxantíol.

Estos datos indicaron en forma similar a lo sucedido con la fucoxantina que se trataba de un epímero del fucoxantíinol, en el cual la configuración en C-6' era S en lugar de R. Por lo tanto, el compuesto XXXI fue identificado como (3S,5R,6S,3'S,5'R,6'S)-fucoxantíinol.

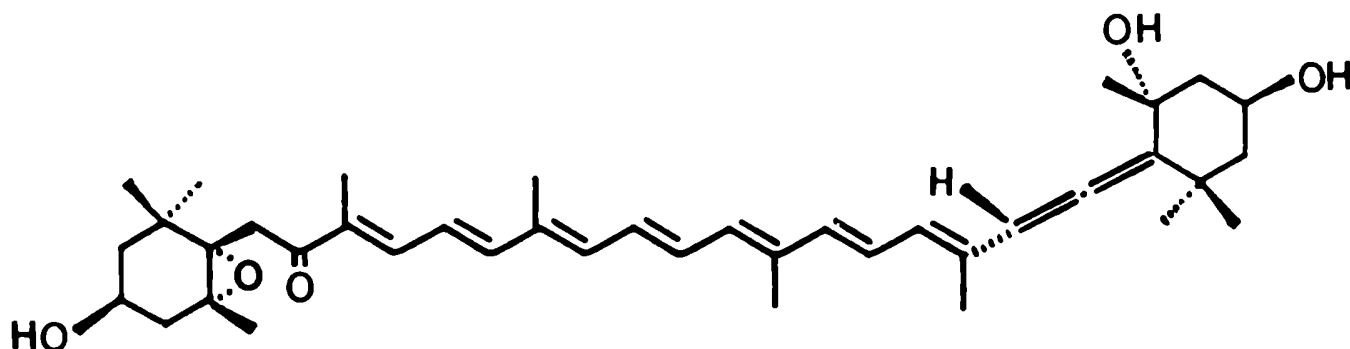


Fig. 97: Compuesto XXXI.

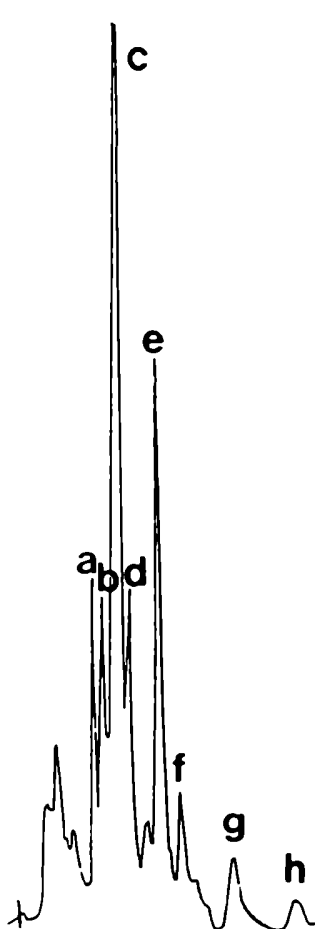
ANALISIS DE LA FRACCIONES 14 Y 15:

Estas fracciones fueron eluidas con acetato de etilo/metanol (90:10) y metanol puro respectivamente y constituían las de mayor peso en los extractos de las tres especies estudiadas. Ambas fracciones resultaron similares por análisis por c.c.d. y por lo tanto fueron estudiadas en conjunto.

El análisis de estas fracciones indicó además de pigmentos del tipo de las clorofilas, una mancha que reveló de color rojo con H_2SO_4 50 %. El aislamiento de esta sustancia fue realizado por cromatografía "flash" en columna seca, utilizando acetato de etilo y acetato de etilo/metanol (90:10) como solventes.

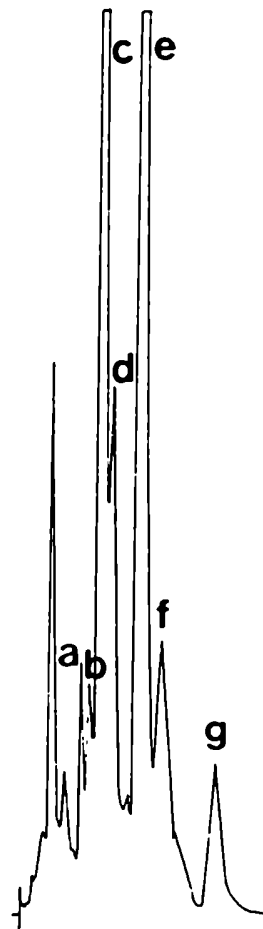
Al cromatografiar esta sustancia, que presentaba aspecto de jarabe verdoso en placas de fase reversa (Rp-18), se observó que se trataba de una mezcla compleja y que todos sus componentes revelaban de color rojo con H₂SO₄ 50 %.

Por lo tanto, esta mezcla fue subfraccionada por CLAR utilizando una columna de fase reversa Whatman Partisil M9 y metanol como eluyente. En el caso de *Corallina officinalis* se colectaron ocho subfracciones, 14a-h, mientras que para *Corallina elongata* y *Jania sp.* se colectaron siete que resultaron idénticas a las 14a-g del caso anterior.



C. Officinalis

Fig. 98: CLAR de la fracción 14.
col.: Alltech R-S11
C-18 (10 µm).
(500 x 10 mm).
sv.: MeOH
flujo: 7 ml/min



C. elongata y *Jania sp.*

Todas estas subfracciones presentaron espectros RMN-¹H muy similares, en los que se observaba una zona compleja de señales entre 3.4 - 4.5 ppm. Esto indicó que se trataba de estructuras polihidroxiadas, probablemente glicósidos.

La subfracción 14c, mayoritaria en las tres especies estudiadas, resultó clave para la elucidación estructural de esta familia de compuestos.

El espectro RMN-¹H de esta sustancia mostró que se trataba de un derivado de ácidos grasos poliinsaturados (señales complejas centradas a 5.30 y 2.80 ppm).

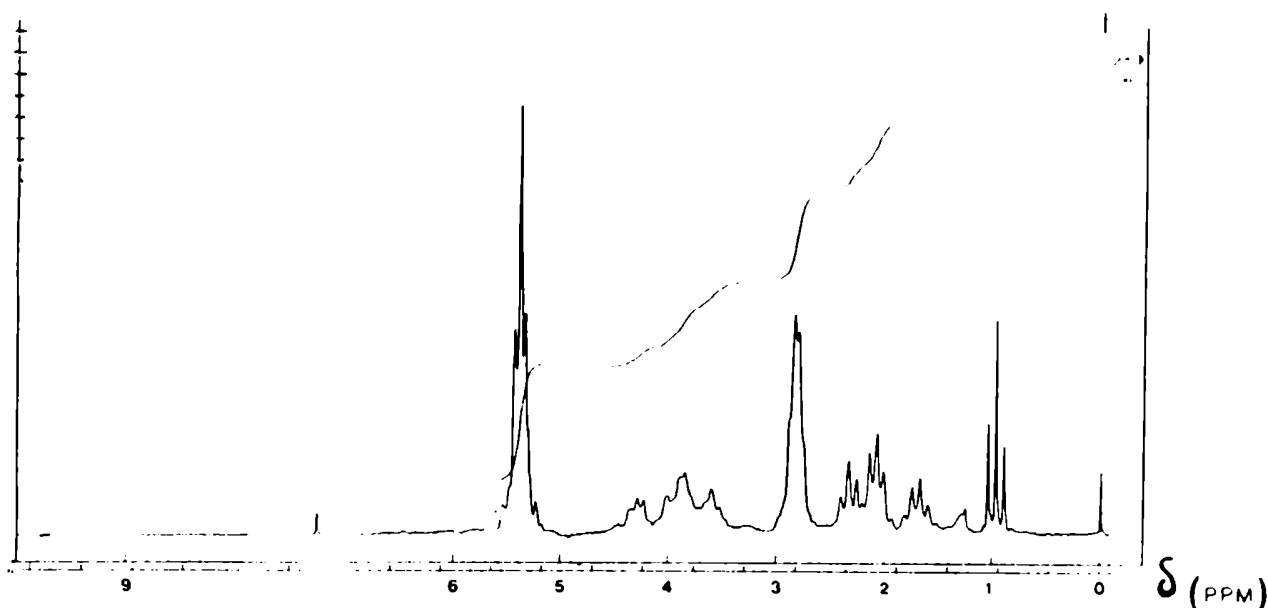


Fig. 99: Espectro RMN-¹H del compuesto XXXII.

El espectro RMN-¹³C de este compuesto reveló la presencia de dos grupos carbonilo de éster (173.4 y 173.0 ppm). También se observó la presencia de un carbono anomérico a 104.0 ppm (probable β -galactopiranosido) y ocho señales en la zona de δ : 60 - 75 ppm.

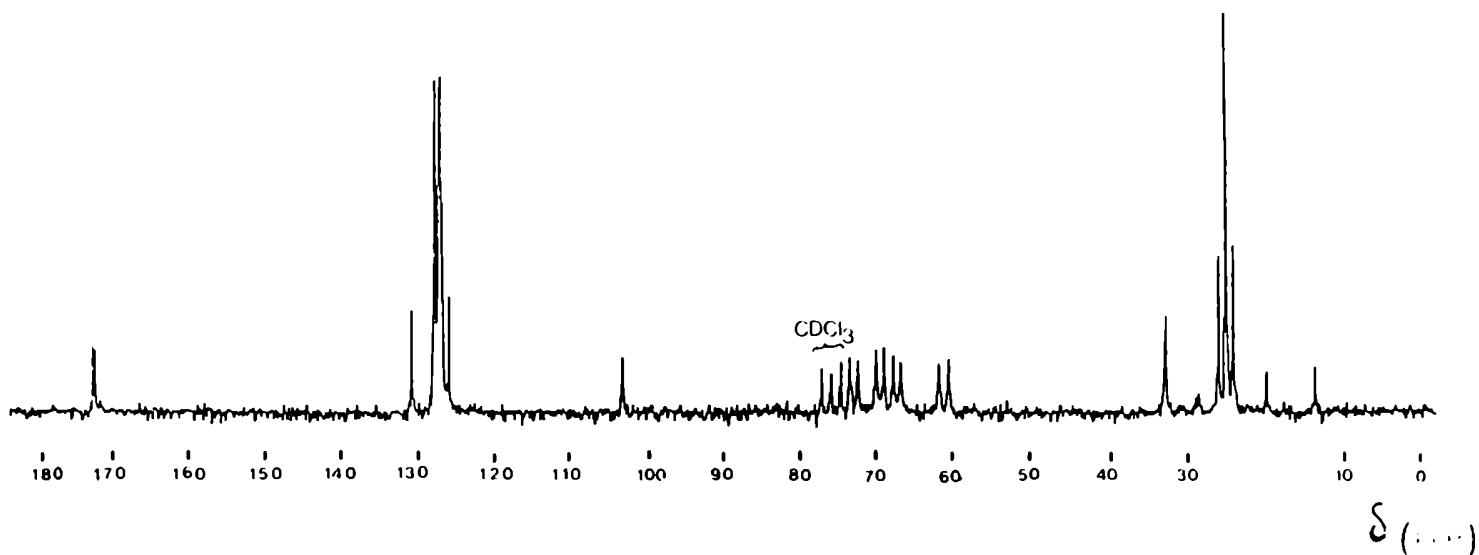


Fig. 100: Espectro RMN-¹³C del compuesto XXXII.

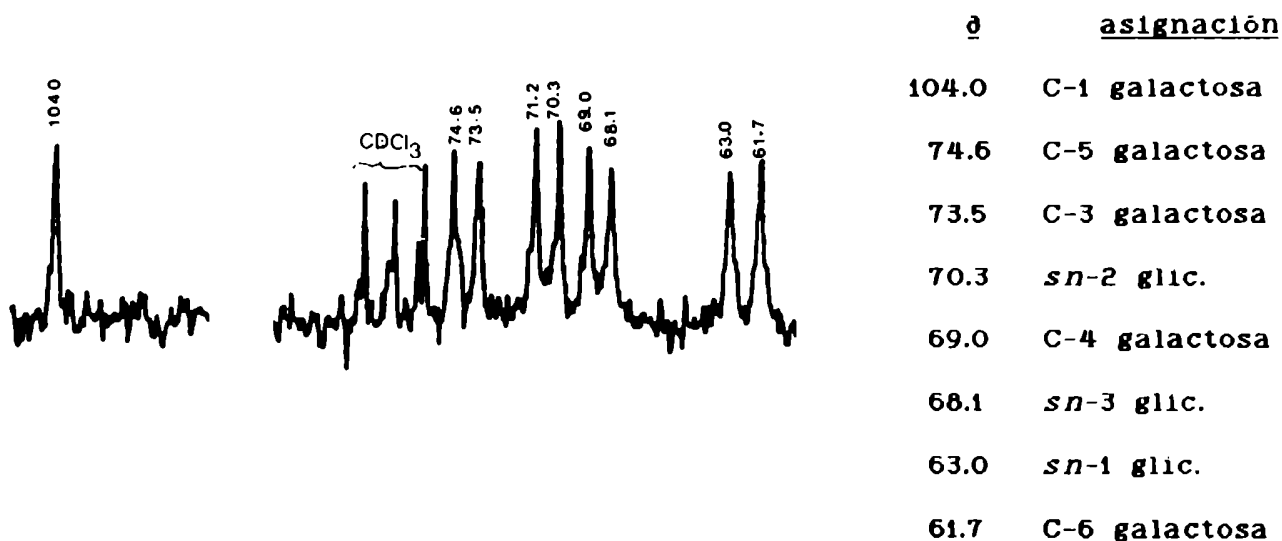


Fig. 101: Zona de 60 - 105 ppm en el RMN-¹³C del compuesto XXXII.

Resultó evidente una estructura de glicósido (probablemente de galactosa), con el monosacárido unido a un esqueleto de tres átomos de carbono, trihidroxilado (probablemente glicerol). De esta forma surgió la estructura de monogalactosildiglicérido para este compuesto (XXXII).

Por comparación de los desplazamientos químicos en RMN- ^{13}C de este compuesto con datos de literatura [156] se observó una gran concordancia en los carbonos correspondientes al glicerol y al monosacárido, caracterizado sin duda como β -D-galactopiranososa (comprobado mediante la preparación del alditol acetilado correspondiente y comparación de su t.r. en CGL con el de un compuesto patrón).

Para identificar los ácidos grasos constituyentes del compuesto XXXII, se prepararon los ésteres metílicos de los mismos por transesterificación con MeOH/HCl (ver parte experimental). El análisis por CGL de los ésteres metílicos formados, reveló la presencia de un solo ácido graso, identificado como ácido eicosapentaenoico (EPA), $\text{C}_{20:5}$ ω -3, por coinyección en CGL con un compuesto patrón.

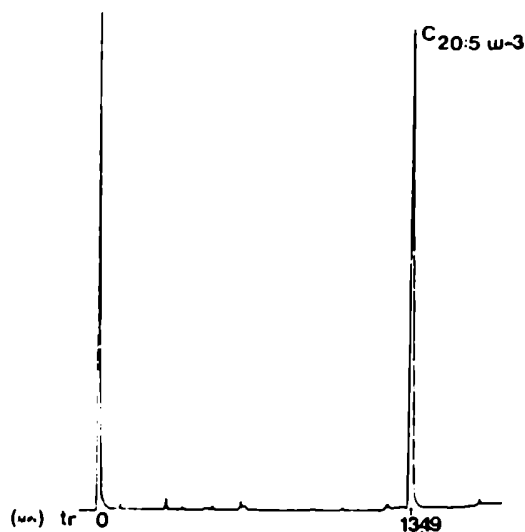


Fig. 102: CGL de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la subfracción 14c.
condiciones: columna capilar HP-5 isotérmica 160 °C hasta 10 min, luego 160 → 235 °C, 10 °C/min

De esta forma, el compuesto XXXII fue identificado como 1,2-di-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-3-O-β-D-galactopiranosil-sn-glicerol.

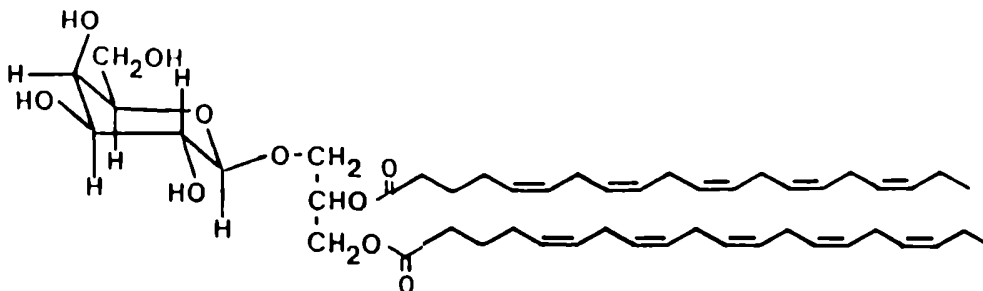


Fig. 103: Compuesto XXXII.

Para la elucidación estructural de los restantes componentes de la fracción se siguió una metodología similar.

Subfracción 14d: El componente mayoritario de esta subfracción, XXXIII, fue purificado por CLAR en las mismas condiciones que el subfraccionamiento original.

Los espectros RMN-¹H y RMN-¹³C del producto XXXIII indicaron una estructura de galactosildiglicérido con grupos acilo insaturados. La comparación de las integraciones de las señales en RMN-¹H correspondientes a los dobles enlaces, a los metilenos entre dobles enlaces y a los metilos terminales de las cadenas de ácidos grasos permitieron calcular siete dobles enlaces por molécula.

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos por transesterificación realizado en las mismas condiciones que para el producto anterior, permitió identificar los ácidos eicosapentaenoico ($C_{20:5}$ ω -3) y araquidónico ($C_{20:4}$ ω -6).

condiciones: ver Fig. 102,

pág. 123

t.r. 12.42: éster metílico

del ác. $C_{20:4}$ ω -6

t.r. 13.54: éster metílico

del ác. $C_{20:5}$ ω -3

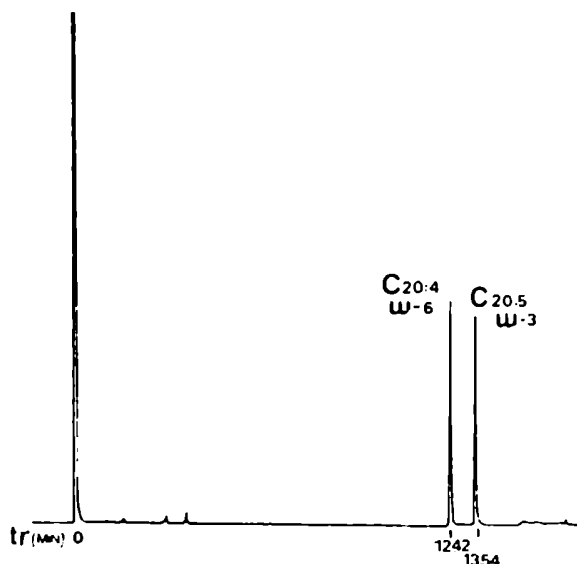


Fig. 104: CGL de los ésteres metílicos de la subfracción 14d.

La distribución de los distintos grupos acilo en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol fue estudiada por EM/FAB⁺.

Subfracción 14e: Estaba compuesta por un producto (XXXIV) que no requirió ulteriores purificaciones.

El análisis de los espectros RMN-¹H y ¹³C evidenció, además de la presencia de varias insaturaciones una cadena metilénica lineal, lo cual llevó a sospechar la presencia de un ácido graso poliinsaturado y uno saturado.

El análisis de las integraciones del espectro RMN-¹H permitió suponer la presencia de cinco dobles enlaces por molécula. A su vez, el análisis por CGL de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos por transesterificación permitió identificar los ácidos eicosapentaenoico (C_{20:5} ω-3) y palmítico (C_{16:0}).

La distribución de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol fue estudiada por EM/FAB⁺.

condiciones: ver Fig. 102,

pág. 123

t.r. 2.93: éster metílico

del ácido palmítico.

t.r. 13.59: éster metílico

del ác. C_{20:5} ω-3

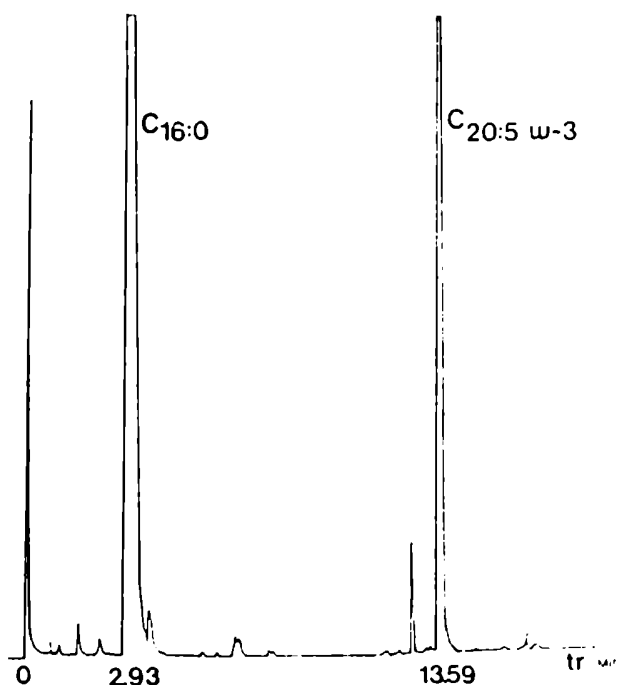


Fig. 105: CGL de los ésteres metílicos de la subfracción 14e.

Subfracción 14f: El producto mayoritario de esta subfracción, XXXV, fue purificado por CLAR en las condiciones utilizadas para el subfraccionamiento original.

El espectro RMN-¹H del producto XXXV, similar al del producto XXXIV permitió postular la presencia de un ácido graso poliinsaturado y un ácido saturado en la molécula. La comparación de integraciones permitió calcular cuatro dobles enlaces por molécula. El análisis por CGL de los ésteres metílicos de dichos ácidos grasos permitió identificar, tal cual lo esperado, ácido araquidónico y ácido palmítico.

Este producto también fue analizado por EM/FAB⁺.

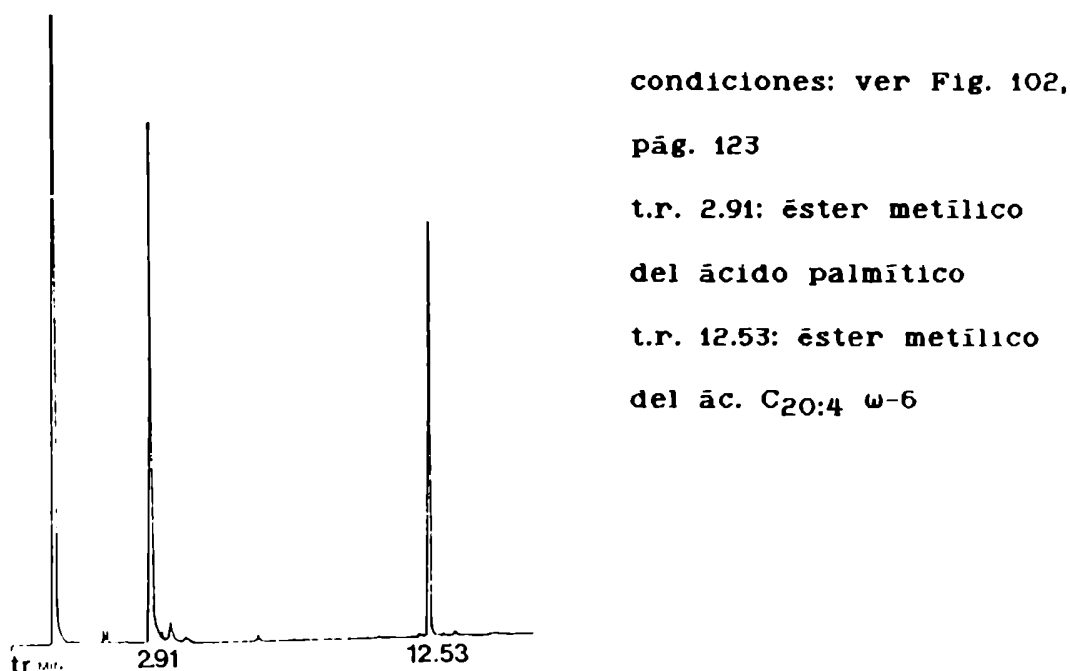


Fig. 106: CGL de los ésteres metílicos de la subfracción 14f.

Subfracción 14g: El producto mayoritario, (XXXVI), no requirió purificación posterior. Su espectro RMN-¹³C mostró solo dos señales correspondientes a carbonos olefínicos y el espectro RMN-¹H confirmó la presencia de un doble enlace.

En este caso, el análisis por CGL permitió identificar los ésteres de los ácidos palmítico y oleico.

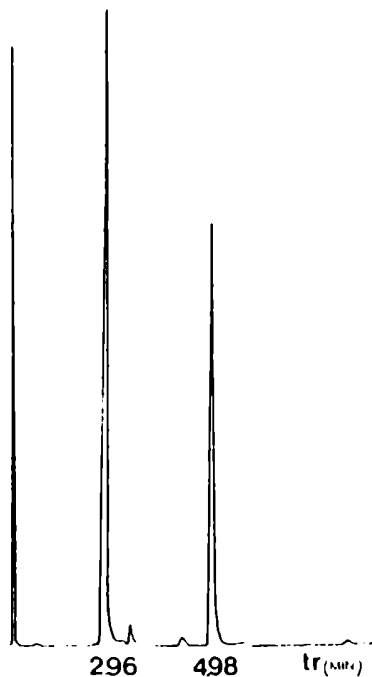


Fig. 107: CGL de los ésteres metílicos de la subfracción 14g. condiciones: ver Fig. 102, pág. 123

Subfracción 14h: El compuesto principal de esta subfracción, XXXVII, solo fue detectado en *Corallina officinalis* y no requirió mayor purificación. Su espectro RMN-¹H indicó la presencia solamente de ácidos grasos saturados. En este caso, el análisis por CGL de los ésteres metílicos obtenidos por transesterificación de XXXVII permitió detectar solamente ácido palmítico, (C₁₆:0).

Sobre la base de estos datos, el compuesto XXXVII fue identificado como 1,2-dl-O-(hexadecanoil)-3-O-β-D-galactopiranosil-sn-glicerol.

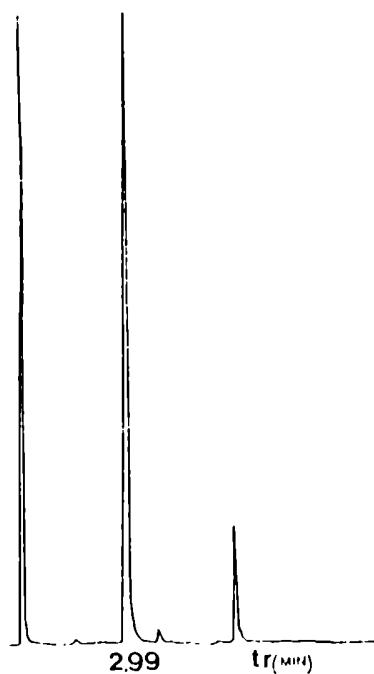


Fig. 108: CGL de los ésteres metílicos de la subfracción 14h. condiciones: ver Fig. 102, pág. 123.

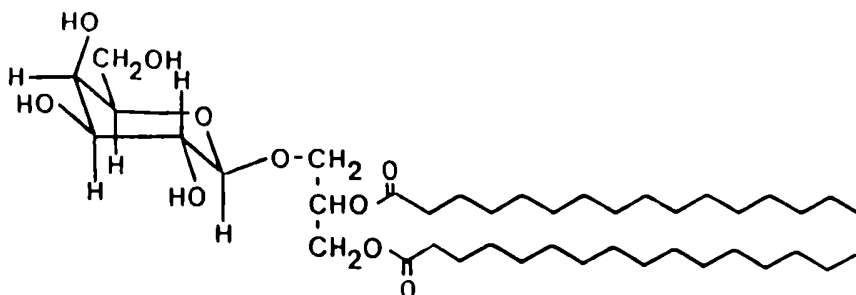


Fig. 109: Compuesto XXXVII.

Subfracción 14a: El producto presente en esta fracción, (XXXVIII), sólo pudo ser estudiado por RMN-¹H ya que fue aislado en muy baja cantidad y se descomponía con facilidad. Dicho espectro evidenció, por comparación de la integración de las señales de la porción glicosídica de la molécula que se trataba del glicósido de un disacárido.

Las señales correspondientes a los grupos acilo, en particular los metilos terminales (0.98 ppm, t, J = 7 Hz, 6 H), indicaron la presencia solamente de ácido eicosapentaenoico (EPA).

La presencia de digalactosildiglicéridos era predecible ya que se encuentran presentes en todos los tejidos fotosintéticos. Por lo tanto, se identificó tentativamente el producto XXXVIII como

1,2-di-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-
3-O-digalactosil-*sn*-glicerol.

Subfracción 14b: El producto presente en esta fracción, (XXXIX), resultó ser particularmente inestable, aún conservado a bajas temperaturas. El espectro RMN-¹H del mismo mostró las señales características de galactosildiglicéridos con grupos acilo poliinsaturados. La integración de las distintas señales indicó la presencia de ocho dobles enlaces por molécula. Las señales correspondientes a los grupos metilo terminales no aparecieron como tripletes sino como multipletes, lo cual permitió descartar la posibilidad de ácidos grasos ω-3. Estos datos indicaron la presencia de dos grupos acilo correspondientes al ácido araquidónico.

La labilidad exhibida por el producto XXXIX resultaba coherente con la estructura propuesta. Además, resultaba sorprendente el hecho de haber encontrado otros derivados de este ácido (los cuales mostraron siempre una inestabilidad mayor a los correspondientes del ácido eicosapentaenoico) en ésta y otras

fracciones de los extractos y no haber detectado el galactosildiglicérido correspondiente. Por lo tanto, el producto XXXIX fue identificado tentativamente como 1,2-di-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

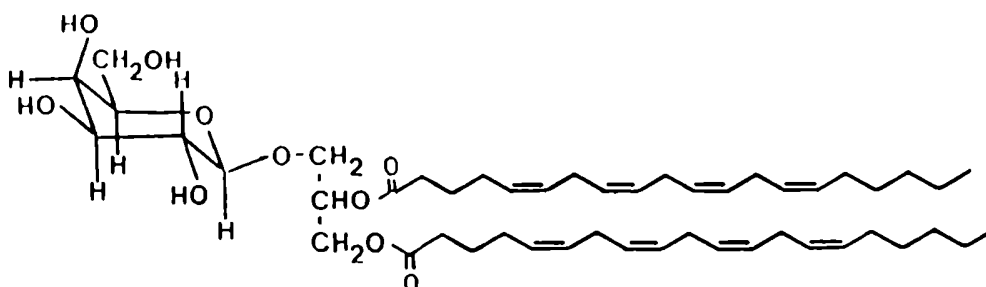


Fig. 110: Producto XXXIX,

producto	<u>C. Officinalis</u>	<u>C. elongata</u>	<u>Jania sp.</u>
XXXII	61.5	41.2	40.1
XXXIII	7.8	6.0	6.3
XXXIV	15.6	36.1	35.3
XXXV	4.5	5.6	6.6
XXXVI	3.1	6.1	6.0
XXXVII	1.6		
XXXVIII	3.7	2.6	2.8
Sin identificar	2.2	2.4	2.9

Tabla 5: Distribución de galactosildiglicéridos en las tres especies estudiadas.

ANALISIS DE LOS GALACTOLIPIDOS POR EM/FAB⁺

Para la elucidación estructural completa de los productos XXXIII, XXXIV, XXXV y XXXVI restaba conocer la distribución de los diferentes grupos acilo en las posiciones *sn-1* y *sn-2* del glicerol.

Se descartó la posibilidad de efectuar hidrólisis selectivas en posición *sn-1* con lipasa pancreática, ya que existían informes acerca de la falta de efectividad de esta enzima en el caso de ácidos grasos poliinsaturados [151,152].

Se utilizó la espectrometría de masa para la elucidación estructural de estos productos. Debido al alto peso molecular de los galactosildiglicéridos y a su labilidad térmica, no se observa en general su ion molecular en el EM obtenido utilizando impacto electrónico como sistema de ionización.

Por lo tanto se utilizó como sistema de ionización el método de bombardeo con átomos rápidos (FAB: "fast atom bombardment") para efectuar el análisis de este tipo de productos.

La técnica de FAB [175-178] es utilizada con gran éxito en el análisis de lípidos complejos, péptidos, polisacáridos y otras moléculas de alto peso molecular y/o termolábiles [179,180].

En esta técnica se logra la desorción de las moléculas del sólido como iones a la fase gaseosa, por impacto con un haz de átomos de Cs, Xe o Ar acelerados. La muestra se encuentra generalmente disuelta en una matriz líquida para mantener un flujo constante de la misma al punto de impacto y así aumentar el tiempo durante el cual se puede registrar el espectro [181].

El bombardeo con átomos rápidos genera tanto iones positivos como negativos y por lo tanto, esta técnica permite trabajar en ambas modalidades.

En el caso de FAB⁺ se observan iones cuasi-moleculares (M+H)⁺ producidos por reacciones ion molécula con la matriz líquida [162-164]. También se observan iones (M+Na)⁺ y (M+K)⁺ y los correspondientes (M+H+Na)⁺ y (M+H+K)⁺. Estos iones se pueden producir por contaminación de la matriz con sales de Na y K aunque también se suelen agregar intencionalmente estas sales para intensificar la producción de iones cuasi-moleculares o para distinguir un ion cuasi-molecular en caso de duda.

Debido a que la cantidad de energía entregada a la molécula es baja, esta alcanza el potencial de ionización pero no siempre el de disociación, lo cual implica que la producción de iones fragmentarios no es importante. Por esta razón, se pueden observar los iones cuasimoleculares en moléculas con PM superior a 3000 u.m.a. y las fragmentaciones observadas son sólo aquellas energéticamente muy favorecidas. Por ejemplo, en el caso de péptidos es posible determinar la secuencia de aminoácidos mediante los fragmentos que provienen de las sucesivas pérdidas de estas moléculas [179-185].

EM/FAB⁺ de galactolípidos: El ion que más información brinda en EM de glicerolípidos en espectros obtenidos por impacto electrónico es el ion (G3)⁺(ver capítulo de galactosildiglicéridos) que también se puede observar como (G3 + H)⁺.

Este ion corresponde a la pérdida del grupo acilo en posición *sn*-1 y del sustituyente en posición *sn*-3 (en este caso galactosa) (ver pag. 57) y permite determinar la distribución de grupos acilo en el caso de galactosildiglicéridos, ya que conserva el grupo unido en posición *sn*-2.

En el caso de EM/FAB⁺ de este tipo de productos, realizado en este trabajo por primera vez, el ion (G3 + H)⁺, representó el único fragmento de alta abundancia, constituyendo el pico base en la mayoría de los casos.

Todos los espectros EM/FAB⁺ de galactosildiglicéridos realizados para este Trabajo de Tesis, presentaron iones cuasimoleculares (M + H + Na)⁺ de alta abundancia.

Compuesto XXXII: Presentó un ion cuasimolecular *m/z* 847, correspondiente a una fórmula molecular C₄₉H₇₄O₁₀, de acuerdo a lo esperado.

El ion *m/z* 360 pico base del espectro, corresponde al ion (G3 + H)⁺ ya descrito, correspondiente al ácido eicosapentaenoico (EPA).

Otros iones importantes del espectro están esquematizados en la figura 110:

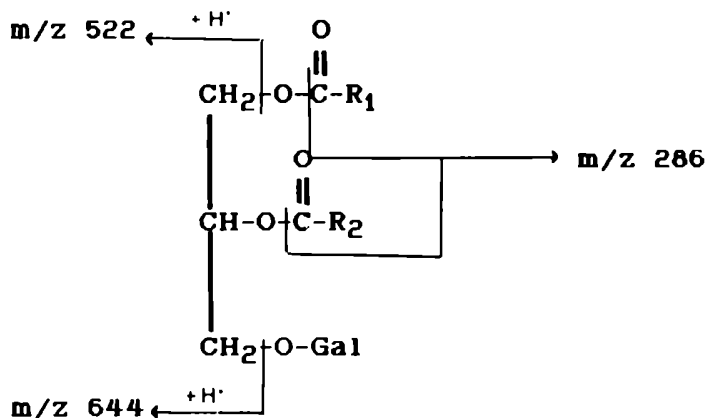


Fig. 111: Fragmentaciones en EM/FAB⁺ del compuesto XXXII.

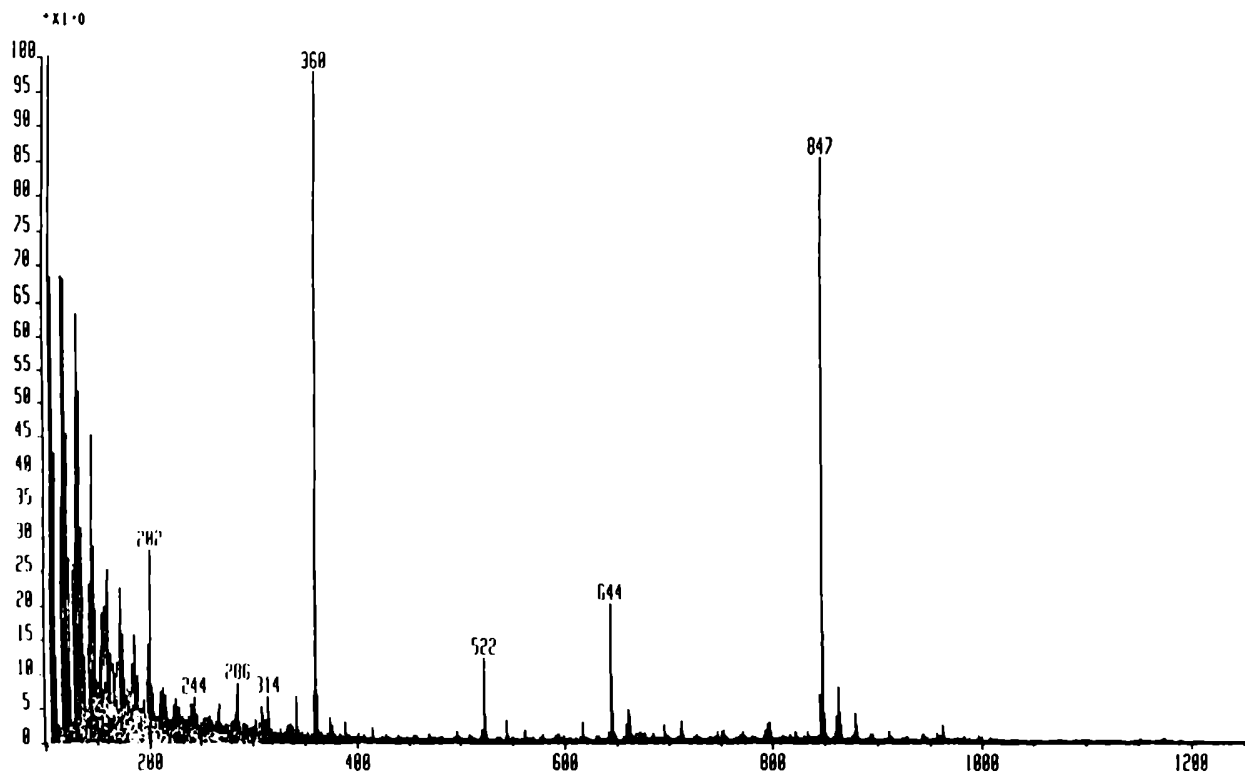


Fig. 112: EM/FAB⁺ del compuesto XXXII.

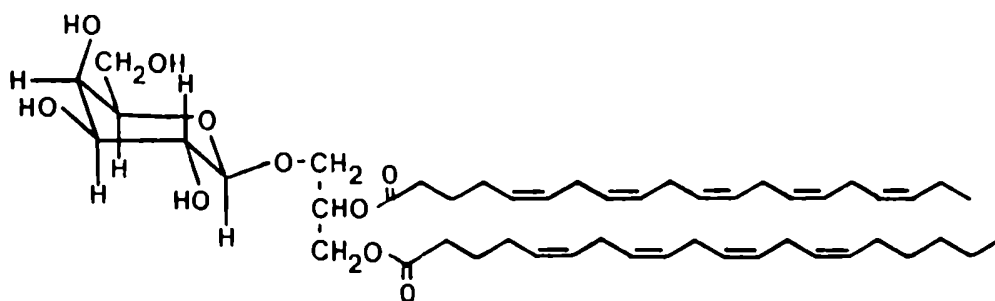
Producto XXXIII: Se observó el ion cuasimolecular m/z 849, correspondiente a una fórmula molecular $C_{49}H_{76}O_{10}$, de acuerdo con lo esperado.

En este caso se observaron los iones $(G3 + H)^+$, m/z 360 y m/z 362 (correspondientes a los ácidos eicosapentaenoico y araquidónico respectivamente) en una relación 2:1, lo cual indicó la presencia de una mezcla de isómeros con preponderancia del compuesto con el ácido $C_{20:5}$ en posición *sn-2*.

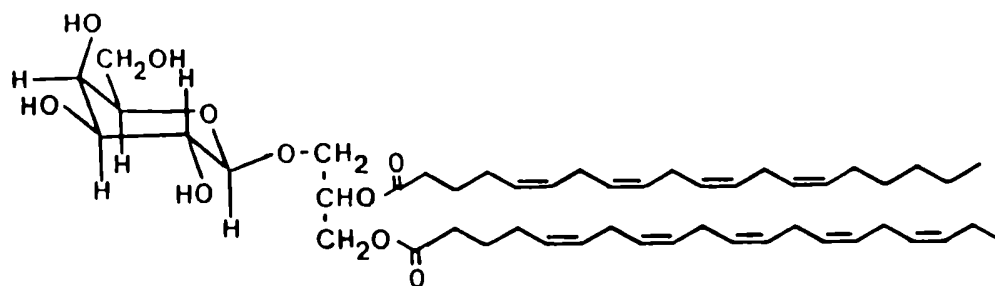
Sobre la base de estos datos, el producto XXXIII fue caracterizado como una mezcla 2:1 de los isómeros XXXIIIa y XXXIIIb.

XXXIIIa: 1-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-
 2-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-
 3-O- β -D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

XXXIIIb: 1-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-
 2-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-3-O- β -D-
 galactopiranosil-*sn*-glicerol.



xxxiii a



xxxiii b

Fig. 113: Compuestos XXXIIIa y XXXIIIb.

Producto XXXIV: Presentó el ion cuasimolecular m/z 801 correspondiente a una fórmula molecular $C_{45}H_{76}O_{10}$, coherente con la presencia de grupos acilo correspondientes a los ácidos palmítico y eicosapentaenoico.

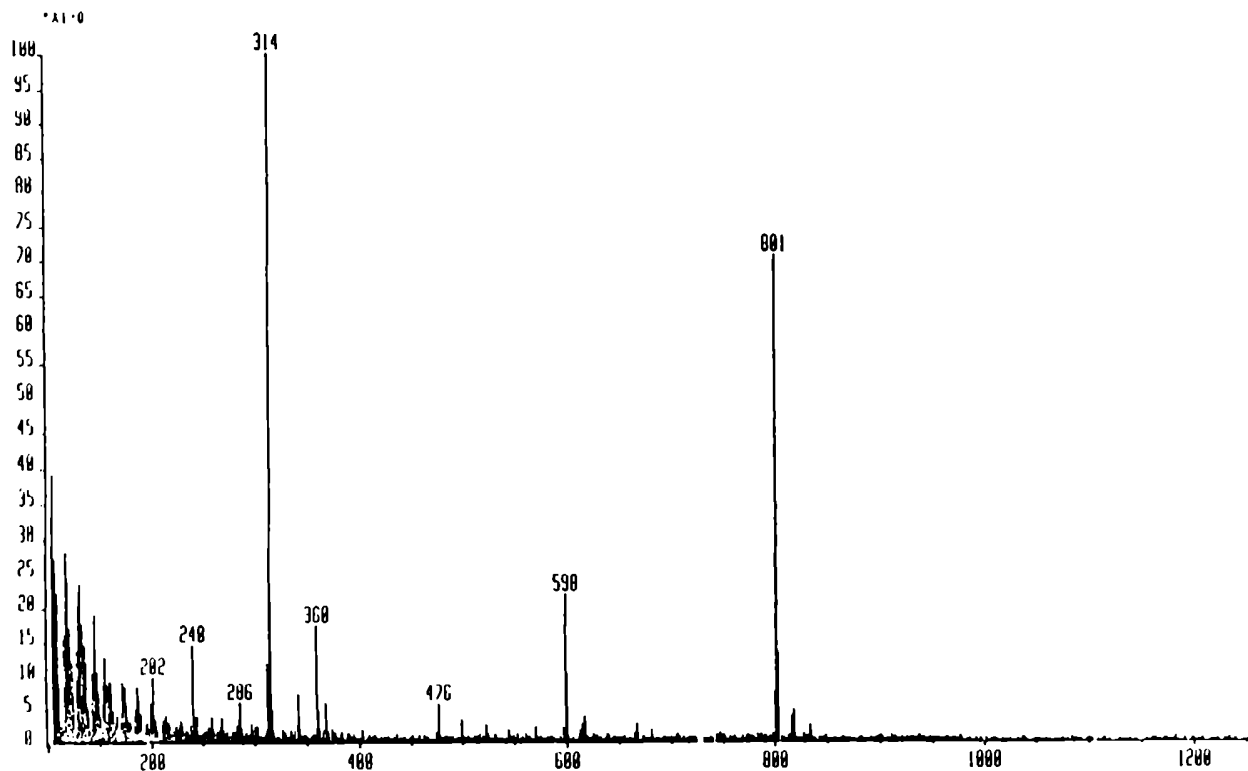


Fig. 114: EM/FAB⁺ del producto XXXIV.

En cuanto a los iones $(G3 + H)^+$, se observó una gran preeminencia del ion m/z 314 (100 %) sobre m/z 360 (15 %). Ello indicó que el isómero mayoritario poseía el grupo palmitoilo en posición *sn*-2.

Otros iones importantes fueron los señalados en la figura 115.

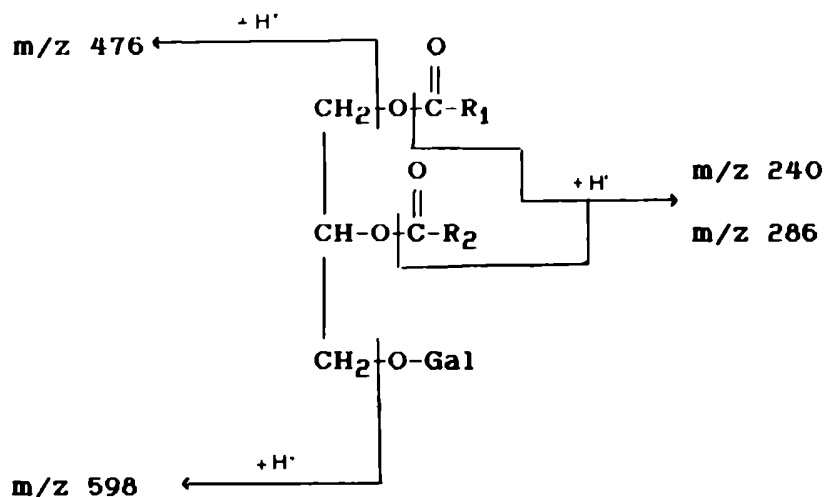


Fig. 115: Fragmentaciones en EM/FAB⁺ del producto XXXIV.

En particular, el producto XXXIV fue caracterizado como un 87 % de XXXIVa y 13 % de XXXIVb.

XXXIVa: 1-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-2-O-hexadecanoil-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

XXXIVb: 1-O-hexadecanoil-2-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

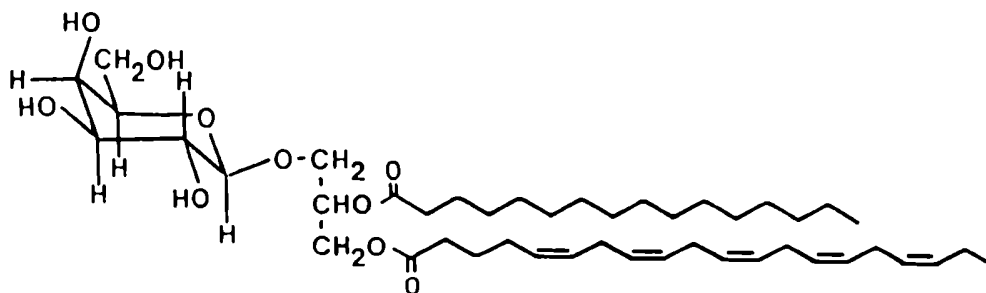


Fig.116: Compuesto XXXIVa.

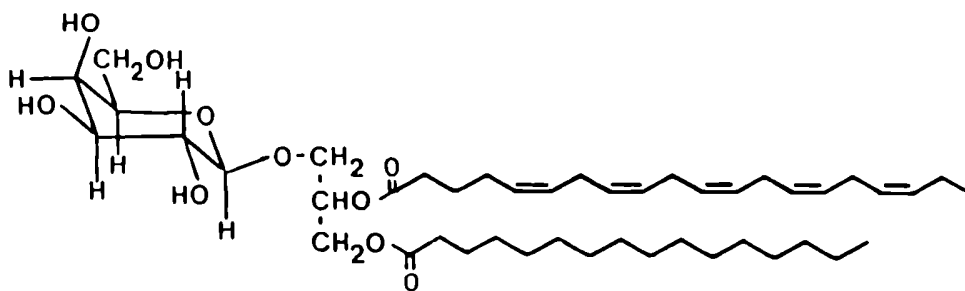


Fig. 117: Compuesto XXXIVb.

Estudios sobre el EM del producto XXXIV: Se realizó el EM/IE de esta sustancia para comparar con el espectro EM/FAB[†].

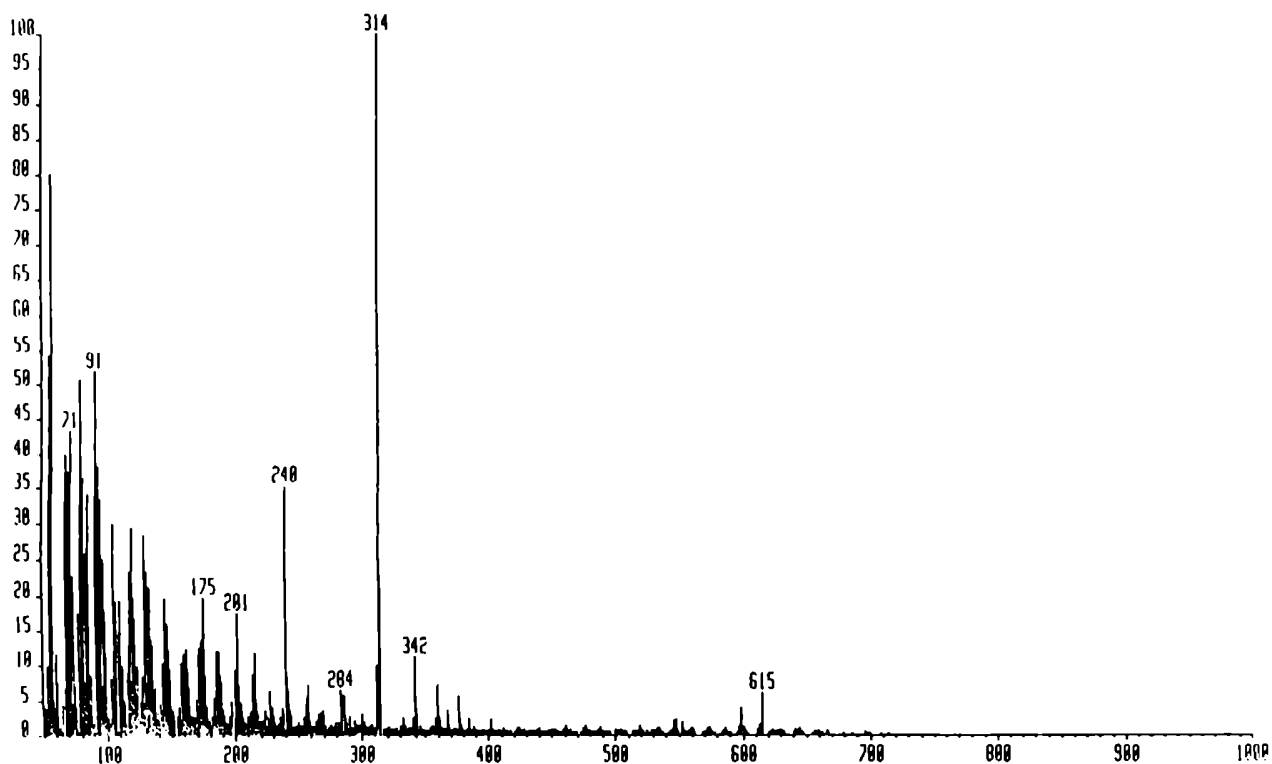


Fig. 118: EM obtenido por impacto electrónico del producto XXXIV.

La comparación de ambos espectros puso en evidencia ciertas diferencias:

- en el espectro obtenido por impacto electrónico no se observó el ion molecular, tal como era predecible.
- el ion de mayor m/z en el espectro de impacto electrónico fue m/z 615, proveniente de la siguiente fragmentación:

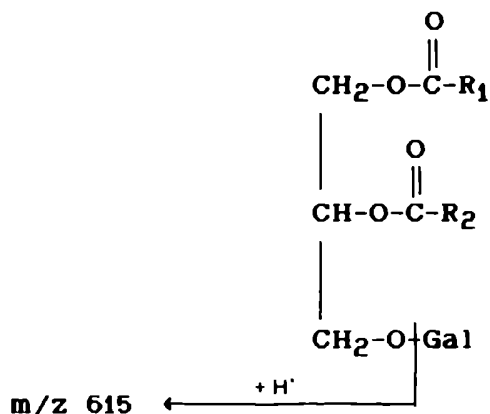


Fig. 119: Origen del ion m/z 615.

- en el espectro obtenido por impacto electrónico, no se observaron los iones m/z 598 y m/z 476, ya descritos.
- se observó el ion m/z 342 (probablemente m/z 360-H₂O)

En ambos espectros se observó el ion m/z 360 como pico base y también se observó el ion m/z 240, ya descrito.

Estudios preliminares por EM/EM del compuesto XXXIV :

Se realizaron algunos estudios preliminares de secuencias genéticas de los principales fragmentos del EM/IE del producto XXXIV.

Al enfocar el ion m/z 615, se observó la aparición de los iones m/z 314 y m/z 284, ambos con baja abundancia.

Asimismo, al enfocar el ion m/z 598 (de baja abundancia en el EM/IE), se obtuvo el ion m/z 314, también con baja abundancia, pero no se observó el ion m/z 284. Estos resultados indicaron que el ion m/z 314, se forma no sólo a partir del ion molecular, sino también a partir de algunos iones fragmentarios, aunque en baja proporción.

El ion m/z 284, provendría del grupo acilo de $C_{20:5}$ (preponderante en posición *sn-1*) por pérdida de un átomo de hidrógeno.

Al enfocar el ion m/z 314, se observaron una serie de iones (m/z 57,67,71,81,85,95,109), correspondientes a las fragmentaciones de la cadena hidrocarbonada del ácido palmítico.

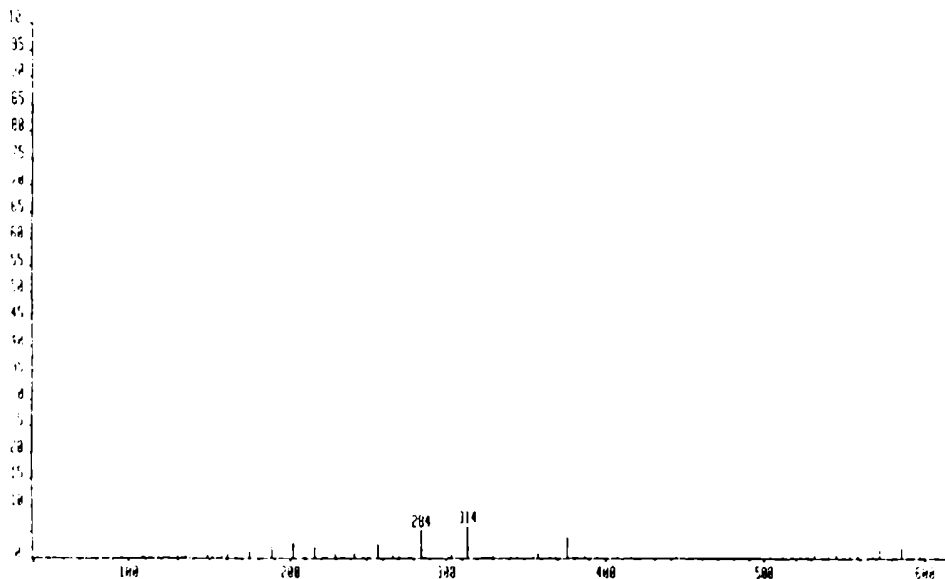


Fig. 120: Iones hijo de m/z 615.

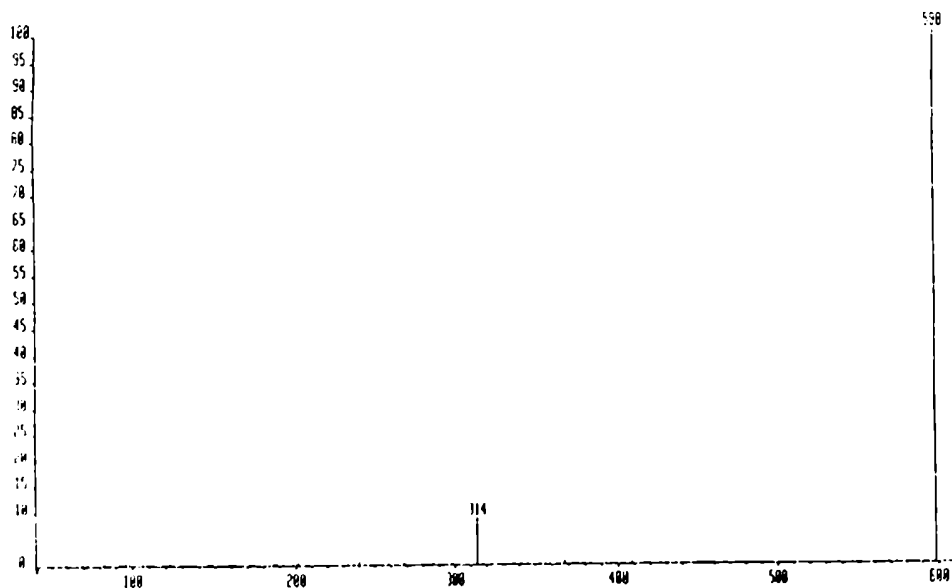


Fig. 121: Iones hijo de m/z 598.

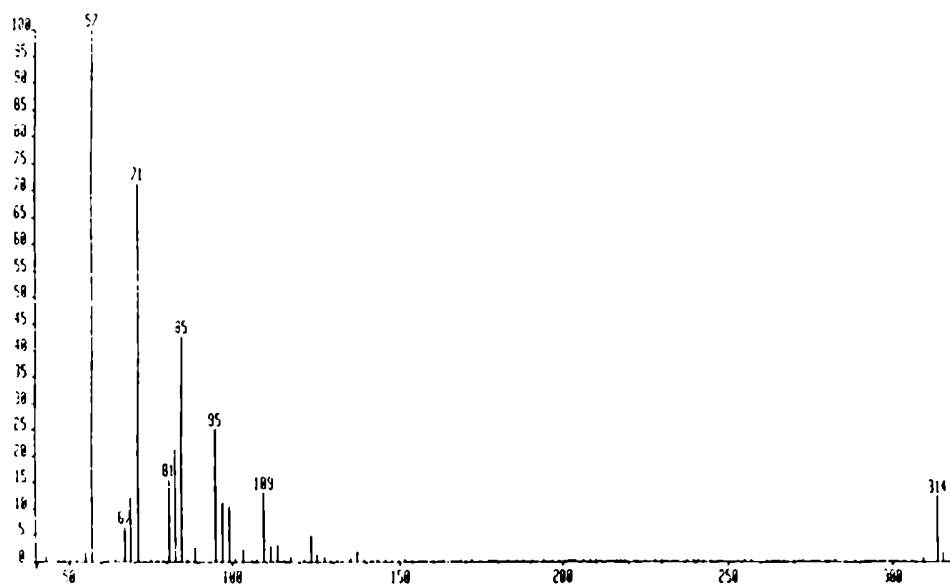


Fig. 122: Iones hijo de m/z 314.

Producto XXXV: Presentó un ion cuasimolecular m/z 803, correspondiente a una fórmula molecular $C_{45}H_{78}O_{10}$, coherente con la presencia de grupos acilo correspondientes a los ácidos palmítico y araquidónico.

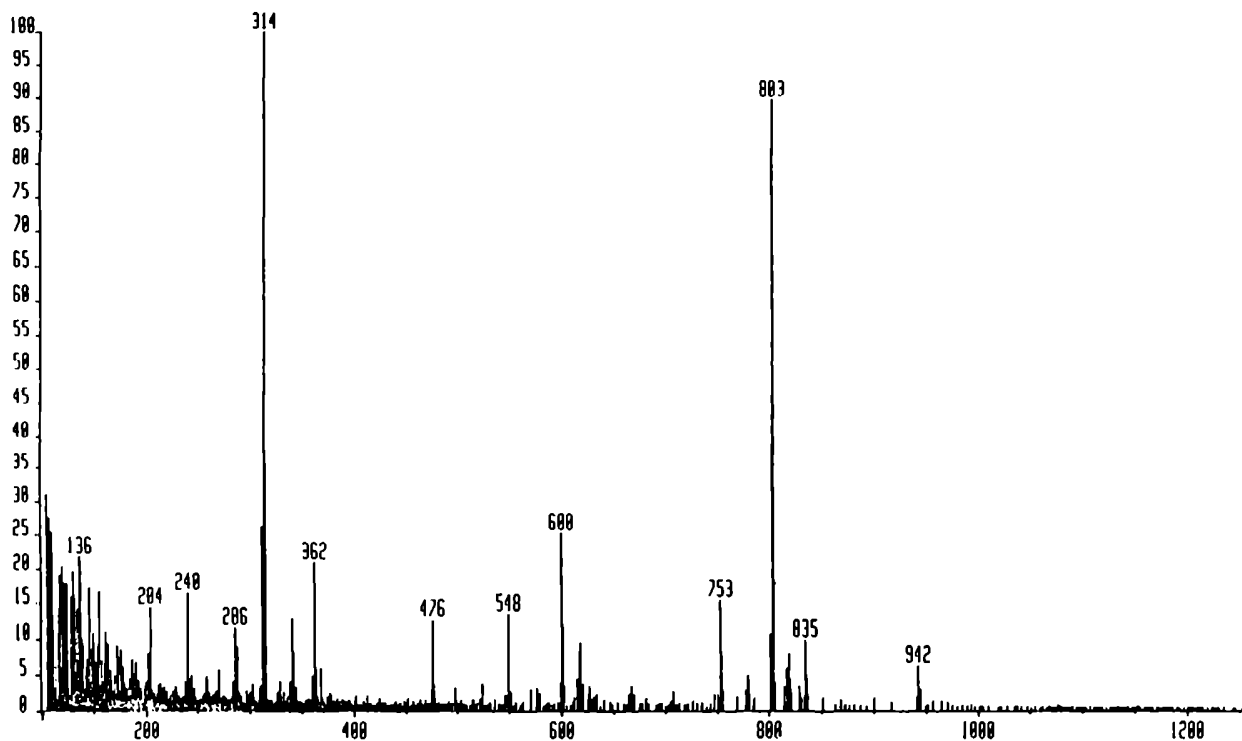
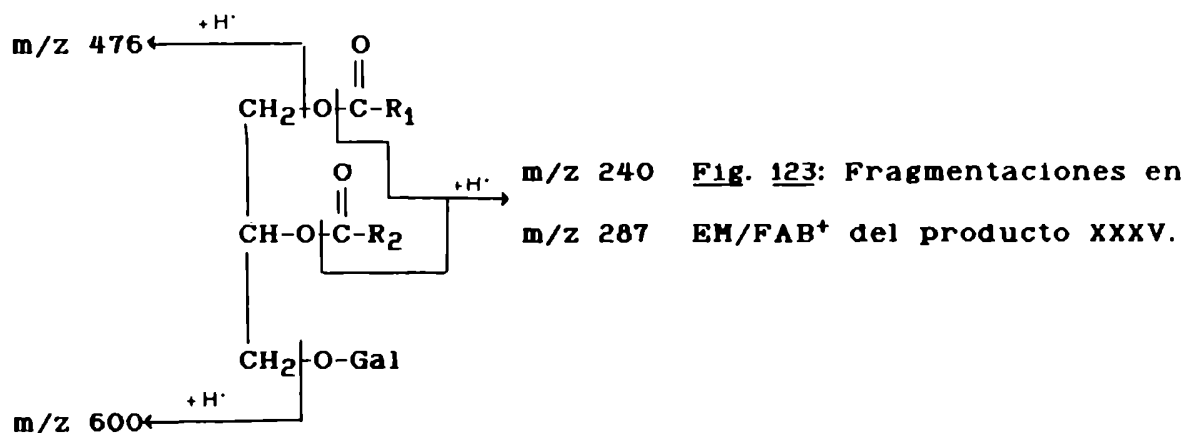


Fig. 122: EM/FAB⁺ del producto XXXV.

En la zona de iones correspondiente a (G3 + H)⁺, se observaron los iones m/z 314 (100 %) y 362 (20%). Esto indicó una gran preeminencia del isómero con el grupo acilo correspondiente al ácido palmítico en posición *sn*-2.

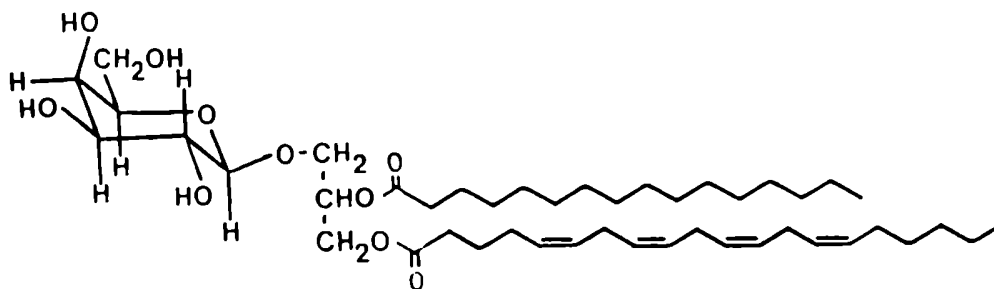
Otros iones importantes del espectro fueron:



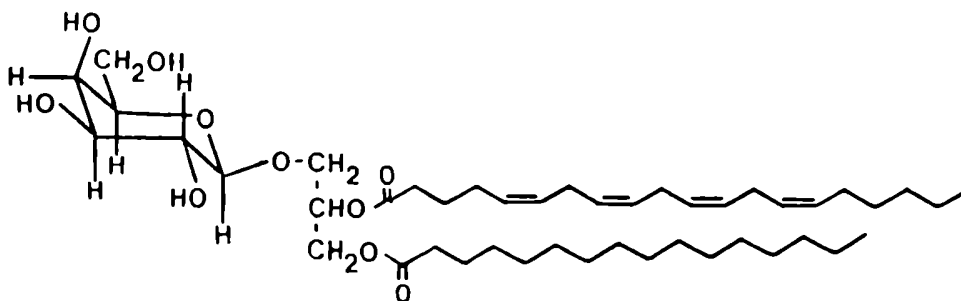
El producto XXXV quedó identificado como una mezcla (85:15) de los isómeros XXXVa y XXXVb.

XXXVa : 1-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-2-O-hexadecanoil-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

XXXVb : 1-O-hexadecanoil-2-O-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.



xxxv a



xxxv b

Fig. 124: Compuestos XXXVa y XXXVb.

En el mismo espectro, se observaron también iones correspondientes a otro producto. Un ion cuasimolecular m/z 753 correspondiente a una fórmula molecular $C_{41}H_{78}O_{10}$, indicó una estructura de galactosildiglicérido con grupos acilo

correspondientes a los ácidos $C_{16:0}$ y $C_{16:1}$, lo cual se vio reafirmado por la presencia del ion m/z 548, correspondiente a la ruptura C-O de la posición *sn*-3. Este producto no pudo ser aislado debido a que se encontraba en muy baja cantidad.

EM/FAB del producto XXXVI: Se observó un ion cuasimolecular m/z 781, correspondiente a una fórmula molecular $C_{43}H_{80}O_{10}$ lo cual permitió confirmar la presencia de grupos acilo correspondientes a $C_{16:0}$ y $C_{18:1}$. Se observaron los iones m/z 314 y m/z 340 ($[G3 + H]^+$) en cantidades equivalentes, lo cual indicó una falta de especificidad en la distribución de los grupos acilo en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2.

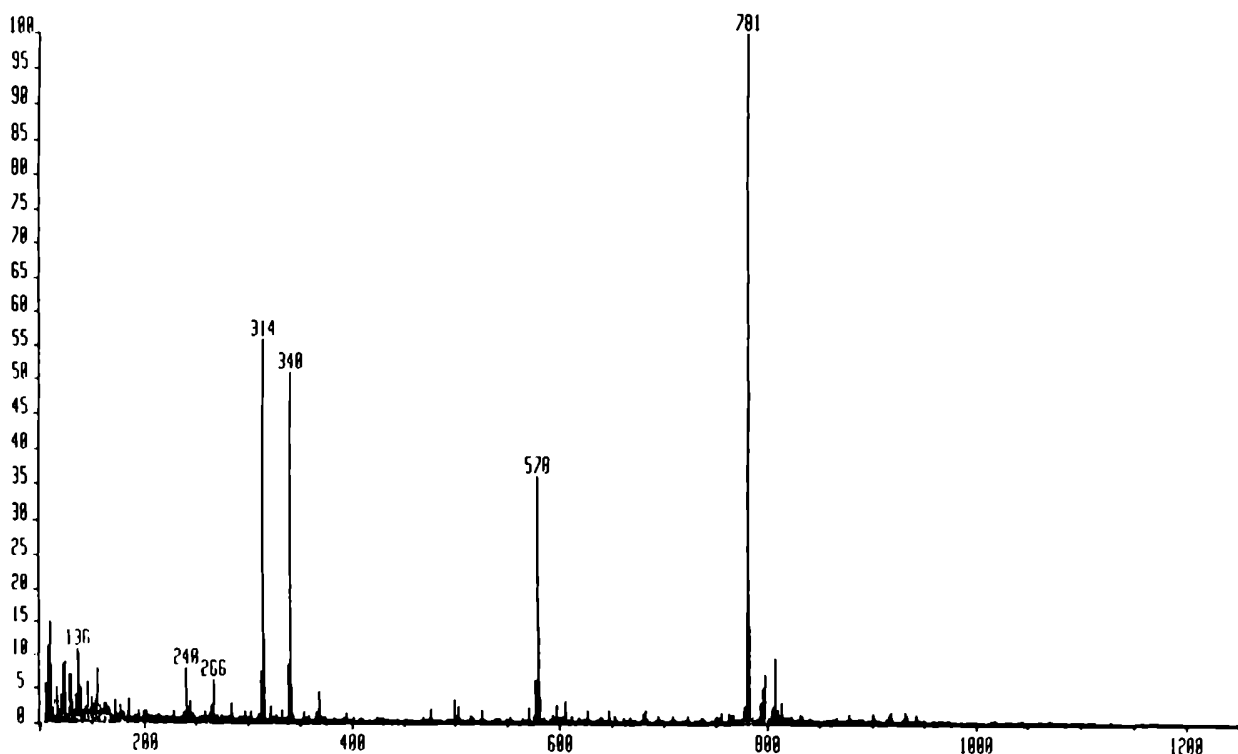


Fig. 125: EM/FAB⁺ del producto XXXVI.

Otros iones observados en el espectro fueron los siguientes:

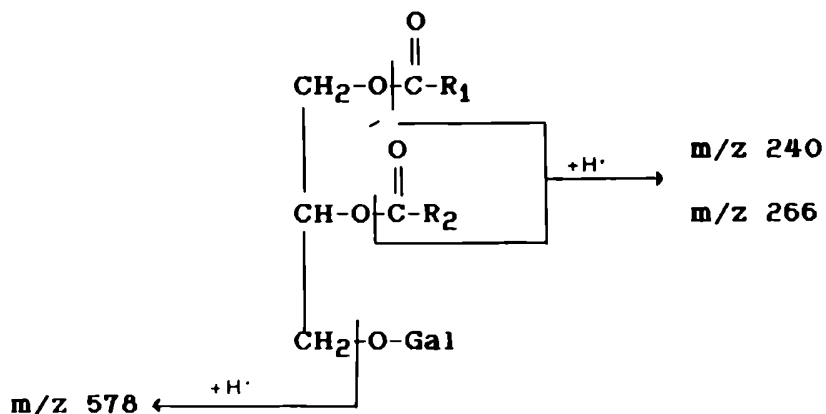


Fig. 126: Fragmentaciones en EM/FAB⁺ del producto XXXVI.

El producto XXXVI fue identificado entonces como una mezcla equimolecular de los isómeros XXXVIa y XXXVIb.

XXXVIa : 1-O-[(9Z)-octadeca-9-enoil]-2-O-hexadecanoil-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol

XXXVIb: 1-O-hexadecanoil-2-O-[(9Z)-octadeca-9-enoil]-3-O-β-D-galactopiranosil-*sn*-glicerol.

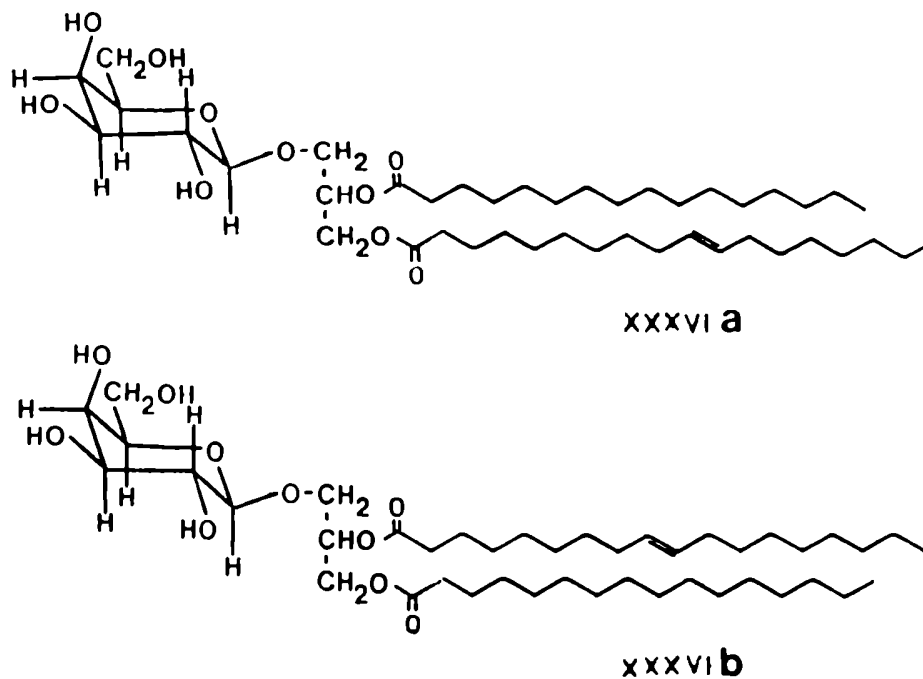


Fig. 127: Compuestos XXXVIa y XXXVIb.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los extractos de las tres especies estudiadas presentaron en líneas generales la misma composición. Se comentarán los resultados obtenidos para cada familia de compuestos. Se considerará también la implicancia de los mismos desde el punto de vista quimiotaxonómico.

HIDROCARBUROS:

El estudio de los hidrocarburos presentes en organismos marinos reviste importancia fundamentalmente en estudios de ecología química marina.

Estos compuestos debido a su estabilidad, son útiles como trazadores en procesos dinámicos de interacción entre distintas especies marinas. En el caso de las algas, productoras primarias en su medio, pueden ser útiles para el seguimiento de la cadena alimentaria. Por otra parte, el estudio de los mismos permite evaluar el grado de contaminación de las aguas debido a combustibles minerales.

Estudios sistemáticos realizados sobre una amplia variedad de especies [186-188] permitieron concluir lo siguiente en cuanto a la composición de la fracción hidrocarbonada de los extractos:

- en algas rojas se observa un gran predominio de hidrocarburos saturados sobre insaturados (> 95 %). El hidrocarburo mayoritario en casi todos los casos es n-heptadecano (>96 %).
- en algas verdes, los hidrocarburos insaturados son predominantes.

- en algas pardas, la composición en hidrocarburos es muy variable, incluso en cuanto a la proporción de hidrocarburos saturados e insaturados. Los hidrocarburos saturados mas abundantes son n-heptadecano y n-pentadecano.

Los resultados obtenidos para las tres especies estudiadas mostraron, considerando compuestos no terpenoides, casi un 100 % de hidrocarburos saturados. Los compuestos no saturados se encontraron sólo a nivel de trazas.

En las tres especies estudiadas, se observó la presencia de n-heptadecano como hidrocarburo mayoritario en porcentajes que oscilaron alrededor de un 99 %. El único hidrocarburo saturado minoritario detectado fue, en todos los casos, n-pentadecano.

	<u>C. officinalis</u>	<u>C. elongata</u>	<u>Jania sp.</u>
n-C ₁₅ H ₃₂	0.1 %	0.8 %	0.4 %
n-C ₁₇ H ₃₆	99.9 %	99.2 %	99.6 %

Tabla 6: Hidrocarburos saturados detectados en las tres especies estudiadas.

Estos resultados fueron coherentes con el patrón observado para la composición en hidrocarburos de algas rojas.

La biosíntesis de n-heptadecano ha sido estudiada en el alga *Anacystis nidulans* (cyanophyceae) [189] y se comprobó que este compuesto se formaba por descarboxilación del ácido esteárico.

El hecho de que el ácido esteárico (C_{18:0}) sea un componente minoritario en la mezcla de ácidos grasos libres en las tres especies estudiadas, no permite descartarlo como precursor biosintético de n-heptadecano, ya que una situación similar se verificó en el alga *Anacystis nidulans*. Estos resultados indicarían la eficiencia de este proceso biosintético.

ESCUALENO:

Este compuesto, aislado e identificado en las tres especies estudiadas, fue pocas veces informado como componente de extractos de algas. En particular se lo detectó en el alga parda *Fucus vesiculosus* [190].

Fattorusso y colaboradores [191] aislaron del alga verde *Caulerpa prolifera*, escualeno-10,11-epóxido, escualeno-6,7-epóxido y escualeno-2,3-epóxido, aunque no pudieron detectar escualeno sin epoxidar.

En este caso, el aislamiento de escualeno en las tres especies de Corallinaceae estudiadas, representa el primer informe de la presencia de este compuesto en algas rojas.

ESTERES ETILICOS DE ACIDOS GRASOS

La presencia de estos compuestos en los extractos de las tres especies estudiadas no tiene implicancia quimiotaxonómica, ya que podrían ser artefactos formados con el etanol utilizado como solvente de extracción.

Se ha comprobado que los monogalactosildiglicéridos son rápidamente metabolizados cuando la estructura celular ha sido dañada. Se conocen varias reacciones enzimáticas en las cuales los grupos acilo de los galactolípidos son transferidos a diversos grupos aceptores, entre ellos agua y alcoholes [192-194]. En estos casos, los productos serían ácidos grasos libres y ésteres respectivamente.

Las condiciones de pH y temperatura en las que se realizó el procesamiento del material vegetal y el extracto (ver parte experimental) no justificarían la formación de ésteres en las cantidades encontradas. Por otra parte, el éster etílico mayoritario fue el correspondiente al ácido C_{20:5}, mayoritario en la fracción de galactolípidos de las tres especies estudiadas. Este ácido sin embargo fue identificado como componente minoritario del conjunto total de ácidos grasos libres de las tres especies.

Estos resultados permitirían postular la formación de estos artefactos a partir de los galactolípidos presentes por vía enzimática y no por esterificación de los ácidos grasos libres.

FITOL:

La presencia de este compuesto, fundamental en los procesos fotosintéticos ya que forma parte de la estructura de las clorofilas, ha sido informada en diversas clases de algas [195,196].

En Rhodophyceae, la presencia de *trans*- y *cis*- fitol ha sido detectada en el alga *Gracilaria andersoniana* [197], constituyendo la primera ocasión en que era detectado el isómero *cis*- en un organismo natural.

En las tres especies estudiadas sólo se detectó el isómero *trans*-, que es el usualmente encontrado.

ACIDOS GRASOS:

En las tres especies estudiadas se observó una composición similar en este tipo de compuestos. Los principales ácidos grasos detectados fueron C_{16:0}, C_{18:1}, C_{20:4} y C_{20:5}, lo cual concuerda con los datos informados en literatura [130,198-199].

En particular, en un estudio sobre la composición de ácidos grasos totales de *Corallina officinalis*, Johns y colaboradores [64] informaron los siguientes resultados:

C _{20:5} W-3:	32 %	C _{14:0} :	3 %
C _{16:0} :	30 %	C _{16:1} :	2 %
C _{20:4} W-6:	12 %	C _{16:4} :	1 %
C _{18:1} :	6 %	C _{18:0} :	1 %

Además detectaron una gran variedad de ácidos poliinsaturados C_{16:2}, C_{16:3}, C_{18:3}, C_{20:2}, C_{20:3} en cantidades inferiores al 1 %.

En ninguna de las tres especies estudiadas en este Trabajo de Tesis se realizó un análisis de ácidos grasos totales provenientes de la saponificación del extracto crudo, sino que se identificaron los ácidos constituyentes de las distintas sustancias de interés.

Por lo tanto, se analizaron los ácidos grasos libres y aquellos componentes de monoglicéridos y galactosildiglicéridos.

Se observó que si bien en líneas generales los resultados concordaban con los datos de literatura para ácidos grasos totales, estos compuestos no se encontraban uniformemente distribuidos en las distintas clases de lípidos en estudio mencionados.

Acidos grasos libres:

La composición porcentual de los ácidos grasos libres se encuentra en la tabla 3 (pág. 76) del capítulo "Descripción de la labor realizada".

La observación de los resultados indica una gran preponderancia de ácidos grasos saturados.

	<u>C. officinalis</u>	<u>C. elongata</u>	<u>Jania sp.</u>
% ác. gr. saturados	67.6	67.1	65.4
% ác. gr. insaturados	32.4	32.9	34.6

Tabla 7: Porcentaje de ácidos grasos insaturados sobre ácidos grasos libres totales.

Monoglicéridos:

Los resultados obtenidos en este caso revelaron una gran preeminencia de ácidos grasos poliinsaturados:

	<u>C. officinalis</u>	<u>C. elongata</u>	<u>Jania sp.</u>
C _{20:5} ω-3	49.3 %	42.3 %	45.7 %
C _{20:4} ω-6	38.0 %	36.8 %	40.1 %
C _{16:0}	9.3 %	14.1 %	10.1 %
C _{18:1}	3.4 %	6.8 %	4.1 %
ác. gr. saturados	9.3 %	14.1 %	10.1 %
ác. gr. insaturados	90.7 %	85.9 %	89.9 %

Tabla 8: Porcentajes de ácidos grasos en monoglicéridos.

Galactosildiglicéridos:

Los porcentajes de los distintos ácidos grasos, independientemente de la posición relativa que ocuparan en el esqueleto del glicerol, indicó una preponderancia de ácidos grasos insaturados, no tan marcada como en el caso de los monoglicéridos.

	<u>C. officinalis</u>	<u>C. elongata</u>	<u>Jania sp.</u>
C _{20:5} ω-3	72.9 %	63.7 %	62.4 %
C _{20:4} ω-6	10.6 %	10.4 %	9.4 %
C _{16:0}	14.1 %	22.2 %	24.8 %
C _{18:1}	2.4 %	3.7 %	3.4 %
ác. gr. saturados	14.1 %	22.2 %	24.8 %
ác. gr. insaturados	85.9 %	77.8 %	75.2 %

Tabla 9: Porcentaje de los distintos ácidos grasos en galactosildiglicéridos.

Los resultados obtenidos indicaron claramente una distribución selectiva de los diferentes ácidos grasos en las distintas clases de lípidos estudiadas y concuerdan con los datos informados en literatura [130].

El ácido palmítico se encuentra preferentemente como ácido libre, mientras que el $C_{20:5\omega-3}$ se encuentra en mayor porcentaje como constituyente de galactosildiglicéridos.

El ácido araquidónico se encuentra uniformemente distribuido entre las distintas clases de lípidos estudiadas, en mayor proporción como componente de monoglicéridos sin llegar a ser el componente mayoritario.

Si se consideran las cantidades relativas de las distintas clases de lípidos estudiadas, se obtendría una composición de ácidos grasos totales similar a las informadas en literatura. En este Trabajo de Tesis no se efectuó dicho cálculo, ya que los componentes de las ceras no fueron analizados.

ESTEROLES:

Desde los primeros trabajos de Tsuda y colaboradores [200-204] la composición esteroideal de algas rojas ha sido extensamente estudiada [205-222].

A diferencia de lo observado en las clases Phaeophyceae y Chlorophyceae [211,214,220] la composición esteroideal de Rhodophyceae sigue un patrón relativamente simple.

En la mayor parte de las especies estudiadas se encuentra colesterol como componente mayoritario en porcentajes superiores al 90 %. Los primeros trabajos publicados sobre este tema indicaban que el colesterol era el único esterol presente en algas rojas y que éstas no biosintetizaban esteroides C-28 y C-29. Incluso se postuló que estas algas carecían de las enzimas capaces de efectuar la alquilación en C-24 [206].

El desarrollo de nuevas técnicas analíticas principalmente CGL-EM, permitió la identificación de varios componentes minoritarios en las mezclas de dichos compuestos, entre ellos esteroides C-26, C-27 y C-28 [59,207,210,211].

En ciertas especies de algas rojas se ha observado que el componente mayoritario no es colesterol.

En el alga *Rhodymenia palmata* (Orden Rhodymeniales), se detectó colestá-5,24-dien-3 β -ol (IX) como componente mayoritario en casi todos los lotes analizados, aunque se observó una marcada variación estacional en el contenido de este compuesto [207,208].

La presencia de colestá-5,24-dien-3 β -ol como componente principal de la fracción esteroidal también ha sido informada en *Gigartina acicularis* y *Schizymenia dubyi* (Orden Gigartinales) [59] y en *Porphyra purpurea* (Orden Bangiales) [206].

En *Hypnea japonica* e *Hypnea musciformis* el componente esteroidal mayoritario es 22-*trans*-colestá-5,22-dien-3 β -ol (VIII). Este compuesto, si bien se lo detecta como componente minoritario en numerosas especies de algas rojas, se encuentra circunscripto como componente mayoritario a la familia Hypnaceae (Orden Gigartinales) [59].

Otro caso notable es el de algunas especies pertenecientes a la familia Gelidiaceae (Orden Gelidiales), en particular *Gelidium amansii*, *Gelidium subcostata* y *Pterocladia tenuis*. En estas especies los componentes principales de la fracción esteroidal son estanoles y el componente mayoritario en todas ellas es colestanol [214].

Los únicos casos en que se ha detectado como componente principal un esteroide C-28, pertenecen a la familia Rhodomelaceae (Orden Ceramiales). En *Rytiphloea tinctoria* se detectó 24 ξ -metilcolest-5-en-3 β -ol (XII) como componente principal de la fracción esteroidal, mientras que en *Vidalia volubilis*, *Lenormandia prolifera* y *Amansia glomerata*, el principal componente detectado fue 24-metilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (X) [216].

Estos resultados permitieron descartar la teoría de que las algas rojas no podían producir alquilaciones en C-24 aunque en la mayoría de las Rhodophyceae este proceso es poco importante y los esteroides C-28 y C-29 son componentes minoritarios.

Los ejemplos citados precedentemente constituyen los únicos casos informados hasta el presente en que el esteroide mayoritario de un alga roja no sea colesterol.

En las Cryptonemiales, Orden que incluye la familia Corallinaceae a la cual pertenecen las tres especies estudiadas, siempre se informó la presencia de colesterol como principal componente esteroidal. Los resultados obtenidos en este caso (ver tabla 4, pág. 86) concuerdan en general con este esquema, incluso en la identidad de los componentes minoritarios.

El único componente destacable entre los esteroides analizados en este Trabajo de Tesis, fue *24-nor-22-trans-colesta-5,22-dien-3 β -ol* (VII). Este compuesto fue detectado en el alga roja *Rhodymenia palmata*, pero su biosíntesis por este organismo no pudo ser demostrada [212].

Una posible ruta biosintética para este compuesto implicaría sucesivas de-alquilaciones de una cadena lateral con un grupo metilo en C-24 [221].

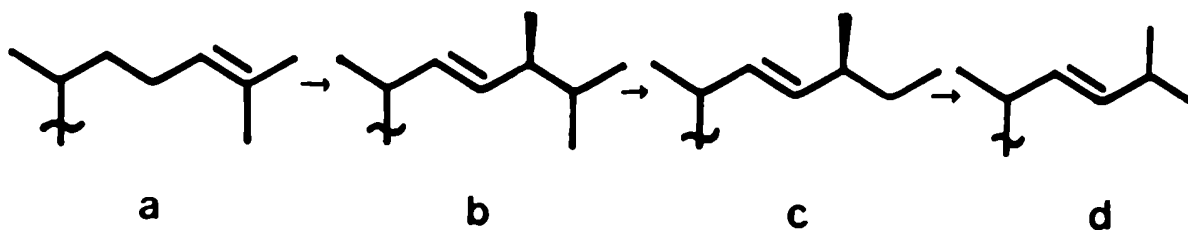


Fig. 128: Posible origen biogénico de esteroides C-26.

Esta hipótesis no ha sido aún verificada experimentalmente. Otra teoría sugiere que los esteroides C-26 podrían provenir de organismos contaminantes, probablemente diatomeas [222].

La observación microscópica de los lotes de algas estudiadas no reveló la presencia de diatomeas en cantidades significativas como para corroborar esta hipótesis. Por otra parte, el compuesto VII, fue detectado en cantidades comparables a las de *22-trans-colesta-5,22-dien-3 β -ol* (VIII), *colesta-5,24-dien-3 β -ol* (IX), *metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol* (X) y *24 ϵ -etilcolest-5-en-3 β -ol* (XV),

compuestos que fueron detectados en baja proporción en la mayor parte de las algas rojas estudiadas hasta la fecha.

Indudablemente, será necesario realizar estudios biosintéticos mas profundos teniendo en cuenta una posible variación estacional para aclarar el origen de este esteroi C-26.

COMPUESTOS FENOLICOS:

La presencia de C-7 fenoles es característica en ciertas familias de algas rojas [47] principalmente como cresoles, alcoholes bencílicos hidroxilados, benzaldehídos y ácidos benzoicos, muchos de ellos halogenados.

En general, en el caso de compuestos monohidroxilados, se trata de p-hidroxi-derivados y en el caso de los dihidroxilados, de 3,4-dihidroxi-derivados.

Todos los C-7 fenoles halogenados informados en literatura hasta el presente son compuestos con bromo, lo cual no deja de ser sorprendente si consideramos que la concentración de cloruros disuelta en el agua de mar es superior en varios órdenes de magnitud a la de bromuros. Este hecho indica una gran especificidad en las enzimas responsables de los procesos de halogenación.

La presencia de los compuestos fenólicos detectados en las algas estudiadas reviste interés desde distintos puntos de vista.

Estos compuestos, derivados de la L-tirosina, pueden ser intermediarios en la biosíntesis de lanosol, el compuesto fenólico mas ampliamente distribuido en algas rojas. Esta secuencia biosintética ha sido estudiada en el alga *Odonthalia floccosa* [167,168].

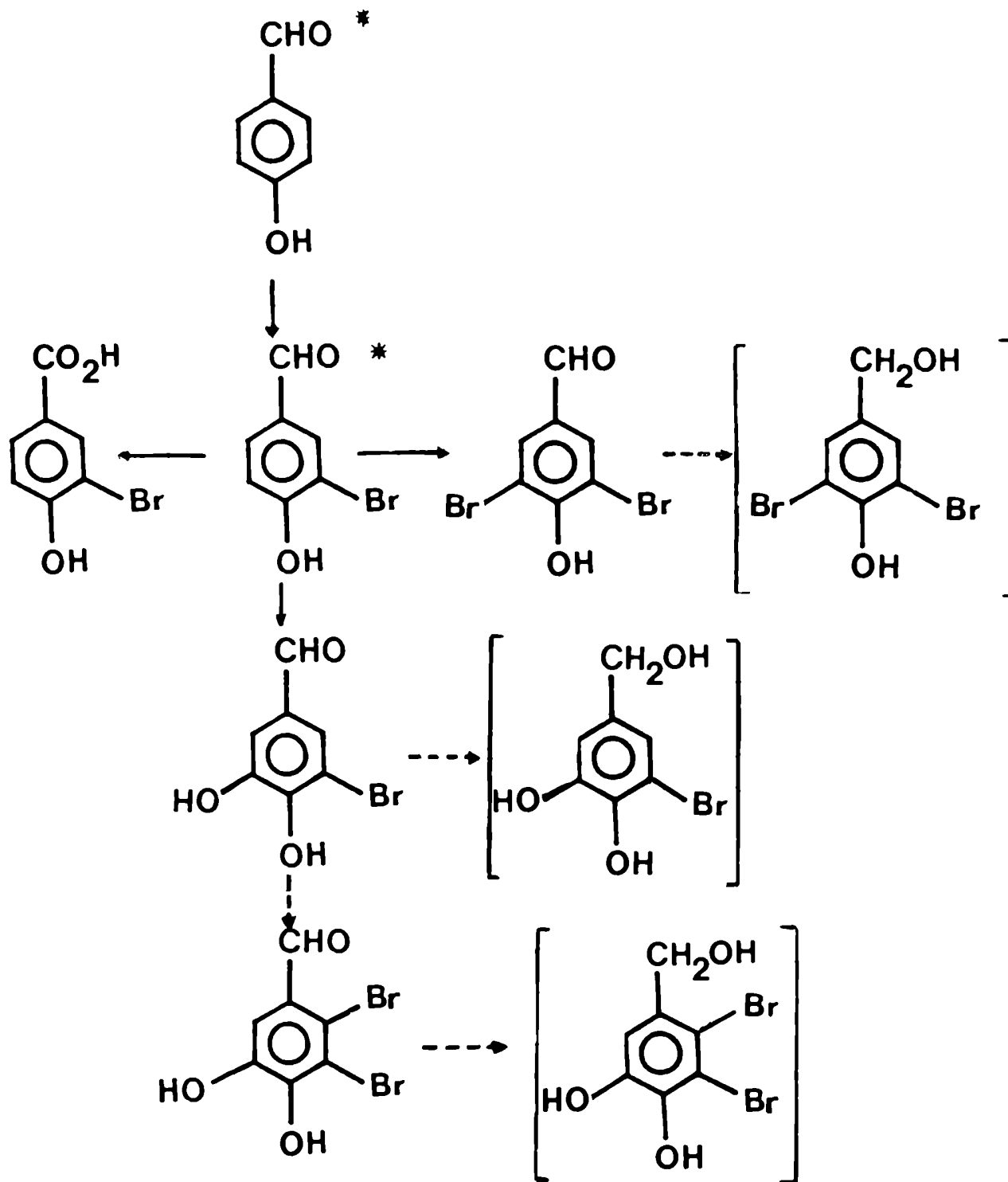


Fig. 130: Posible ruta biosintética del lanosol a partir de p-hidroxibenzaldehído. Los compuestos entre corchetes no fueron detectados en el trabajo citado [168]. Los compuestos marcados con asterisco fueron detectados en este Trabajo de Tesis.

El lanosol posee actividad antibacteriana y es tóxico para ciertas especies de algas [223]. Además, se ha demostrado que actúa como inhibidor de predación frente a ciertos moluscos [224]. Este compuesto también puede encontrarse como sal dipotásica de su forma disulfatada.

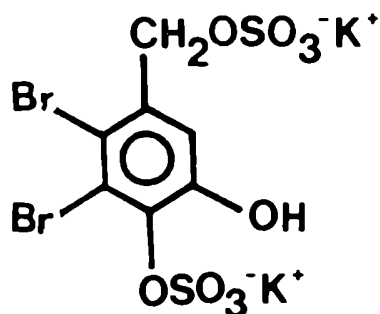


Fig. 131: Forma disulfatada del lanosol.

Esta sal es mucho menos activa frente a los organismos citados [225]. Por ello se sostiene que las algas productoras de lanosol lo "almacenan" en forma de la sal no tóxica para luego exudarlo en forma libre como un mecanismo de defensa químico.

Pedersén y Saenger [45] informaron la presencia de lanosol como único componente fenólico de *Corallina officinalis*. La identificación de este compuesto fue realizada por CGL-EM, partiendo de una muy pequeña cantidad de material vegetal (4g de peso seco). En los estudios mencionados no se detectaron ninguno de los supuestos precursores del lanosol y tampoco se informa la época del año en que fue recolectado el material vegetal.

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis fueron los siguientes:

- *Corallina officinalis*: se detectó p-hidroxi-benzaldehído (XVI), derivados clorados y bromados de este compuesto (XVII y XVIII), ácido p-hidroxi-fenilglioxílico (XIX) y ácido p-hidroxi-fenilpirúvico (XX) en el mes de mayo. En el mes de marzo solo se detectó el compuesto XVI mientras que en diciembre sólo se detectó XVI a nivel de trazas.
- *Corallina elongata*: se detectaron los compuestos XVI y XVII en el mes de marzo, mientras que en diciembre se detectó XVI a nivel de trazas.
- *Jania sp.*: en el mes de diciembre no se detectaron compuestos fenólicos.

No se detectó lanosol libre ni en forma de sal en ninguna de las tres especies estudiadas en los meses en que fue recolectado el material vegetal (diciembre-mayo).

Es probable, dado que en *Corallina officinalis* y *Corallina elongata* se detectaron derivados fenólicos pero no lanosol, que o no lo produzcan o que lo biosinteticen sólo durante cierto período del año (invierno) en el cual no se recolectó material vegetal. En este caso sólo sería factible encontrar algunos de los precursores biosintéticos del lanosol en baja cantidad.

Esta última suposición es probable, ya que cuatro de los compuestos identificados en *Corallina officinalis* , (XVI, XVII, XIX y XX) se encuentran relacionados biosintéticamente entre sí y el compuesto XIX solo se diferenciaría en el último paso (la halogenación).

Además, sobre todo en esta última especie, se observó una marcada variación estacional en la producción de compuestos fenólicos.

<u>mes de recolección</u>	<u>% comp. fenólicos (mg/g. tejido seco)</u>
mayo	0.07
marzo	0.01
diciembre	trazas

Tabla 10: Producción de compuestos fenólicos en *C. officinalis*

Los resultados obtenidos con *Corallina officinalis* indicarían una mayor producción de compuestos fenólicos hacia los meses de invierno y una disminución (hasta casi desaparición) en los meses de verano.

Estos resultados concuerdan con los informados por Phillips y Towers [226] sobre la variación estacional de bromofenoles en el alga roja *Rhodomela larix*. Estos autores observaron que la producción de bromofenoles en el alga, que en los meses de invierno oscilaba en alrededor de 40 mg/g peso seco, disminuía en verano a menos de 10 mg/g peso seco. Estos períodos coincidían con los de máxima epifitización de la siguiente forma: cuando la concentración de bromofenoles pasaba por un mínimo (verano), la cantidad de epifitas era máxima y en invierno ocurría a la inversa. Esto indicaría que la función de estos compuestos no sería el control de epifitas ya que la concentración de ellos es mínima en el período mas favorable para la epifitización.

Otra teoría sugería la posibilidad de que estos compuestos fueran productos de desecho, pero esto es muy poco probable.

También se podría descartar una función de producto de reserva, ya que su concentración es mínima en los periodos de máxima fotosíntesis. El rol más probable para estos compuestos sería el de actividad antimicrobiana en el control de organismos patógenos.

Los mayores niveles de exposición al aire y al sol y la mayor temperatura del agua en verano, afectan los procesos de producción y exudación de compuestos fenólicos.

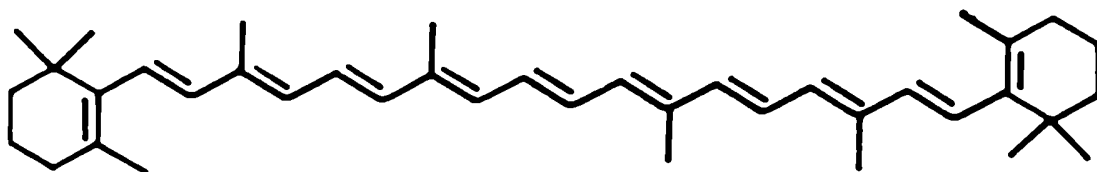
En experimentos "in vitro" Phillips y Towers [227], comprobaron que ejemplares de *Rhodomela larix* sometidos a estresamiento (cambio en las condiciones de salinidad, temperatura del agua, exposición a la luz, oxígeno disuelto) exudaban una cantidad de compuestos fenólicos mucho mayor que ejemplares testigo en las condiciones "normales" de su hábitat natural.

Estos resultados podrían correlacionarse con los niveles de compuestos fenólicos observados en las tres especies estudiadas. De ellas, la que está sometida a un mayor estresamiento es *Corallina officinalis* ya que al crecer en la zona del horizonte superior del mesolitoral sufre un mayor cambio de condiciones a lo largo del año. El hecho de quedar prácticamente expuesta al aire varias horas al día durante los meses de verano provoca a su vez un aumento en la temperatura del medio circundante y un aumento en la salinidad debido a la evaporación, además de la mayor exposición al oxígeno y a la luz.

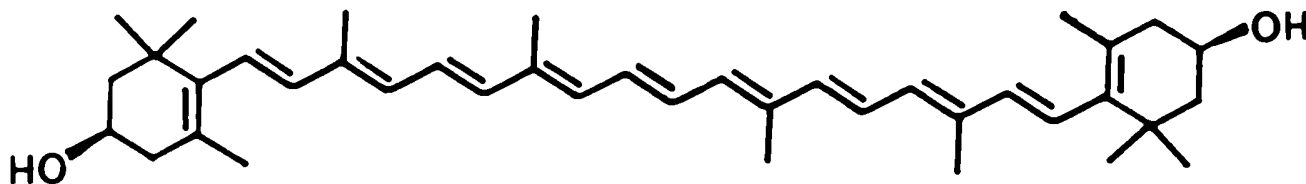
De las tres estudiadas, fue en esta especie donde se han encontrado los mayores niveles de compuestos fenólicos, los cuales posiblemente fueran exudados durante los meses de verano. Para comprobarlo, sería necesario realizar un estudio de la producción de estos compuestos a lo largo de todo el año y la exudación de ellos al medio circundante.

CAROTENOIDES:

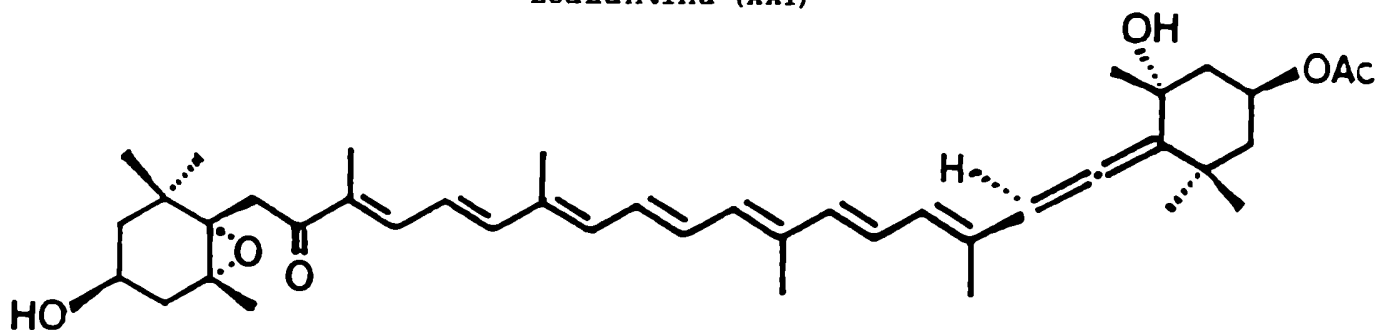
Los carotenoides detectados en las tres especies estudiadas fueron los siguientes:



β,β -caroteno (III)



zeaxantina (XXI)



fucoxantina (XXIV)

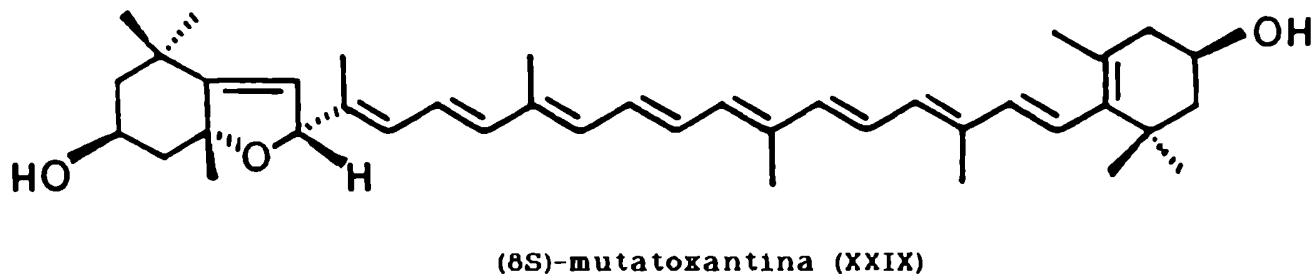
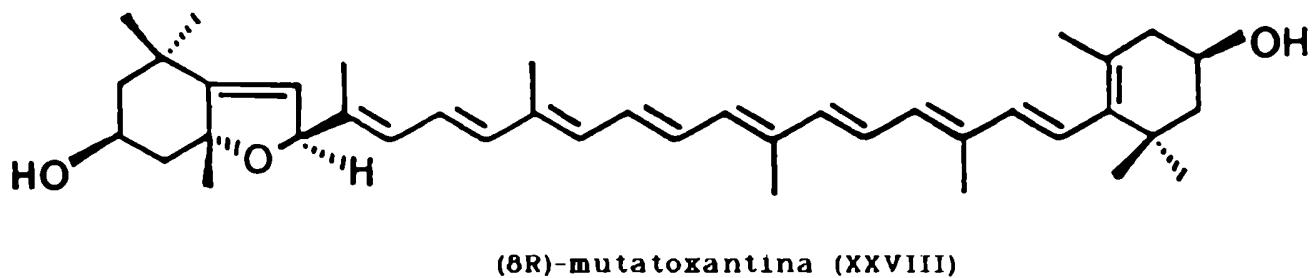
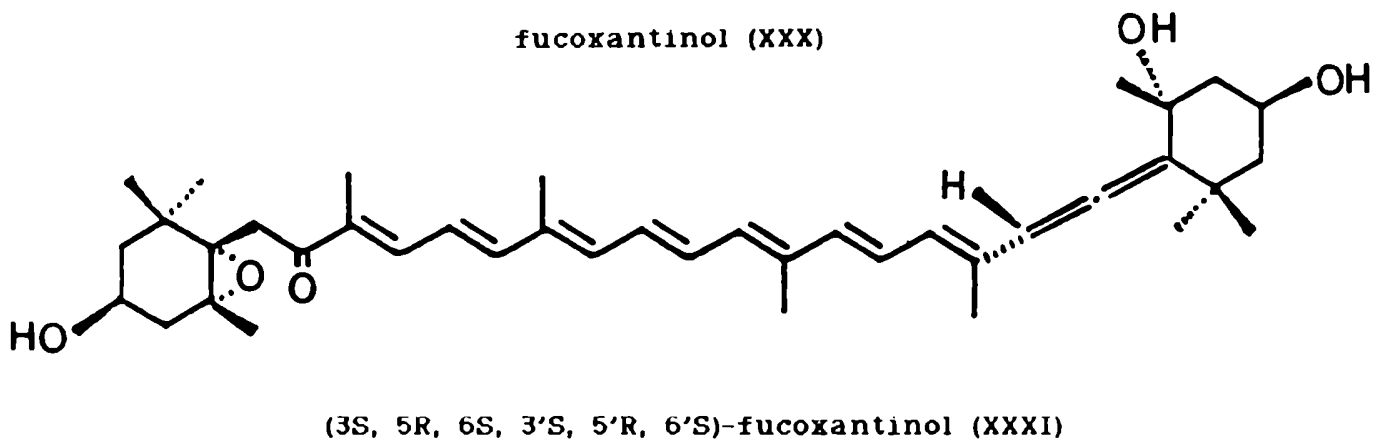
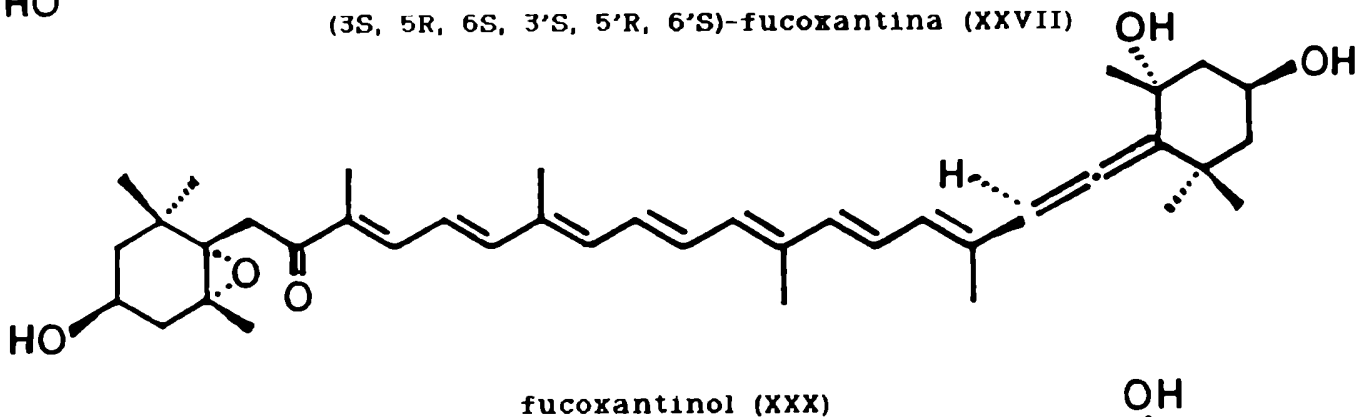
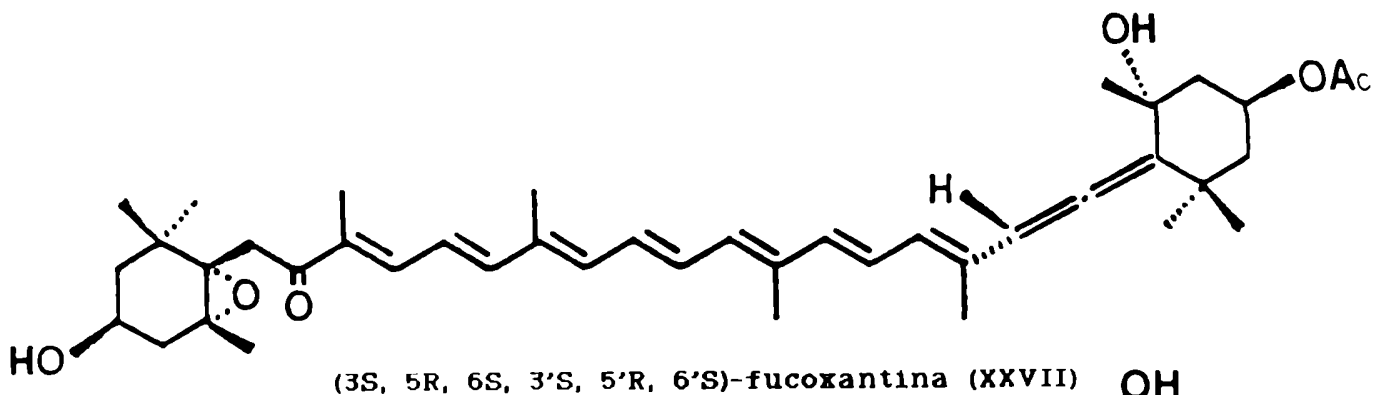


Fig. 132: Carotenoides identificados en este Trabajo de Tesis.

<u>Compuesto</u>	<u>% C. <i>Officinalls</i></u>	<u>% C. <i>elongata</i></u>	<u>% <i>Jania sp.</i></u>
β,β -caroteno	60.8	74.8	53.3
zeaxantina	5.0	3.4	2.3
fucoxantina	14.4	12.2	21.3
fucoxantínol	8.8	6.8	8.9
(8R)-mutatoxantina	5.5	1.4	7.1
(8S)-mutatoxantina	5.5	1.4	7.1
(6'S)-fucoxantina	tr.	tr.	tr.
(6'S)-fucoxantínol	tr.	tr.	tr.

Tabla 11: Composición porcentual en carotenoides de las tres especies estudiadas.

Los porcentajes expresados en la Tabla 11 se refieren a compuestos aislados y son sólo aproximados ya que estos compuestos al tener diferente polaridad, fueron purificados en condiciones distintas.

En las tres especies se observa un perfil similar, con pequeñas variaciones.

La presencia de β,β -caroteno como carotenoide mayoritario en las tres especies estudiadas no es sorprendente, ya que este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en la clase Rhodophyceae y es el componente mayoritario en numerosas especies.

Tampoco llama la atención la presencia de zeaxantina ya que es un carotenoide común en algas rojas, aunque se lo encuentre en pequeñas proporciones.

Es notable la ausencia de otros dos carotenoides usualmente detectados en algas rojas, como β , ϵ -caroteno y luteína. En los estudios realizados por Björnland y Aguilar-Martínez [87] y Liaaen-Jensen [79,80] estos compuestos se encontraban presentes en la mayor parte de las especies de algas rojas estudiadas. En algunas especies se encontraban ausentes ambos compuestos, lo cual podría significar que esas especies carecen del sistema enzimático necesario para la ϵ -ciclación, conducente al grupo terminal común a ambos compuestos. Este parecería ser el caso de las tres especies de Corallinaceae estudiadas.

La presencia de fucoxantina y fucoxantíol en las tres especies da lugar a varias consideraciones. La fucoxantina fue aislada en forma cristalina en 1914 del alga parda *Fucus vesiculosus* [228]. La estructura de este compuesto fue elucidada por Weedon y colaboradores en 1969 [121] y su configuración absoluta fue determinada por el mismo grupo en 1976 [229]. Es el carotenoide mayoritario en Phaeophyceae (algas pardas) y Chrysophyceae [45] y también ha sido detectado en Dinophyceae (dinoflagelados) [79,80], Haptophyceae [46], Bacillariophyceae (diatomeas) y Xantophyceae.

En el caso de Rhodophyceae, la presencia de fucoxantina es cuestionada como ya fue puntualizado en el capítulo sobre carotenoides. Björnland y Aguilar-Martínez [87], detectaron fucoxantina en *Bangia fuscopurpurea* (Bangiales), *Nemalion helminoides* (Nemaliales), *Ceramium rubrum* y *Polysiphonia brodiaei* (Ceramiales).

Estos autores atribuyeron el origen de la fucoxantina a la presencia de diatomeas en el material vegetal estudiado y demostraron la ausencia de fucoxantina en material de cultivo de *Bangia fuscopurpurea* y *Ceramium rubrum*.

Sin embargo, no pudieron explicar el elevado porcentaje de fucoxantina detectado en *Nemalion helminoides* (43 %). Este valor correspondería a una cantidad de fucoxantina cuatrocientas veces superior a la esperable teniendo en cuenta la cantidad de diatomeas presentes en la muestra.

Sobre la base de estos datos, la fucoxantina no es definitivamente descartada como carotenoide característico de algas rojas, pero su presencia es cuestionable. No existe hasta el presente ningún estudio sistemático sobre los carotenoides del orden Cryptonemiales.

La presencia de fucoxantínol en algas es bastante mas restringida que la de fucoxantina a pesar de ser su probable precursor biosintético. No es el componente mayoritario en ninguna de las clases de algas y solamente ha sido detectado con asiduidad en las clases Haptophyceae y Xantophyceae. No ha sido detectado hasta el presente en algas rojas, dinoflagelados o diatomeas.

Cabe concluir entonces que tanto la fucoxantina como el fucoxantínol son biosintetizados por las Corallinaceas y que los resultados obtenidos hasta el momento son discutibles o poco definitivos debido a la falta de estudios sobre carotenoides en algas del orden Cryptonemiales y al escaso número en algas rojas en general.

Esta conclusión se vería reforzada por los siguientes hechos:

- Estos compuestos son los carotenoides mas importantes, luego del β,β -caroteno en las tres especies estudiadas. Se los ha detectado incluso en porcentajes mayores que el de la zeaxantina (un carotenoide característico de algas rojas).
- La presencia simultánea de fucoxantina y fucoxantíol y la cantidad en que se encuentran restringe notoriamente el número de posibles organismos contaminantes capaces de producirlos. El fucoxantíol no es producido por diatomeas ni por dinoflagelados.
- El exámen microscópico de ejemplares de las tres especies estudiadas no reveló la presencia de organismos colonizantes en grado tal como para producir las cantidades detectadas de fucoxantina y fucoxantíol.

En caso de contaminación por dinoflagelados se debería haber detectado peridinina, carotenoide mayoritario en esta clase de organismos.

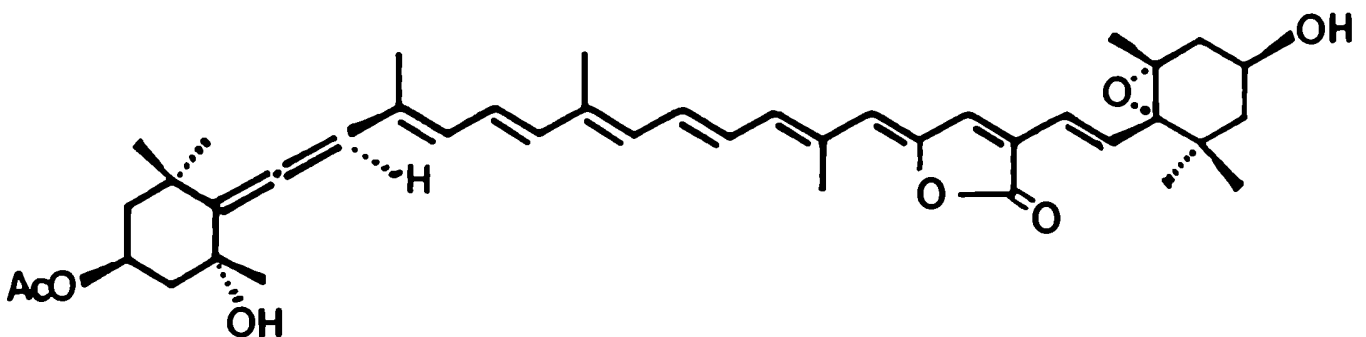


Fig. 133: Peridinina.

- La presencia de los epímeros 6'S tanto de la fucoxantina como del fucoxantíol, aún cuando el origen de ellos no esté definitivamente aclarado, sería muy difícil de explicar como provenientes de organismos contaminantes ya que sólo ha sido detectado el primero de ellos en algas pardas del género *Fucus*, productoras de fucoxantina.

La presencia de los epímeros 6'S de la fucoxantina y el fucoxantíol, XXVII y XXXI respectivamente, resulta interesante desde el punto de vista biogenético.

Ya en el año 1942, Strain [232,233] informaba sobre tres isómeros interconvertibles de fucoxantina, de los cuales el componente mayoritario "natural" fue el identificado como 6'R (fucoxantina) por Weedon [124]. El mismo grupo consiguió artificialmente, por estereomutación de la fucoxantina en benceno con trazas de I₂ en luz difusa, producir tres isómeros que coincidían cromatográficamente con los informados por Strain [169].

Dos de estos compuestos fueron identificados como 13-*cis* y 13'-*cis* fucoxantina. La mezcla de ambos coincidía con uno de los isómeros informados por Strain. El compuesto restante fue identificado como el epímero en C-6' de la fucoxantina en el cual el grupo alénico tenía configuración 6'S en lugar de 6'R. Estos compuestos sintéticos fueron caracterizados espectroscópicamente, lo cual permitió detectarlos como productos naturales. El grupo de Weedon detectó el epímero 6'S como carotenoide minoritario (hasta 6 % respecto del 6'R, fucoxantina) en extractos del alga parda *Fucus serratus*.

Sobre la base de resultados obtenidos con moléculas mas pequeñas, existe la teoría de que el epímero 6'S es precursor biosintético del mayoritario 6'R, tanto en fucoxantina como en neoxantina (los dos carotenoides alénicos mas conocidos).

Isoe y colaboradores [234] obtuvieron por oxidación fotosensibilizada de β -ionol en presencia de trazas de álcali dos productos (1 y 2), uno de los cuales fue caracterizado como un aleno de configuración 6S.

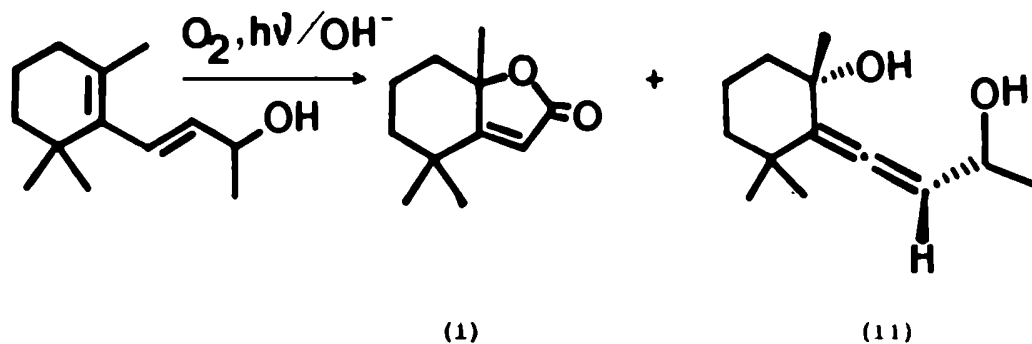


Fig. 134: Oxidación fotosensibilizada de β -ionol.

Al realizar la misma reacción partiendo de 3-hidroxi- β -ionol y posterior oxidación con MnO_2 del alcohol alílico formado, los mismos autores [235] obtuvieron (iii), epímero en C-6 con el compuesto (iv), aislado de las secreciones defensivas del saltamontes *Romalea microptera*. Por fotoisomerización del grupo alénico del compuesto (iii), los mismos autores obtuvieron una mezcla (1:1) de ambos epímeros.

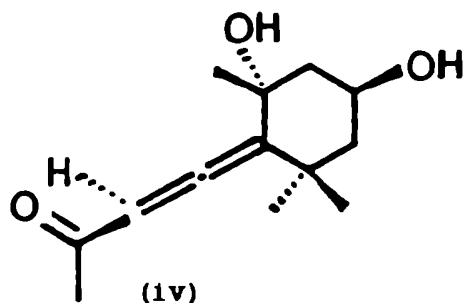
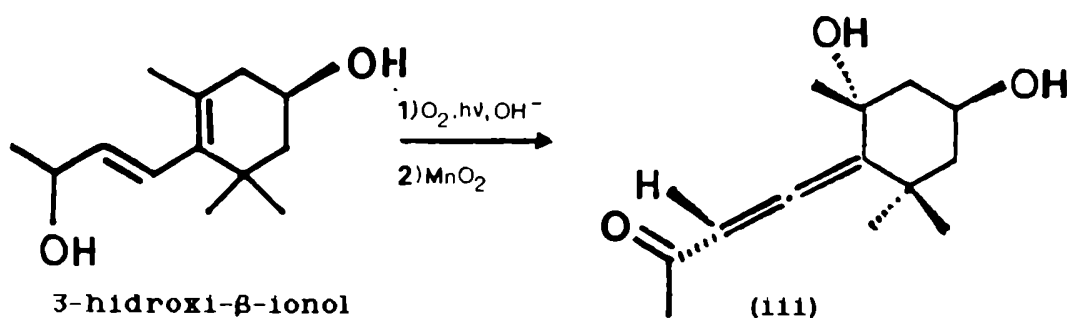


Fig. 135: Oxidación fotosensibilizada de 3-hidroxi- β -ionol.

Estos resultados llevaron a Isoe [236] a postular la biogénesis de los grupos terminales alénicos de la fucoxantina y neoxantina por un mecanismo similar a partir de la zeaxantina. En este caso, las isomerizaciones serían inducidas por la luz natural o por oxígeno singlete [237].

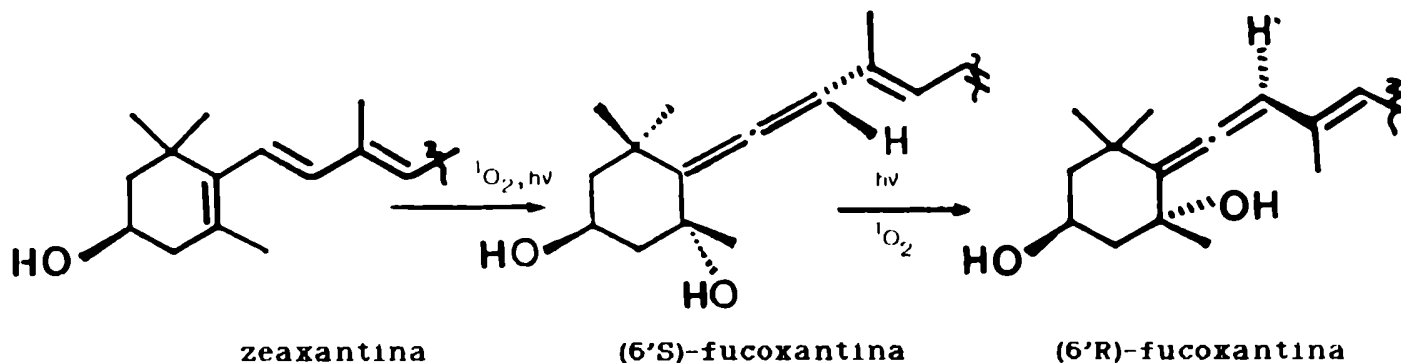


Fig. 136: Hipótesis biogenética de Isoe.

Esta hipótesis no pudo ser demostrada. Posteriormente, Milborrow y colaboradores (ver cap. carotenoides, pag. 29), demostraron la formación de neoxantina a partir de zeaxantina-[^{14}C] en cultivos libres de células del dinoflagelado *Amphidinium carterae*.

Estos autores postularon la intermediación de violaxantina, (con un grupo 5,6-epóxido), pero aún no fue demostrada.

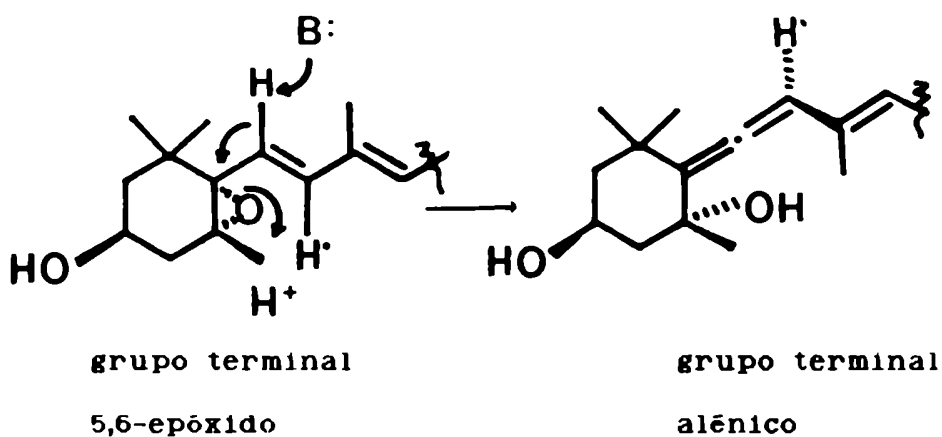


Fig. 137: Hipótesis biogenética de Millborrow.

Según Weedon [169] el hecho de haber detectado el epímero 6'S de la fucoxantina (XXVII) en *Fucus serratus* reforzaría la teoría de Isoe sobre el rol biosintético de este compuesto.

Los epímeros 6'S de la fucoxantina y del fucoxantínol, XXVII y XXXI, también podrían formarse por isomerización fotoquímica a partir de los correspondientes isómeros 6'R. El hecho de haber detectado el epímero del fucoxantínol (probable precursor de la fucoxantina) reforzaría esta última hipótesis.

Indudablemente, esta cuestión será definitivamente aclarada cuando se elucide totalmente el mecanismo de la biosíntesis de fucoxantina a partir de zeaxantina.

Se puede concluir casi con certeza, que tanto la fucoxantina como el fucoxantíol y sus epímeros 6'S son producidos por las tres especies de Corallinaceae estudiadas. Estos resultados representarían el primer informe sobre la presencia de 6'S-fucoxantina, fucoxantíol y 6'S-fucoxantíol en algas rojas.

Los compuestos XXVIII y XXIX, (8R) y (8S)-mutatoxantina, se encuentran ampliamente distribuidos en plantas superiores, sobre todo entre las Rosáceas. También fueron detectados en líquenes, como los carotenoides mayoritarios del género *Xanthoria* [238]. Sin embargo, la estructura de estos compuestos no fue elucidada hasta el año 1982 [174].

En el ámbito marino, se los ha detectado en el alga roja microscópica *Erythrotrichia carnea* [239]. En este caso, eran artefactos producidos durante el almacenamiento por varias semanas del material vegetal, previo a la extracción, y siempre se los detectó en muy pequeña cantidad. Estos compuestos no fueron detectados en material fresco, y probablemente se formaron por reordenamiento del grupo 5,6-epóxido de la antheraxantina, carotenoide mayoritario en *Erythrotrichia carnea*.

En dos de las especies estudiadas, *Corallina officinalis* y *Jania sp.* se detectaron ambos epímeros en cantidades apreciables, mayores aún que las de zeaxantina. En *Corallina elongata*, se los detectó en muy pequeña cantidad.

La posibilidad de que se tratara de artefactos puede ser descartada, ya que en todos los casos se extrajo el material vegetal fresco y en frío y en ninguno de los extractos estudiados se pudo detectar antheraxantina, posible precursor de estos compuestos.

Estos resultados representarían la primera ocasión en que estos compuestos epiméricos son detectados como productos naturales en el ámbito marino.

GALACTOSILDIGLICERIDOS:

Los resultados presentados en la tabla 9, son coherentes en cuanto a la composición de la fracción de ácidos grasos correspondiente a los galactosildiglicéridos. Como ya fue remarcado en el capítulo correspondiente, se observan diferencias sustanciales en la composición de esta clase de lípidos respecto al grado de insaturación de los grupos acilo constituyentes de los mismos. No son sorprendentes entonces, los elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados detectados en las tres especies estudiadas.

El rol que cumplen estos ácidos grasos poliinsaturados no ha sido aún elucidado. En plantas superiores también se observa un elevado porcentaje de ácidos grasos insaturados, aunque en este caso se trata principalmente de ácidos C_{16:3} y C_{18:3}. En algas y musgos se observa en cambio, C_{20:4} y C_{20:5}.

Debido a que estos lípidos son componentes mayoritarios de las membranas de cloroplastos, se cree que cumplen un rol estructural estrechamente relacionado a la función fotosintética. Por lo tanto, existe la teoría de que en plantas inferiores los ácidos C_{20:4} y C_{20:5} reemplazarían al C_{18:3} en este rol.

También se postula que estos ácidos grasos presentes en los galactosildiglicéridos (componentes de membrana), permiten mantener intacta la estructura de los cloroplastos, aún bajo condiciones adversas.

En cuanto a la composición de los galactolípidos en las tres especies estudiadas, los resultados presentados en la tabla 5, permiten observar una gran similitud entre *Corallina elongata* y *Jania sp.* Las diferencias que se observan en *Corallina officinalis* son las siguientes:

- un aumento del compuesto XXXII, con dos grupos acilo C_{20:5}, y una disminución de la proporción del compuesto XXXIV, con un grupo C_{20:5} y otro C_{16:0}.
- la presencia del compuesto XXXVII, con dos grupos acilo C_{16:0}, el cual no fue detectado en *C. elongata* y *Jania sp.*

El aumento del grado de insaturación en los galactolípidos de *Corallina officinalis* podría estar relacionado con el marcado cambio de condiciones (temperatura, salinidad, exposición al aire) que experimenta esta especie al tener su hábitat en la zona del mesolitoral. Un mayor grado de insaturación en los componentes de membrana podría contribuir a una mayor adaptación de ésta a los cambios de condiciones ambientales.

La distribución proporcional de los distintos ácidos grasos en los galactolípidos obtenidos de *Jania sp.*, permitió obtener los siguientes resultados:

<u>posición</u>	<u>C_{16:0}</u>	<u>C_{18:1}</u>	<u>C_{20:4}</u>	<u>C_{20:5}</u>
<i>sn-1</i>	19.9	52.1	71.3	63.5
<i>sn-2</i>	80.1	47.9	28.7	36.5

Tabla 12: Distribución de los distintos ácidos grasos en las diferentes posiciones del esqueleto de glicerol en galactosildiglicéridos de *Jania sp.*

Se observa que el ácido C_{16:0} se ubica preferentemente en posición *sn-2*, el C_{18:1} se distribuye uniformemente entre las dos posiciones y los ácidos C-20 poliinsaturados se encuentran principalmente en posición *sn-1*. El menor porcentaje de C_{20:5} en posición *sn-1* con respecto a C_{20:4} se debe a la elevada proporción del compuesto XXXII.

La distribución de ácidos grasos en *Jania sp.*, teniendo en cuenta la longitud de cadena mostró los siguientes resultados:

<u>posición</u>	<u>C-16</u>	<u>C-18</u>	<u>C-20</u>
<i>sn-1</i>	13.2	4.1	82.7
<i>sn-2</i>	53.1	4.1	42.8

Tabla 13: Distribución de ácidos grasos en galactolípidos de *Jania sp.* según la longitud de cadena.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado en general en galactolípidos de plantas inferiores. Se observa que los ácidos de C-16 tienden a ocupar la posición *sn*-2 (se ha verificado en otros organismos que es independiente del grado de insaturación) mientras que la posición *sn*-1 tiende a estar ocupada por un ácido C-20. Nuevamente, el elevado porcentaje de C-20 en posición *sn*-1, se debe a la gran cantidad del compuesto XXXII, con dos grupos C_{20:5}.

En cuanto a los resultados obtenidos en los galactosildiglicéridos individuales, se observó por EM/FAB⁺ que en los casos en que se identificó un grupo acilo C-16 y uno C-20 (XXXIV y XXXV), el grupo C-16 ocupaba en la mayoría de los casos la posición *sn*-2 y el C-20 la posición *sn*-1. En el caso del compuesto XXXIII, con dos grupos C-20 de diferente grado de insaturación se observó tal cual lo esperado, que el más insaturado tendía a ocupar la posición *sn*-2.

En el caso del compuesto XXXVI, con un ácido C-16 y otro C-18, no se observó una especificidad en cuanto a las posiciones que ocupaban.

Estos resultados constituyen la primera aplicación de la técnica de EM/FAB⁺ al análisis estructural de galactosildiglicéridos. Esta técnica es particularmente ventajosa con respecto a la de impacto electrónico porque permite observar el ion cuasimolecular y obtener el peso molecular de estas sustancias térmicamente lábiles, además de dar en algunos casos fragmentos con información valiosa sobre la estructura de estos compuestos.

PARTE EXPERIMENTAL

INSTRUMENTOS Y METODOS EMPLEADOS:

Los puntos de fusión (p.f.) fueron determinados en un aparato Fischer-Johns y no fueron corregidos.

Los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de carotenoides fueron realizados en un espectrofotómetro Beckman DK-2A en soluciones metanólicas o clorofórmicas.

Los espectros de absorción infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 710-B, en suspensión de nujol o en film.

Los espectros de masa (EM), fueron realizados a 70 eV en un espectrómetro de masa Varian Mat CH-7A con sistema de introducción directa de muestra y sistema de procesamiento de datos Varian Mat Spectra System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631.

Las cromatografías gas-líquido combinadas con espectrometría de masa (CGL-EM) fueron realizadas en un sistema compuesto por un cromatógrafo gaseoso Varian 1400 acoplado a un espectrómetro de masa Varian Mat CH-7A con procesador automático de datos Varian Mat Spectra System 166 con teletipo Tektronix 4010-1 e impresor Tektronix 4631 o en un equipo Hewlett-Packard 5970 B Mass Selective Detector.

Los espectros de masa de galactolípidos fueron efectuados en un espectrómetro de masa ZAB-SEQ (VG) híbrido BEQG (B: sector magnético, E: sector eléctrico, Q: cuadrupolo) (Fig. 137), siendo la sección BE de alta resolución de simetría reversa.

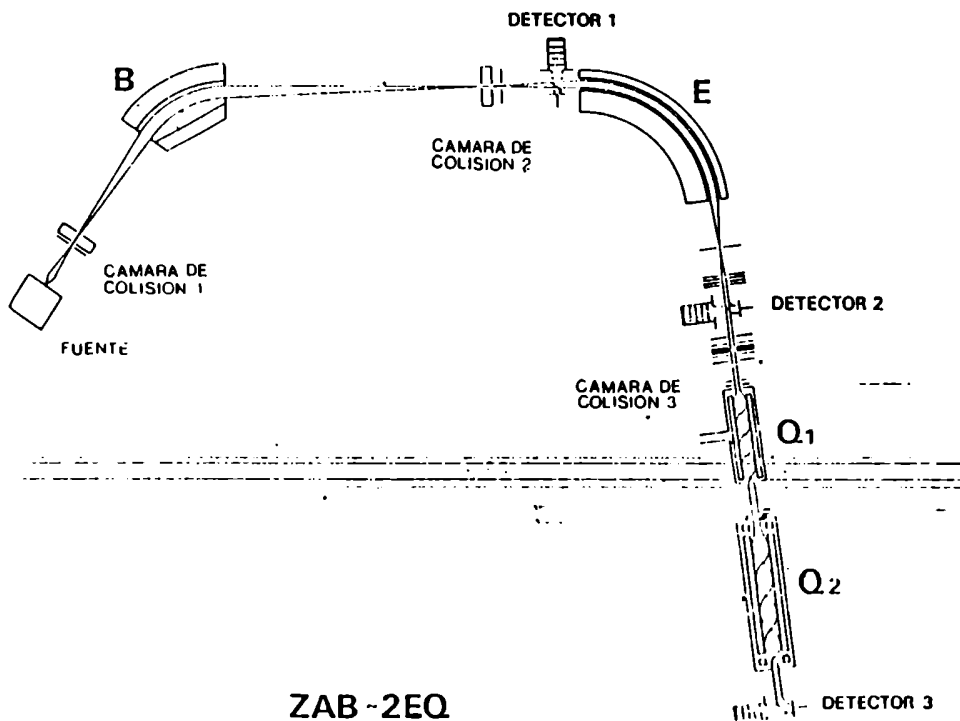


Fig. 138: Esquema del espectrómetro ZAB-SEQ (VG) híbrido BEQQ.

El instrumento fue operado en modo de iones positivos.

La ionización por impacto electrónico fue efectuada con emisión electrónica de 70 eV y corriente de emisión de 1 mA sobre la muestra introducida en la fuente (200 °C) por sonda para introducción directa.

La ionización por FAB fue efectuada utilizando una pistola de iones cesio (Cs) a 40 kV y calibración de masas utilizando CsI. La muestra fue introducida directamente en la cámara de iones sobre una matriz conteniendo alrededor de 2 µl de alcohol m-nitrobencílico. En algunos casos se efectuó el agregado a la matriz de solución de NaCl para precatonizar la muestra.

El voltaje de aceleración fue en todos los casos de 8 kV.

Los espectros obtenidos para estudio de secuencia genética se efectuaron por CID (disociación inducida por colisión) en la 3ª región libre de campo utilizando como cámara de colisión gaseosa el primer cuadrupolo (Q1) (no analizador) operado sólo por radiofrecuencia para este propósito. Las colisiones de baja energía (c.a. 30 eV) se hicieron utilizando argón como gas de colisión a una presión de c.a. 2×10^{-5} mbar para condiciones de simple colisión. Los iones hijo formados fueron analizados en el segundo cuadrupolo (Q2) con resolución unitaria.

La detección de iones se efectuó por el sistema de fotomultiplicadores y en los casos en que fue necesario mejorar la relación señal-ruido para señales débiles, se efectuó por analizador multicanal.

En los espectros utilizando sólo el analizador sectorial BE se utilizó el detector 2 y en los estudios de secuencia genética con el sistema híbrido BEQG, se utilizó el detector 3.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) fueron realizados a 100.1 MHz en un espectrómetro Varian XL-100-15.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C) fueron realizados a 25.2 MHz. en un espectrómetro Varian XL-100-15 utilizando pulsos de 45° y velocidad de repetición de pulsos de 0.71 seg.

Los espectros RMN-¹³C totalmente desacoplados de hidrógeno fueron obtenidos por irradiación a la frecuencia central de 4 ppm del espectro RMN-¹H.

La multiplicidad de las señales en RMN-¹³C fue determinada mediante la técnica de APT (Attached Proton Test), utilizando una secuencia de pulsos: 90_tX-τ-180_tY-τ-FID (τ= 7 mseg), desconectando el desacople en el período entre los dos pulsos.

Todos los espectros RMN-¹H y ¹³C fueron realizados en solución de deuterocloroformo utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las abreviaturas utilizadas en la descripción de los espectros son: s, singulete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; s.a. singulete ancho; c, cuarteto.

El estigmasterol testigo fue adquirido a Aldrich Chemical Co. Inc. El sitosterol y colesterol testigos fueron adquiridos a Sigma Chem. Co.

Los restantes testigos de esteroides fueron gentilmente suministrados por el Dr. C. Djerassi (Department of Chemistry, Stanford University, California), el Dr. Michel Barbier (Institut des Substances Naturelles, Gif-sur Yvette), el Dr. Glenn W. Patterson (Department of Botany, University of Maryland) y el Dr. César Catalan (Universidad Nacional de Tucumán).

El escualeno testigo fue adquirido a Eastman Chemical Company.

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación. La evaporación de los solventes fue efectuada a temperaturas menores de 40°C y a presión reducida. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS:

a) Cromatografía en capa delgada (c.c.d.):

Se utilizaron las siguientes cromatoplasmas:

silicagel 60 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck),
espesor: 0.2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de
onda 254 nm (F₂₅₄).

silicagel 60 sobre hojas de poliéster (Aldrich o Sigma),
espesor: 0.2 mm, con indicador F₂₅₄.

silicagel 60 de alta resolución (HPTLC- Merck), con indicador
F₂₅₄.

fase reversa de alta resolución C-18 (HPTLC- Merck), con
indicador F₂₅₄.

Los agentes de revelado utilizados fueron los siguientes:
vapores de I₂.

H₂SO₄ H₂O (1:1) y posterior calentamiento en estufa a
110°C.

FeCl₃ 2 % en etanol.

b) Cromatografía en capa preparativa:

Para muestras de menos de 40 mg, se utilizaron en forma
preparativa cromatoplasmas de silicagel 60 (Merck o Sigma) sobre
vidrio, de 20 x 20 cm de superficie y 0.25 mm de espesor, con
indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F₂₅₄).

En caso de mayor cantidad de muestra se prepararon placas de
silicagel 60 G (Merck) de 2 mm de espesor sobre placas de vidrio
de 20 x 20 cm de superficie.

c) Cromatografía "flash" en columna seca:

Este método fue empleado para un fraccionamiento rápido y eficiente de los extractos y para algunas separaciones cromatográficas (diferencia de Rf entre las sustancias no menor de 0.2). La técnica utilizada fue la siguiente:

Para el fraccionamiento de 30 g de extracto se utilizó un embudo cilíndrico con placa filtrante de vidrio sinterizado de 1.2 litros de capacidad y 300 g de silicagel 60 G o H (grado c.c.d.) (Merck). Se colocó la sílica en el embudo y se compactó golpeando suavemente el vástago del embudo sobre una superficie de madera. Se colocó el embudo con la sílica compactada en un kitasato de 2 litros de capacidad.

Se agregó el extracto (generalmente en forma de pastilla con silicagel) y se distribuyó homogéneamente sobre la superficie de la sílica. Finalmente, se colocó un disco de papel de filtro sobre la pastilla a fin de no erosionar la superficie de la misma con el agregado de los solventes.

Se agregó el primer solvente y se eluyó aplicando succión al kitasato por medio de una trompa de agua, llevando a sequedad. Se trasvasó el eluido a un recipiente adecuado y se agregaron sucesivamente los solventes de polaridad creciente, llevando a sequedad luego del agregado de cada uno.

En el caso de los extractos crudos se colectaron fracciones de 600 ml con cada solvente y se utilizaron mezclas de éter de petróleo/acetato de etilo de polaridad creciente y luego acetato de etilo/metanol.

En total, se utilizaron quince mezclas de solventes (ver descripción pág. 65) De esta forma, se consiguió un fraccionamiento eficiente de 30 g de extracto en el lapso de tres horas.

d) Cromatografía en columna:

Se utilizaron como adsorbentes silicagel H (Merck) y silicagel 60 Merck (mesh 230-400) para cromatografía "flash". En estos casos, las cromatografías fueron realizadas a mediana presión utilizando aire comprimido.

También se utilizó una columna armada con 20 g de Sephadex LH-20 en MeOH para la purificación de la mayor parte de los carotenoides identificados en este Trabajo de Tesis.

e) Cromatografía gas-líquido (CGL):

Las cromatografías gas - líquido (CGL) fueron realizadas en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5840-A o Hewlett-Packard 5890. Ambos equipos contaban con detector de ionización de llama (FID) y se utilizó nitrógeno como gas portador. Las condiciones y columnas empleadas se indican en cada caso.

Fueron utilizadas las siguientes columnas:

Columnas empacadas:

- 1) SE-30 3%, long. 6 pies, 2 mm d.i., soporte Chromosorb WAW
DMCS 80-100.
- 2) OV-101 2%, long. 4 pies, 2 mm d.i., soporte: Chromosorb WAW
DMCS 80-100.

3) OV-17 3%, long. 6 pies, 2 mm d.i., soporte: Chromosorb WAW
DMCS 80-100.

4) NPGS 8 %, long. 6 pies, 2 mm d.i., soporte: Chromosorb WAW
DCMS 80-100.

Columnas capilares:

1) SP-2100, long. 12 m, 0.25 mm d.i.

2) SP-2340, long. 30 m, 0.25 mm d.i.

3) HP-5, long. 12 m, 0.2 mm d.i.

f) Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR):

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) fueron realizadas en un cromatógrafo Micromeritics equipado con un detector de índice de refracción modelo 771 y un inyector manual Micromeritics 730. Las columnas cromatográficas utilizadas en los distintos casos fueron las siguientes:

Alltech R-Sil C-18 (High Load) (10 μ m, 250 x 10 mm, i.d.)

Altex Ultrasphere ODS (5 μ m, 250 x 10 mm, i.d.)

Las mezclas de solventes utilizadas se indican en cada caso, y están expresadas en relaciones de volumen. Los solventes de elución utilizados fueron purificados por bidestilación en todos los casos.

REACCIONES GENERALES:

a) Saponificación:

La muestra a saponificar (10 mg) se suspendió en una solución de KOH en metanol (10 ml, 4 %). Se reflujo durante una hora y se dejó enfriar. Se agregaron 20 ml de agua y luego se extrajo con diclorometano (3 x 25 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (2 x 25 ml), HCl 5% (2x 25 ml) y finalmente con agua hasta pH neutro de las aguas de lavado. La solución clorofórmica así obtenida fue secada con MgSO₄ anhidro y el solvente evaporado a presión reducida.

b) Metilación con CH₂N₂:

La muestra (10 mg) fue disuelta en éter etílico y se agregaron gotas de una solución etérea de diazometano hasta persistencia de un color amarillo intenso. La solución fue dejada en reposo durante media hora y luego llevada a sequedad con corriente de nitrógeno bajo campana.

c) Metilación por transesterificación en medio ácido:

La muestra (10 mg) fue trasvasada a un tubo de 10 ml con tapa a rosca. Se agregaron 2 ml de una solución de HCl en metanol (2 %). Se cerró el tubo con la tapa a rosca y se calentó durante una hora en baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar, y se agregó 1 ml de hexano, se agitó vigorosamente y se separó la fase superior con pipeta capilar. Este proceso fue repetido

dos veces y las fases orgánicas reunidas fueron neutralizadas con NaHCO_3 , filtradas y concentradas bajo corriente de nitrógeno.

d) Hidrólisis ácida de galactolípidos:

La muestra (10 mg) fue calentada a 100°C durante una hora con 2 ml de HCl 2% en un tubo cerrado con tapa a rosca. La suspensión acuosa fue extraída repetidas veces con AcOEt , y la fase orgánica fue descartada. La fase acuosa fue neutralizada por el agregado de NaHCO_3 (s) y concentrada a presión reducida a fin de preparar los alditoles acetilados de los hidratos de carbono.

e) Preparación de alditoles acetilados:

Se disolvió el hidrato de carbono (2 mg) en agua (1 ml) y se agregaron 10 mg de borohidruro de sodio y una gota de NH_3 (c) y se dejó a temperatura ambiente durante una noche. Luego se agregó AcOH gota a gota hasta $\text{pH}: 5$ y se llevó a sequedad a presión reducida. Se agregó 1 ml de metanol y se llevó a sequedad. Este procedimiento fue repetido cinco veces a fin de eliminar el ácido bórico formado. Luego se agregó 2 ml de una mezcla anhídrido acético/piridina (1:1) y se calentó a 100°C durante una hora. Se volcó sobre agua (2 ml) y se extrajo tres veces con 1 ml de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró bajo corriente de N_2 . El análisis por CGL de los alditoles acetilados formados fue efectuado utilizando una columna capilar HP-5 (ver pág. 187), temp. $100 \longrightarrow 200^\circ\text{C}$; $5^\circ\text{C}/\text{min}$.

ESPECIES VEGETALES ESTUDIADAS:

Las tres especies estudiadas, *Corallina officinalis*, *Corallina elongata* y *Jania sp.*, fueron clasificadas por la Dra. Elsa Lacoste de Díaz (Departamento de Biología, F.C.E.y N.-UBA)

Ejemplares de *Jania sp.* de los lotes estudiados se encuentran actualmente en estudio por la Dra. María L. Mendoza (CADIC - Ushuaia) a fin de clasificar definitivamente la especie.

Corallina officinalis : Fue recolectada a mano en los pozos de marea de la zona del mesolitoral en la costa rocosa de Miramar (Prov. de Buenos Aires) durante períodos de marea baja.

Corallina elongata: Fue recolectada en rocas de la zona del mesolitoral en Miramar (Prov. de Buenos Aires) durante períodos de marea baja.

Jania sp.: Fue recolectada a mano en rocas de la zona del mesolitoral en Punta Cantera (Mar del Plata- Prov. de Buenos Aires) durante períodos de marea baja.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL:

El material vegetal fresco (10 kg) fue lavado con agua dulce y homogeneizado con etanol 95 % (10 litros), utilizando una licuadora Osterizer Cycle Blend a las pocas horas de recolectado. El material así homogeneizado fue transportado en frascos de vidrio a Buenos Aires, donde se continuó el procesamiento.

Se separó la fase líquida por decantación, y se agregaron 5 litros de etanol 95 % al residuo sólido. La suspensión se agitó mecánicamente a temperatura ambiente durante dos horas, se dejó reposar veinticuatro horas y se decantó la fase líquida, reuniéndola con la anterior. Este proceso fue repetido tres veces utilizando 5 litros de CH_2Cl_2 , luego de lo cual se comprobó que el extracto estaba prácticamente agotado.

El análisis por c.c.d. indicó que los perfiles cromatográficos de los extractos etanólico y clorofórmico eran similares, por lo tanto se los reunió y se trabajó con el extracto total.

El mismo fue concentrado a presión reducida a temperatura inferior a 40°C. La suspensión acuosa resultante fue extraída repetidas veces con CH_2Cl_2 . La fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anhidro, filtrada y llevada a sequedad a presión reducida, obteniéndose de esta forma el extracto crudo.

Durante las distintas etapas del procesamiento de los extractos, se conservaron los concentrados de los mismos a temperatura de -30°C. Una metodología similar se siguió con las distintas fracciones del extracto crudo.

ESTUDIO QUIMICO DE CORALLINA OFFICINALIS:

Se recolectaron 9.8 kg de material vegetal fresco a partir del cual se obtuvieron 33.4 g de extracto crudo.

Dicho extracto fue fraccionado tal cual se describe en la página 65, obteniéndose las siguientes fracciones: fracción 1, 0.51 g; fracción 2, 0.84 g; fracción 3, 4.87 g; fracción 4, 2.95 g; fracción 5, 1.61 g; fracción 6, 4.33 g; fracción 7, 3.23 g; fracción 8, 0.89 g; fracción 9, 1.22 g, fracción 10, 1.01 g; fracción 11, 0.11 g; fracción 12, 0.96 g, fracción 13, 0.22 g; fracción 14, 3.78 g; fracción 15, 7.10 g.

De la fracción 1, se aislaron los siguientes compuestos por cromatografía "flash" en columna de silicagel (solvente: éter de petróleo): n-heptadecano (I, 320 mg), escualeno (II, 45 mg) y β , β caroteno (III, 95 mg). Se detectaron por CGL-EM trazas de n-pentadecano y azufre.

Las fracciones 2 y 3 estaban constituidas por ceras y no interesó estudiarlas para el presente trabajo.

De la fracción 4 se aisló por cromatografía en columna de silicagel H (solvente: éter de petróleo/ CH_2Cl_2 9:1) el éster etílico del ácido eicosapentaenoico (IV, 245 mg).

Por cromatografía en columna de silicagel H (solvente: gradiente éter de petróleo/ CH_2Cl_2) de la fracción 5, se consiguió aislar *trans*- fitol (V, 65 mg) y una mezcla de ácidos grasos (950 mg) analizada conjuntamente con las provenientes de las fracciones 6 y 7.

La fracción 6 fue cromatografiada en columna de silicagel (Mesh 230-400, solvente: CH₂Cl₂), obteniéndose una mezcla de ácidos grasos (3.42 g), y otra de esteroides (430 mg).

Los ácidos grasos de las fracciones 5, 6 y 7 fueron identificados por cromatografía gaseosa de sus ésteres metílicos (preparados según la técnica b) utilizando una columna capilar SP-2340 (ver pag. 187) y comparación de sus tiempos de retención con los de compuestos patrones.

Se identificaron los siguientes ácidos grasos: C_{16:0} (61.1 %), C_{18:1} (14.3 %), C_{20:5} w-3 (6.8 %), C_{20:4} w-6 (6.1 %), C_{16:1} (5.0 %), C_{18:0} (4.1 %), C_{14:0} (1.3 %), C_{15:0} (0.6 %).

Los esteroides de las fracciones 5, 6 y 7 fueron fraccionados por CLAR (columna Alltech RS11 C-18, 10 μ, 500 mm x 10 mm, (eluyente : metanol) y las fracciones obtenidas fueron analizadas por CGL (col. capilar SP-2100, ver pág. 187) y CGL-EM (col. OV-17 3%, ver pág. 186) y se identificaron los siguientes compuestos: colest-5-en-3β-ol (VI, 95.6 %); colest-5,24-dien-3β-ol (IX, 1.0%); 22-*trans*-colest-5,22-dien-3β-ol (VIII, 0.9 %); 24-metilcolest-5,24(28)-dien-3β-ol (X, 0.7 %); 24-*nor*-colest-5,22-dien-3β-ol (VII, 0.2 %); 22-*trans*-24-ξ-metilcolest-5,22-dien-3β-ol (XI, 0.6 %); 24ξ-etilcolest-5-en-3β-ol (XV, 0.5 %); 24-ξ-metilcolest-5-en-3β-ol (XII, 0.5 %); 24-ξ-metil-5α-colestan-3β-ol (XIII, trazas); 24-*trans*-24-etilcolest-5,24(28)-dien-3β-ol (XIV, trazas)

La fracción 7 fue cromatografiada en columna de silicagel H (solvente: gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) y se obtuvieron ácidos grasos (2.44 g), esteroides (370 mg) y una fracción enriquecida en compuestos fenólicos (44 mg).

Los componentes de la fracción fenólica fueron subfraccionados por c.c.p. (solvente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/1\text{-PrOH}$, 98:2; 2 desarrollos). Se eluyeron cuatro bandas; A, B, C y D.

De la banda A se aislaron 23 mg del compuesto XVI (p-hidroxibenzaldehído) identificado por RMN- ^1H y EM. Las bandas B, C y D fueron analizadas por CGL y CGL-EM (columna OV-17 3%, ver pág. 186).

En la banda D se detectaron los compuestos XVI y XVII (tentativamente 3-Br-4-hidroxibenzaldehído). En la banda C se detectaron los compuestos XVII y XVIII (tentativamente 3-Cl-4-hidroxibenzaldehído) mientras que en la banda D se identificaron los compuestos XIX (ácido p-hidroxifenilgloxílico) y XX (ácido p-hidroxifenilpirúvico).

Por cromatografía en columna de silicagel H de la fracción 8 (solvente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3) se enriqueció una fracción que contenía el compuesto XXI (zeaxantina).

Dicho compuesto fue purificado por cromatografía en gel de Sephadex LH-20 (20g, solvente: MeOH) y finalmente por CLAR (columna Alltech 10 μm , eluyente: MeOH/ H_2O 98:2; y luego columna Altex 5 μm , mismo eluyente). Se aislaron 5 mg del compuesto XXI el cual fue identificado por RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y EM.

Las fracciones 9 y 10 fueron cromatografiadas en geles de Sephadex LH-20 (20 g, solvente: metanol). Se obtuvo una fracción enriquecida en carotenoides (9/10 A 230 mg) y otra enriquecida en monoglicéridos (9/10 B 340 mg).

La fracción 9/10 A fue cromatografiada por CLAR (columna Alltech 10 μ m, eluyente: MeOH/H₂O 95:5) obteniéndose ocho fracciones principales, las cuales fueron purificadas nuevamente por CLAR (columna Altex 5 μ m, eluyente: MeOH/H₂O 95:5), lográndose identificar los siguientes compuestos:

1-[(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoil]-*sn*-glicerol (XXII), 1-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosa-5,8,11,14-tetraenoil]-*sn*-glicerol (XXIII), fucoxantina (XXIV), 1-[hexadecanoil]-*sn*-glicerol (XXV), 1-[9Z-octadeca-9-enoil]-*sn*-glicerol (XXVI), (6'S)-fucoxantina (XXVII), (8R)-mutatoxantina (XXVIII) y (8S)-mutatoxantina (XXIX).

La fracción 9/10B fue cromatografiada por CLAR (columna Alltech 10 μ m, eluyente: MeOH/H₂O 90:10), lográndose identificar los compuestos XXII y XXIII. Estos compuestos también fueron identificados en la fracción 11.

Los monoglicéridos XXII, XXIII, XXV y XXVI fueron saponificados según la técnica a) y los ácidos grasos libres respectivos fueron metilados por la técnica b). Los ésteres metílicos correspondientes fueron identificados por CGL.

Las fracciones 12 y 13 fueron cromatografiadas en geles de Sephadex LH-20 (20 g, solvente: MeOH), obteniéndose una fracción enriquecida en carotenoides (55 mg), la cual fue purificada por CLAR (columna Alltech 10 µm, eluyente: MeOH/H₂O 90:10 y posteriormente Altex 5µm, mismo eluyente) lográndose identificar los compuestos XXX (fucoxantíol) y XXXI [(6'S)-fucoxantíol].

Las fracciones 14 y 15 constaban de una mezcla de galactosildiglicéridos la cual fue purificada por cromatografía "flash" en columna seca (solvente: AcOEt y AcOEt/MeOH 9:1) y posteriormente CLAR (columna Alltech 10 µm, eluyente: metanol). Se lograron identificar los compuestos XXXII a XXXIX.

ESTUDIO QUIMICO DE CORALLINA ELONGATA:

Se recolectaron 9.2 kg de material vegetal fresco, los cuales luego del procesamiento permitieron obtener 26.3 g de extracto crudo, el cual fue fraccionado de la misma forma que el de *Corallina officinalis*, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción 1: 0.30 g, fracción 2: 0.66 g, fracción 3: 3.19 g, fracción 4: 1.71 g, fracción 5: 0.90 g, fracción 6: 3.32 g, fracción 7: 1.83 g, fracción 8: 0.4 g, fracción 9: 1.0 g, fracción 10: 0.94 g, fracción 11: 0.09 g, fracción 12: 0.32 g, fracción 13: 0.12 g, fracción 14: 2.88 g, fracción 15: 6.27 g.

El análisis de estas fracciones fue realizado de la misma forma que las de *Corallina officinalis*. Se identificaron los siguientes compuestos:

Fracción 1: n- heptadecano (I, 190 mg), escualeno (II, 21 mg) y β,β -caroteno (III, 55 mg).

Fracción 2 y 3: compuestas por ceras, no fueron estudiadas.

Fracción 4: éster etílico del ácido $C_{20:5}$ ω -3 (IV, 115 mg) y ceras

Fracción 5: *trans*-fitol (V, 45 mg) y ácidos grasos.

Fracción 6: fueron identificados los siguientes ácidos grasos: $C_{16:0}$ (64.2 %); $C_{18:1}$ (15.6 %); $C_{20:5}$ (7.8 %); $C_{20:4}$ (6.1 %); $C_{16:1}$ (3.3 %); $C_{18:0}$ (1.8 %); $C_{14:0}$ (0.7 %); $C_{15:0}$ (0.2 %).

También fueron identificados los siguientes esteroides:

colest-5-en-3 β -ol (VI, 95.3 %); colest-5,24-dien-3 β -ol (IX, 0.6%)

22-*trans*-colest-5,22-dien-3 β -ol (VIII, 0.4 %);

24-metilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (X, 0.8 %);

24-*nor*-colest-5,22-dien-3 β -ol (VII, 0.6 %);

24 ξ -etilcolest-5-en-3 β -ol (XV, 1.3 %);

22-*trans*-24- ξ -metilcolest-5,22-dien-3 β -ol (XI, 0.2 %)

24- ξ -metilcolest-5-en-3 β -ol (XII, 0.2 %)

24- ξ -metil-5 α -colest-3 β -ol (XIII, trazas)

24-etilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (XIV, trazas)

Fracción 7: fueron identificados por CGL-EM los siguientes compuestos fenólicos: p-hidroxibenzaldehído (XVI); tentativamente 3-Br-4-hidroxibenzaldehído (XVII).

Fracción 8: Se identificó zeaxantina (XXI, 5 mg).

Fracciones 9 y 10: fueron identificados los siguientes monoglicéridos: XXII, XXIII, XXV y XXVI. También fueron identificados los siguientes carotenoides: fucoxantina (XXIV, 11 mg), (6'S)-fucoxantina, (XXVII, 1 mg), (8R)-mutatoxantina, (XXVIII, trazas), (8S)-mutatoxantina, (XIX, trazas).

Fracción 11: compuesta por los monoglicéridos XXII y XXIII.

Fracciones 12 y 13: fueron identificados los siguientes carotenoides: fucoxantínol, (XXX, 9 mg); (6'S)-fucoxantínol (XXXI, trazas).

Fracciones 14 y 15: fueron identificados los siguientes galactolípidos: XXXII-XXXVI, XXXVIII y XXXIX.

ESTUDIO QUIMICO DE JANIA SP.:

Se recolectaron 8.6 kg de material vegetal fresco, los cuales luego del procesamiento rindieron 23.2 g de extracto crudo. El extracto fue procesado de la misma forma que en los dos casos anteriores, obteniéndose las siguientes fracciones:

Fracción 1: 0.28 g; fracción 2: 0.80 g; fracción 3: 3.04 g
fracción 4: 1.20 g; fracción 5: 1.18 g; fracción 6: 2.40 g;
fracción 7: 2.85 g; fracción 8: 0.44 g; fracción 9: 0.68 g;
fracción 10: 0.56 g; fracción 11: 0.34 g; fracción 12: 0.66 g
fracción 13: 0.35 g; fracción 14: 2.10 g; fracción 15: 5.34 g.

El análisis de estas fracciones fue realizado de la misma forma que en los dos casos anteriores, y permitió la identificación de los siguientes compuestos:

Fracción 1: n-heptadecano (I, 140 mg), escualeno (II, 18 mg), β,β -caroteno (III, 94 mg).

Fracciones 2 y 3: Compuestas por ceras, no fueron estudiadas

Fracción 4: fue identificado el éster etílico del ácido eicosapentaenoico (IV, 45 mg).

Fracción 5: *trans*-fitol (V, 85 mg) y ácidos grasos.

Fracciones 6 y 7: fueron identificados los siguientes ácidos grasos: C_{16:0} (59.1 %); C_{18:1} (16.3 %); C_{20:5} (6.8 %); C_{20:4} (6.8 %); C_{16:1} (5.2 %); C_{18:0} (3.1 %); C_{14:0} (1.8 %); C_{15:0} (0.9 %).

También fueron identificados los siguientes esteroides:

colest-5-en-3 β -ol (VI, 93.3 %); colest-5,24-dien-3 β -ol (IX, 1.4 %)

22-*trans*-colest-5,22-dien-3 β -ol (VIII, 1.0 %)

24-metilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (X, 1.3 %)

22-*trans*-24 ξ -metilcolest-5,22-dien-3 β -ol (XI, 0.3 %)

24-*nor*-colest-5,22-dien-3 β -ol (VII, 1.0 %)

24 ξ -etilcolest-5-en-3 β -ol (XV, 0.8 %)

24- ξ -metilcolest-5-en-3 β -ol (XII, 0.3 %)

24- ξ -metil-5 α -colest-3 β -ol (XIII, trazas)

24-*trans*-24-etilcolest-5,24(28)-dien-3 β -ol (XIV, trazas)

En esta especie no fueron detectados compuestos fenólicos.

Fracción 8: fue identificado el carotenoide XXI (zeaxantina, 3 mg).

Fraciones 9 y 10: fueron identificados los monoglicéridos XXII, XXIII, XXV y XXVI, y los siguientes carotenoides: fucoxantina (XXIV, 18 mg); (6'S)-fucoxantina, (XXVII, 2 mg); (8R)-mutatoxantina (XXVIII, 8 mg) y (8S)-mutatoxantina, (XXIX, 8 mg).

Fración 11: compuesta por los monoglicéridos XXII y XXIII.

Fraciones 12 y 13: fueron identificados los siguientes carotenoides: fucoxantínol (XXX, 10 mg) y (6'S)-fucoxantínol (XXXI, 1 mg).

Fraciones 14 y 15: fueron identificados los galactolípidos XXXII-XXXVI, XXXVIII y XXXIX.

DATOS ESPECTROSCOPICOS Y CONSTANTES FISICAS DE LOS
COMPUESTOS AISLADOS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

Hidrocarburos lineales: fueron analizados por CGL comparando sus tr. con los de testigos. Se utilizó una columna SE-30, (ver pág 186), temperatura: 130→250 °C; 10 °C/min.

tr.(min.): 3.16 (n-C₁₅H₃₂); 5.17 (n-C₁₇H₃₆)

La identidad de estos compuestos fue comprobada por CGL-EM (columna OV-17 3 %, ver pág. 187), temperatura: 100→290 °C; 10 °C/min.; tr n-C₁₅H₃₂: 5.70 min.

EM m/z (%) : 212 (2); 169 (1); 155 (2); 141 (3); 139 (1); 127 (5); 113 (8); 111 (10); 99 (16); 97 (24); 85 (59); 83 (31); 71 (87); 59 (34); 57 (100); 55 (34); 43 (78).

tr n-C₁₇H₃₆: 9.10 min.

EM m/z (%): 240 (15); 198 (5); 183 (7); 169 (9); 155 (11); 141 (13); 127 (17); 125 (3); 113 (24); 111 (7); 99 (37); 97 (14); 85 (89); 83 (17); 71 (99); 69 (21); 57 (100); 55 (26); 43 (84).

En los mismos cromatogramas se detectaron trazas de azufre:

EM m/z (%): 256 (4); 224 (4); 192 (25); 159 (12); 128 (10); 96 (8); 64 (100).

Escualeno (II): El análisis espectroscópico de este compuesto fue efectuado por CGL-EM, RMN-¹H, RMN-¹³C y comparación con testigo en CGL.

CGL: columna OV-17 (ver pág. 187), temperatura: 100→280 °C 10 °C/min; tr: 9.80 min; tr testigo: 9.78 min.

CGL-EM: columna OV-17 3 % (ver pág. 187); temp.: 150→300 °C 10 °C/min; tr.: 15.10 min.

EM m/z (%): 410 (5); 367 (2); 341 (7); 273 (3); 204 (5); 137 (46); 136 (29); 135 (13); 123 (20); 121 (20); 109 (15); 107 (12); 95 (27); 93 (19); 81 (99); 69 (100); 41 (32).

RMN-¹H: 5.15 (s.a., 6H, -MeC=CH^δ-); 1.74 (s, 6H, CH₃-1,24); 1.62 (s, 18H, CH₃-25,26,27,28,29,30).

RMN-¹³C: 134.8 (C-10,C-15); 134.6 (C-6,C-19); 130.9 (C-2,C-23); 124.3 (C-7,C-11,C-14,C-18); 124.2 (C-3,C-22); 39.7 (C-5,C-9,C-16,C-20); 28.3 (C-12,C-13); 26.8 (C-4,C-21); 27.7 (C-8,C-17); 25.6 (C-1,C-24); 17.6 (C-25,C-30); 16.0 (C-29)

Ester etílico del ácido C_{20:5} ω -3 (IV): fue caracterizado por CGL, CGL-EM y RMN-¹H.

CGL: columna OV-101 2% (ver pág. 186); temp: 80→280 °C; 10 °C/min; tr: 11.79 min.

CGL-EM: col. capilar SP-2100 (ver pág. 187); temp: 100→280 °C; 10 °C/min; tr: 6.34 min.

EM m/z (%): 330 (2); 201 (3); 173 (3); 161 (4); 147 (6); 145 (6); 133 (13); 131 (12); 119 (22); 117 (16); 105 (30); 93 (41); 91 (70); 79 (100); 67 (59); 55 (42).

RMN-¹H: 5.38 (m, 10H, -HC=CH-); 4.12 (c, J: 7 Hz, -O-CH₂-CH₃); 2.82 (m, 8H, -HC=CH-CH₂-HC=CH-); 2.30 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COOR); 2.08 (m, 4H, -CH₂-HC=CH-); 1.70 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-COOR); 0.97 (t, J: 7 Hz, 3H, CH₃).

Fitol (V): fue caracterizado por RMN-¹H y RMN-¹³C

RMN-¹H: 5.42 (t, J: 7Hz, 1H, H-2); 5.14 (d, J: 7 Hz, 2H, H-1); 2.00 (s.a., 2H, H-4); 1.67 (s, 3H, H-17); 0.88 (d, J: 7 Hz, 9H, H-18,19,20).

RMN-¹³C: 140.0 (C-3); 122.9 (C-2); 59.3 (C-1); 39.8 (C-4); 39.3 (C-6); 37.3 (C-8,C-10,C-12); 36.6 (C-14); 32.7 (C-7,C-11); 32.6 (C-15); 27.9 (C-17); 25.1 (C-5); 24.8 (C-13); 24.4 (C-9); 22.7 (C-18,C-19); 19.7 (C-16,C-20).

Acidos grasos: fueron caracterizados por CGL de sus ésteres metílicos, preparados con CH₂N₂ por la técnica general.

columna capilar: SP-2340 (ver pág. 187); temp: 160→235 °C;
10 °C/min.

tr: 2.14 (C_{14:0}); 2.59 (C_{15:0}); 3.30 (C_{16:0}); 3.74
(C_{16:1}); 5.32 (C_{18:0}); 6.10 (C_{18:1}); 13.09 (C_{20:4});
14.12 (C_{20:5})

Esteroles: el análisis de las mezclas de esteroles libres fue efectuado por CGL con columna capilar SP-2100 o HP-5 (ver pág. 187), temp: 260 °C, y comparación de sus t.r.r. con los de compuestos patrón.

El análisis por CGL-EM fue realizado utilizando una columna OV-17 3% (long. 1.80 m; temp. 200→280 °C; 10 °C/min) o una columna capilar SP-2100 (long. 12 m.; temp. 200→280 °C; 10°C/min)

EM: m/z (%)

Colest-5-en-3β-ol (VI): 386 (M⁺, 95); 371 (35); 368 (43); 353 (44); 315 (3); 301 (59); 275 (26); 273 (11); 255 (33); 247 (20); 231 (26); 213 (35); 145 (38); 43 (100).

Colesta-5,24-dien-3β-ol (IX): 384 (M⁺, 25); 369 (18); 366 (15); 351 (14); 300 (12); 299 (16); 281 (9); 273 (18); 271 (100); 255 (12); 253 (35); 245 (12); 213 (10); 69 (75).

22-trans-Colesta-22-dien-3β-ol (VIII): 384 (M⁺, 71); 369 (5); 366 (6); 351 (5); 301 (6); 300 (76); 299 (4); 273 (11); 271 (12); 255 (80); 231 (3); 229 (4); 213 (8); 69 (100).

24-Metilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol (X): 398 (M⁺, 14); 383 (12); 380 (6); 365 (10); 314 (10); 300 (20); 299 (25); 296 (15); 281 (32); 271 (50); 255 (10); 253 (21); 231 (9); 229 (24); 213 (18); 211 (12); 55 (93).

24-nor-Colesta-5,22-dien-3 β -ol (VII): 370 (M⁺, 12); 355 (?); 352 (3); 337 (3); 300 (8); 299 (1); 285 (3); 273 (4); 271 (6); 255 (13); 253 (2); 213 (4); 55 (74).

24 ξ -Eticolest-5-en-3 β -ol (XV): 414 (M⁺, 100); 399 (9); 396 (14); 381 (8); 329 (10); 315 (2); 303 (14); 275 (4); 273 (7); 255 (8); 231 (7); 213 (10); 43 (99).

22-trans-24- ξ -Metilcolesta-5,22-dien-3 β -ol (XI): 398 (M⁺, 70); 383 (6); 380 (6); 365 (5); 314 (6); 301 (10); 300 (61); 282 (4); 273 (37); 271 (63); 255 (86); 245 (3); 213 (48); 55 (100).

24- ξ -Metilcolest-5-en-3 β -ol (XII): 400 (M⁺, 90); 385 (30); 382 (41); 367 (24); 315 (26); 289 (40); 275 (14); 273 (25); 255 (28); 231 (20); 213 (29); 43 (100).

24- ξ -Metil-5 α -coleston-3 β -ol (XIII): 402 (M⁺, 29); 387 (15); 275 (14); 234 (28); 233 (33); 217 (19); 215 (31); 43 (100).

24-Etilcolesta-5,24(28)-dien-3 β -ol (XIV): 412 (M⁺, 15); 397 (8); 394 (6); 314 (100); 300 (15); 299 (31); 296 (15); 281 (17); 271 (26); 255 (11); 229 (23); 213 (10); 211 (12).

Compuestos Fenólicos:

p-Hidroxibenzaldehído (XVI): p.f.: 113-115 °C

EM m/z (%): 122 (100); 121 (77); 93 (83); 65 (64).

RMN-¹H δ (ppm): 9.89 (s, 1H); 7.80 (m, 2H); 7.04 (m, 2H)
(sist. AA'BB').

CGL: col. OV-17 (ver pág. 187, temp 100→280 °C, 8 °C/min;
tr. 7.30 min.

CGL-EM: col. OV-17 3 % (ver pág. 187); temp 100→280 °C;
8 °C / min; tr. 7.50 min.

3-Bromo-4-hidroxibenzaldehído (XVII):

CGL-EM: col. OV-17 3 % (ver pág. 187); temp 100→280 °C; 8 °C / min;
tr. 7.40 min.

EM m/z (%): 202 (86); 201 (100); 200 (94); 199 (95); 174 (1); 173 (10); 172 (1); 171 (10); 145 (6); 143 (7); 92 (71); 63 (98); 53 (65).

3-Cloro-4-hidroxibenzaldehído (XVIII):

CGL-EM: col. OV-17 3 % (ver pág. 187); temp 100→280 °C; 8 °C / min;
tr. 5.10 min.

EM m/z (%): 158 (24); 157 (38); 156 (74); 155 (100); 129 (7); 127 (19); 101 (6); 99 (19); 91 (7); 73 (16); 65 (19); 53 (12).

Acido p-hidroxifenilgloxílico (XIX):

CGL-EM: col. OV-17 3 % (ver pág. 187); temp 100→280 °C;

8 °C / min; tr. 10.20 min.

EM m/z (%): 166 (72); 138 (100); 122 (72); 121 (88); 93 (73); 65 (91).

Acido p-hidroxifenilpirúvico (XX):

CGL-EM: col. OV-17 3 % (ver pág. 187); temp 100→280 °C;

8 °C / min; tr. 10.90 min.

EM m/z (%): 180 (66); 125 (1); 107 (100); 93 (6); 77 (17); 65 (11).

Carotenoides:

EM m/z (%):

β,β-Caroteno (III): 536 (100); 458 (7); 444 (61); 430 (110); 399 (11); 378 (17); 346 (15); 241 (9); 235 (10); 223 (12); 221 (12); 211 (12); 203 (15); 197 (20); 177 (48); 171 (29); 159 (29); 157 (34); 133 (34); 121 (47); 119 (88); 107 (43); 105 (53); 95 (60); 93 (28); 81 (42); 69 (75).

Zeaxantina (XXXI): 568 (8); 550 (6); 477(6); 413 (5); 403 (8); 401 (9); 302 (7); 290 (6); 272 (7); 257 (6); 248 (7); 188 (10); 172 (14); 160 (21); 158 (21); 146 (26); 120 (35); 106 (35); 96 (39); 84 (67); 67 (29); 50 (82); 45 (100).

Fucoxantina (XXIV): 658 (4); 640 (7); 622 (3); 580 (3); 562 (2);
504 (1); 314 (5); 275 (8); 247 (5); 221 (49); 197 (61); 159
(50); 150 (52); 149 (58); 121 (55); 119 (56); 109 (69); 105
(50); 92 (60); 91 (75); 83 (100); 60 (47); 55 (50); 47 (70).

6'S-Fucoxantina (XXVII): 658 (10); 640 (8); 622 (5); 580 (1);
562 (4); 504 (3); 314 (9); 275 (6); 247 (3); 221 (57); 197 (78);
159 (62); 150 (43); 149 (81); 121 (67); 119 (75); 109 (91); 105
(33); 92 (74); 91 (83); 83 (100); 60 (37); 55 (39); 43 (50).

(8R)-Mutatoxantina (XXVIII): 584 (83); 566 (5); 548 (1); 504
(93); 492 (5); 438 (6); 404 (4); 299 (9); 247 (11); 221 (86);
181 (80); 159 (69); 157 (90); 145 (74); 143 (48); 121 (73); 107
(75); 105 (84); 95 (80); 93 (78); 91 (82); 85 (73); 83 (100); 81
(69); 69 (74); 55 (76); 43 (85).

(8S)-Mutatoxantina (XXIX): 584 (60); 566 (1); 548 (1); 504 (43);
492 (7); 438 (3); 404 (3); 299 (6); 247 (8); 221 (76); 181 (61);
159 (62); 157 (69); 145 (74); 143 (73); 121 (60); 107 (65); 105
(58); 95 (76); 93 (84); 91 (100); 85 (66); 83 (62); 81 (69); 69
(66); 55 (65); 43 (83).

Fucoxantiniol (XXX): 616 (3); 598 (77); 580 (12); 562 (3); 502
(3); 247 (7); 221 (73); 209 (9); 197 (15); 171 (12); 167 (81);
135 (10); 121 (17); 119 (16); 109 (80); 86 (73); 84 (80); 51
(38); 49 (86); 43 (100).

6'S-Fucoxantanol (XXXI): 616 (8); 598 (70); 580 (18); 562 (1); 247 (12); 221 (88); 209 (4); 197 (22); 171 (28); 167 (78); 135 (14); 121 (23); 119 (11); 109 (97); 86 (65); 84 (87); 51 (44); 49 (90); 45 (67); 43 (100).

RMN-¹H: δ (ppm)

H-C	β-β-Caroteno	Zeaxantina	Fucoxantina	6'S-Fucoxantina
3	1.62 (s.a.)	4.00 (s.a.)	3.83 (s.a.)	3.80 (s.a.)
3'	1.62 (s.a.)	4.00 (s.a.)	5.38 (s.a.)	4.38 (s.a.)
7	6.16 (s.a.)	6.10 (s.a.)	3.68 (d,J:18Hz) 2.61 (d,J:18Hz)	3.66 (d,J:18Hz) 2.60 (d,J:18Hz)
8	6.14 (s.a.)	6.16 (s.a.)		
8'	6.14 (s.a.)	6.16 (s.a.)	6.06 (s.a.)	6.59 (s.a.)
16	1.03 (s)	1.08 (s)	0.97 (s)	0.98 (s)
16'	1.03 (s)	1.08 (s)	1.08 (s)	1.11 (s)
17	1.03 (s)	1.08 (s)	1.04 (s)	1.05 (s)
17'	1.03 (s)	1.08 (s)	1.36 (s)	1.38 (s)
18	1.73 (s)	1.74 (s)	1.23 (s)	1.23 (s)
18'	1.73 (s)	1.74 (s)	1.39 (s)	1.40 (s)
19	1.99 (s)	1.98 (s)	1.95 (s)	1.95 (s)
19'	1.99 (s)	1.98 (s)	1.82 (s)	1.83 (s)
20	1.99 (s)	1.98 (s)	2.00 (s)	2.00 (s)
20'	1.99 (s)	1.98 (s)	2.00 (s)	2.00 (s)
AcO ⁻			2.05 (s)	2.05 (s)

	H-C FucoxantínoI	6'S-FucoxantínoI	(8R)-Mutatoxantina	(8S)-Mutatoxantina
3	3.82 (s.a.)	3.84 (s.a.)	4.25 (s.a.)	4.25 (s.a.)
3'	4.35 (s.a.)	4.32 (s.a.)	4.00 (s.a.)	4.00 (s.a.)
7	3.66 (d,J:18Hz) 2.59 (d,J:18Hz)	3.67 (d,J:18Hz) 2.59 (d,J:18Hz)	5.26 (s.a.)	5.33 (d,J:2Hz)
8			5.18 (s.a.)	5.08 (d,J:2Hz)
8'	6.04 (s.a.)	6.57 (s.a.)	6.16 (s.a.)	6.16 (s.a.)
16	0.96 (s)	0.97 (s)	1.18 (s)	1.20 (s)
16'	1.07 (s)	1.10 (s)	1.08 (s)	1.08 (s)
17	1.04 (s)	1.04 (s)	1.34 (s)	1.35 (s)
17'	1.35 (s)	1.35 (s)	1.08 (s)	1.08 (s)
18	1.22 (s)	1.23 (s)	1.62 (s)	1.67 (s)
18'	1.35 (s)	1.39 (s)	1.73 (s)	1.74 (s)
19	1.95 (s)	1.95 (s)	1.73 (s)	1.81 (s)
19'	1.82 (s)	1.82 (s)	1.98 (s)	1.97 (s)
20	2.00 (s)	2.00 (s)	1.98 (s)	1.97 (s)
20'	2.00 (s)	2.00 (s)	1.98 (s)	1.97 (s)

Tabla 15: señales en RMN-¹H de los carotenoides aislados en este Trabajo de Tesis.

RMN-¹³C: δ (ppm)

C n°	III	XXI	XXIV	XXX	XXVIII	XXIX
1	34.3	37.2	35.1	35.1	33.6	34.2
2	39.6	48.4	47.1	47.0	47.4	47.3
3	19.3	65.0	64.2	64.2	67.6	67.9
4	33.1	42.5	41.6	41.6	46.7	47.3
5	129.2	126.0	66.0	66.0	86.8	87.0
6	137.8	138.3	67.0	67.0	153.9	153.0
7	126.5	125.4	40.8	40.8	119.8	118.6
8	137.6	138.5	197.5	197.6	87.6	88.3
9	135.8	135.5	134.4	134.4	137.8	137.4
10	130.7	131.1	138.8	138.9	127.1	126.0
11	124.8	124.7	123.2	123.2	124.2	124.3
12	137.1	137.6	144.8	144.8	137.4	137.1
13	136.3	137.4	136.9	136.8	136.1	136.1
14	132.4	132.4	135.2	135.2	132.2	132.2
15	129.8	129.9	132.0	131.9	129.8	129.7
16	28.9	30.2	28.1	28.1	28.9	30.6
17	28.9	28.7	25.0	25.0	29.0	31.2
18	21.7	21.6	21.4	21.1	31.3	28.1
19	12.8	12.8	11.8	11.8	12.6	13.4
20	12.8	12.8	12.7	12.7	12.6	12.8
C-1 Ac			170.5			
C-2 Ac			21.1			

C n°	δ (ppm)					
	III	XXI	XXIV	XXX	XXVIII	XXIX
1'	34.3	37.2	35.7	35.8	37.1	37.1
2'	39.6	48.4	45.4	49.4	48.4	48.4
3'	19.3	65.0	68.0	64.2	65.0	65.0
4'	33.1	42.5	45.2	48.9	42.5	42.5
5'	129.2	126.0	72.5	72.9	126.0	125.9
6'	137.8	138.3	117.4	117.6	138.3	138.3
7'	126.5	125.4	202.1	202.2	125.4	125.4
8'	137.6	138.5	103.3	103.1	138.5	138.5
9'	135.8	135.5	132.3	132.5	135.5	135.5
10'	130.7	131.1	128.3	128.2	131.1	131.1
11'	124.8	124.7	125.5	125.6	124.7	124.7
12'	137.1	137.6	137.8	138.0	137.6	137.4
13'	136.3	137.4	136.4	136.4	137.4	137.4
14'	132.2	132.4	132.3	132.3	132.3	132.3
15'	129.8	129.9	129.2	129.2	129.8	129.8
16'	28.9	30.2	31.2	31.3	30.2	30.2
17'	28.9	28.7	32.1	32.1	28.7	28.7
18'	21.7	21.6	29.2	29.3	21.5	21.5
19'	12.8	12.8	14.0	14.0	12.8	12.8
20'	12.8	12.8	12.9	12.9	12.8	12.8

Tabla 16: Señales en RMN-¹³C de los carotenoides detectados en este Trabajo de Tesis.

Monoglicéridos:

XXII:

EM m/z (%): 376 (8); 345 (3); 320 (2); 307 (7); 280 (8); 256 (10);
240 (51); 215 (57); 201 (61); 175 (72); 148 (71); 133 (61); 119
(55); 105 (86); 91 (97); 81 (77); 79 (100); 69 (68); 55 (54); 41
(79).

RMN-¹H: 5.41 (m, 10H, -HC=CH-); 4.19 (m, 2H, H-*sn*-1 glíc.); 3.88
(m, 1H, H-*sn*-2 glíc.); 3.65 (m, 2H, H-*sn*-3 glíc.); 2.84
(m, 8H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.38 (m, 2H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.11
(m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.74 (m, 2H, H-3); 0.98 (t, J 7Hz, 3H,
CH₃).

XXIII:

EM m/z (%): 378 (63); 361 (5); 347 (7); 286 (7); 280 (8); 256 (5);
240 (63); 236 (11); 203 (63); 201 (50); 189 (54); 177 (53); 175
(56); 161 (69); 147 (68); 131 (80); 120 (73); 106 (91); 93 (5); 80
(100); 67 (75); 57 (56); 41 (83).

RMN-¹H: 5.38 (m, 8H, -HC=CH-); 4.19 (m, 2H, H-*sn*-1 glíc.); 3.85
(m, 1H, H-*sn*-2 glíc.); 3.62 (m, 2H, H-*sn*-3 glíc.); 2.84
(m, 6H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.35 (m, 2H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.11
(m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.76 (m, 2H, H-3); 1.28 (s, 6H); 0.89
(m, 3H, CH₃).

XXV:

EM m/z (%): 330 (43); 300 (50); 270 (69); 257 (80); 240 (74); 196
(33); 182 (66); 176 (50); 154 (50); 134 (65); 112 (80); 98 (100);
73 (69); 56 (75).

RMN-¹H: 4.19 (m, 2H, H-*sn*-1 glic.); 3.85 (m, 1H, H-*sn*-2 glic.); 3.62 (m, 2H, H-*sn*-3 glic.); 2.35 (t, 2H, J 7Hz); 1.25 (s, 22H); 0.92 (m, 3H, CH₃).

XXVI:

EM m/z (%): 356 (25); 326 (34); 296 (70); 283 (61); 266 (79); 213 (26); 202 (28); 180 (41); 123 (50); 97 (100); 93 (26); 73 (58); 55 (40); 41 (52).

RMN-¹H: 5.35 (m, 2H, H-9 H-10); 4.19 (m, 2H, H-*sn*-1 glic.); 3.86 (m, 1H, H-*sn*-2 glic.); 3.63 (m, 2H, H-*sn*-3 glic.); 2.35 (m, 2H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.12 (m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.25 (s, 24H); 0.98 (m, 3H, CH₃).

Galactolipidos:

XXXII:

RMN-¹H: 5.38 (m, 21H, -HC=CH- + C-1 gal.); 2.84 (m, 16H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.33 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.08 (m, 8H, -CH₂*-HC=CH-); 1.71 (m, 4H, H-3); 0.97 (t, J:7 Hz, 6H, H-20).

RMN-¹³C: 173.3 (C-1 *sn*-1); 172.9 (C-1 *sn*-2); 131.7 (C-18); 128.7 (C-5); 128.6 (C-15); 128.3 (C-14); 128.0 (C-12, C-9); 127.9 (C-11, C-8); 127.6 (C-6); 104.0 (C-1 gal.); 74.6 (C-5 gal.); 73.4 (C-3 gal.); 70.3 (*sn*-2 glic.); 69.0 (C-4 gal.); 68.2 (*sn*-3 glic.); 63.0 (*sn*-1 glic.); 61.6 (C-6 gal.); 33.4 (C-2 *sn*-1); 33.3 (C-2 *sn*-2); 26.4 (C-4); 24.6 (C-3); 20.5 (C-19); 14.2 (C-20).

EM/FAB⁺ m/z (%): 847 (85); 644 (22); 522 (14); 360 (100); 314 (5); 286 (7); 244 (5); 202 (28).

XXXIII:

RMN-¹H: 5.39 (m, 19H, -HC=CH- + C-1 gal.); 2.84 (m, 14H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.37 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.09 (m, 8H, -CH₂*-HC=CH-); 1.71 (m, 4H, H-3); 1.25 (s, 6H); 0.98 (m, 6H, CH₃).

RMN-¹³C: 173.4 (C-1 *sn*-1); 172.9 (C-1 *sn*-2); 131.7 (C-18 EPA); 130.3 (C-15 ARA); 128.7 (C-5 ARA, C-5 EPA); 128.6 (C-15 EPA); 128.4 (C-12 ARA, C-14 EPA); 128.1 (C-11 ARA); 128.0 (C-9 ARA, C-9 EPA, C-12 EPA); 127.9 (C-8 ARA, C-8 EPA, C-11 EPA); 127.7 (C-14 ARA); 127.3 (C-6 ARA, C-6 EPA); 126.8 (C-17 EPA); 103.9 (C-1 gal.); 74.6 (C-5 gal.); 73.4 (C-3 gal.); 70.3 (*sn*-2); 69.0 (C-4 gal.); 68.2 (*sn*-3); 63.0 (*sn*-1); 61.6 (C-6 gal.); 33.6 (C-2 *sn*-1); 33.5 (C-2 *sn*-2); 31.5 (C-18 ARA); 29.3 (C-17 ARA); 27.2 (C-16 ARA); 26.5 (C-4 EPA); 25.6 (C-4 ARA); 25.3 (C-3 ARA); 24.7 (C-3 EPA); 22.5 (C-19 ARA); 20.5 (C-19 EPA); 14.2 (C-20 EPA); 14.0 (C-20 ARA).

ARA: señales correspondientes al grupo araquidonilo.

EPA: señales correspondientes al grupo eicosapentaenoilo.

EM/FAB⁺ m/z (%): 849 (30); 362 (48); 360 (100); 286 (45); 240 (20); 202 (52); 136 (50).

XXXIV:

RMN-¹H: 5.38 (m, 11H, -HC=CH- + C-1 gal.); 2.82(m, 8H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.32 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.08 (m, 8H, -CH₂*-HC=CH-); 1.65 (m, 4H, H-3); 1.25 (s, 20H); 0.96(m, 6H, CH₃)

RMN-¹³C: 173.2 (C-1 *sn*-1); 173.1 (C-1 *sn*-2); 131.7 (C-18 EPA); 128.6 (C-15 EPA); 128.3 (C-14 EPA); 127.9 (C-9 EPA, C-12 EPA); 127.8 (C-8 EPA); 127.6 (C-11 EPA); 127.4 (C-6 EPA); 126.8 (C-17 EPA); 103.8 (C-1 gal.); 74.7 (C-5 gal.); 73.5 (C-3 gal.); 70.3 (*sn*-2); 69.0 (C-4 gal.); 68.1 (*sn*-3); 62.9 (*sn*-1); 61.8 (C-6 gal.); 34.2 (C-2 *sn*-1); 33.5 (C-2 *sn*-2); 31.9 (C-14 PAL); 29.7 (C-6 → 12 PAL); 29.3 (C-4 PAL); 29.1 (C-13 PAL); 26.5 (C-4 EPA); 24.9 (C-3 PAL); 24.7 (C-3 EPA); 22.6 (C-15 PAL); 20.5 (C-19 EPA); 14.2 (C-20 EPA); 14.1 (C-16 PAL).

EPA: señales correspondientes al grupo eicosapentaenoilo.

PAL: señales correspondientes al grupo palmitoilo.

EM/FAB⁺ m/z (%): 801 (70); 598 (23); 476 (7); 360 (18); 314 (100); 286 (5); 240 (15); 202 (10).

EM/IE m/z (%): 615 (8); 342 (10); 314 (100); 284 (5); 240 (35); 201 (15); 175 (20); 91 (52); 71 (43).

XXV:

RMN-¹H: 5.39 (m, 9H, -HC=CH- + C-1 gal.); 2.82 (m, 6H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.36 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.10 (m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.64 (m, 4H, H-3); 1.27 (s, 22H); 0.88 (m, 6H, CH₃).

RMN-¹³C: 173.2 (C-1 *sn*-1); 173.1 (C-1 *sn*-2); 130.3 (C-15 ARA); 128.7 (C-5 ARA); 128.6 (C-12 ARA); 128.1 (C-11 ARA); 127.9 (C-9 ARA); 127.7 (C-14 ARA); 127.6 (C-8 ARA); 127.5 (C-6 ARA); 104.0 (C-1 gal.); 74.6 (C-5 gal.); 73.5 (C-3 gal.); 70.3 (*sn*-2); 68.9 (C-4 gal.); 68.1 (*sn*-3); 63.1 (*sn*-1); 61.7 (C-6 gal.);

34.3 (C-2 *sn*-1); 33.6 (C-2 *sn*-2); 31.9 (C-14 PAL); 31.5 (C-18 ARA); 29.7 (C-6 → C-12 PAL); 29.6 (C-5 PAL, C-13 PAL); 29.3 (C-17 ARA); 29.2 (C-4 PAL); 27.2 (C-16 ARA); 25.6 (C-13 ARA); 24.9 (C-3 PAL); 22.7 (C-15 PAL); 22.6 (C-19 ARA); 14.1 (C-20 ARA, C-16 PAL).

ARA: señales correspondientes al grupo araquidonilo.

PAL: señales correspondientes al grupo palmitoilo.

EM/FAB⁺ m/z (%): 803 (95); 600 (30); 548 (15); 476 (15); 362 (22); 314 (100); 286 (12); 240 (17); 204 (14); 136 (22).

XXXVI:

RMN-¹H: 5.35 (m, 3H, -HC=CH- + C-1 gal.); 2.32 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR); 2.00 (m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.25 (s, 48 H); 0.89 (m, 6H, CH₃).

RMN-¹³C: 173.6 (C-1 *sn*-1); 173.2 (C-1 *sn*-2); 129.8 (C-10 OL); 129.5 (C-9 OL); 103.9 (C-1 gal.); 74.6 (C-5 gal.); 73.6 (C-3 gal.); 70.3 (*sn*-2); 69.0 (C-4 gal.); 68.1 (*sn*-3); 63.0 (*sn*-1); 61.7 (C-6 gal.); 34.2 (C-2); 31.9 (C-14 PAL, C-12 OL); 29.7 (C-6 → C-12 PAL, C-12 → C-15 OL); 29.3 (C-4 PAL, C-4 → C-6 OL); 27.2 (C-8, C-11 OL); 24.8 (C-3 PAL, C-3 OL); 22.6 (C-15 PAL, C-17 OL); 14.1 (C-16 PAL, C-18 OL).

PAL: señales correspondientes al grupo palmitoilo.

OL: señales correspondientes al grupo oleilo.

EM/FAB⁺ m/z (%): 781 (100); 578 (37); 340 (50); 314 (55); 266 (7); 240 (8); 136 (10).

XXXVII:

RMN-¹H: 3.5 - 4.9 (s.a., 17H); 2.32 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR);

1.27 (s, 44H); 0.88 (m, 6H, CH₃).

RMN-¹³C: 173.3 (C-1 *sn*-1); 173.2 (C-1 *sn*-2); 104.0 (C-1

gal.); 74.6 (C-5 gal.); 73.4 (C-3 gal.); 70.3 (*sn*-2); 69.0 (C-4

gal.); 68.1 (*sn*-3); 63.0 (*sn*-1); 61.7 (C-6 gal.); 33.9 (C-2);

31.8 (C-14); 29.6 (C-6 → C-12); 29.3 (C-4); 24.2 (C-3); 22.6 (C-15);

14.1 (C-16).

XXXVIII:

RMN-¹H: 5.40 (m, 22H, -HC=CH- + C-1 gal.); 3.5 - 4.5 (s.a., 23H);

2.84 (m, 16H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.36 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR);

2.08 (m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.68 (m, 4H, H-3); 0.99 (t, J:7 Hz, 6H,

CH₃).

XXXIX:

RMN-¹H: 5.39 (m, 17H, -HC=CH- + C-1 gal.); 3.5 - 4.5 (s.a., 14H);

2.81 (m, 12H, -HC=CH-CH₂*-HC=CH-); 2.35 (m, 4H, -CH₂-CH₂*-COOR);

2.09 (m, 4H, -CH₂*-HC=CH-); 1.62 (m, 4H, H-3); 1.25 (s, 8H); 0.96

(m, 6H, CH₃).

RESUMEN

El objetivo de este Trabajo de Tesis fue el aislamiento y elucidación estructural de los componentes de los extractos realizados con solventes orgánicos de tres especies de algas rojas pertenecientes a la familia Corallinaceae: *Corallina officinalis*, *Corallina elongata* y *Jania sp.* Dichas especies son particularmente abundantes en el litoral marítimo bonaerense. El estudio químico comparativo de las mismas permitió delinear algunas características quimiotaxonómicas de esta familia.

Teniendo en cuenta estos objetivos se desarrollaron los siguientes temas:

1) Introducción al estudio de metabolitos secundarios de algas rojas. Clasificación de las algas rojas y particularmente de la familia Corallinaceae. Estudios realizados sobre metabolitos secundarios de algas rojas. Aspectos de la recolección, tratamiento y extracción del material vegetal. Estudios químicos realizados sobre algas de la familia Corallinaceae.

2) Carotenoides: Introducción a esta familia de compuestos. Su importancia en el ámbito marino. Aislamiento y elucidación estructural por RMN-¹H, RMN-¹³C y EM.

3) Galactosildiglicéridos: Introducción a esta familia de compuestos. Su importancia a nivel celular. Aislamiento y elucidación estructural por RMN-¹H, RMN-¹³C y EM.

4) Descripción de la labor realizada: Fraccionamiento de los extractos. Aislamiento y elucidación estructural de los componentes de las distintas fracciones utilizando métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN-¹H, RMN-¹³C, EM, y EM/FAB⁺) y químicos.

5) Discusión de los resultados obtenidos: Conclusiones e implicancia de los resultados obtenidos para los distintos tipos de compuestos desde el punto de vista biosintético y quimiotaxonómico.

La comparación de los resultados obtenidos en las tres especies estudiadas permitió delinear el siguiente perfil quimiotaxonómico para la familia *Corallinaceae*:

hidrocarburos: n-heptadecano (I) como único hidrocarburo lineal mayoritario. Escualeno (II) como único hidrocarburo isoprénico.

ácidos grasos libres: C_{16:0} como componente mayoritario, C_{18:1}, C_{20:5}, C_{20:4}, pequeñas cantidades de C_{16:1}, C_{14:0}, C_{15:0} y C_{18:0}.

esteroles: perfil típico hallado en algas rojas. Colest-5-en-3β-ol (VI) como componente mayoritario en porcentaje superior al 90 %. Otros componentes (VII - XV) en proporción del 1 % o menor. La presencia de 24-nor-colesta-5,22-dien-3β-ol (VII) es notable ya que se trata de un esteroide no característico de algas rojas.

compuestos fenólicos: sólo fueron detectados en *C. officinalis* y *C. elongata*. En *C. officinalis* se encontraron los compuestos XVI, XVII, XVIII, XIX y XX, mientras que en *C. elongata* solo fueron detectados XVI y XVII. En *Jania sp.* no fueron detectados compuestos fenólicos. Se observó una marcada variación estacional en la producción de este tipo de compuestos en las especies estudiadas. El compuesto XVIII (caracterizado tentativamente como 3-Cl-4-hidroxibenzaldehído) representaría el primer C-7 fenol clorado detectado en el ámbito marino.

alcoholes: en las tres especies estudiadas se detectó el alcohol diterpénico *trans*-fitol.

monoglicéridos: se detectaron principalmente los correspondientes a los ácidos C_{20:5} ω-3 y C_{20:4} ω-6, y en menor proporción los correspondientes a C_{16:0} y C_{18:1}.

carotenoides: el principal carotenoide en las tres especies estudiadas fue β,β-caroteno (III). En las tres especies se detectó además, zeaxantina (XXI), fucoxantina (XXIV), fucoxantínol (XXX) y los epímeros 6'S de estos dos últimos compuestos (XXVII y XXXI respectivamente). En *C. officinalis* y *Jania Sp.* se encontraron cantidades apreciables de (8R) y (8S)-mutatoxantina (XXVIII y XXIX), mientras que en *C. elongata* estos compuestos fueron detectados sólo a nivel de trazas. Las cantidades aisladas de los compuestos XXIV y XXX, así como de sus epímeros 6'S permitió comprobar que estos carotenoides alénicos pueden ser biosintetizados por algas rojas. A su vez, los compuestos XXVIII y XXIX fueron detectados por primera vez en el ámbito marino en este Trabajo de Tesis.

galactosildiglicéridos: se observó una preponderancia de los compuestos correspondientes a ácidos grasos poliinsaturados, principalmente XXXII y XXXIV. Se realizó un estudio sobre la distribución de los distintos ácidos grasos en estos compuestos utilizando EM/FAB⁺, en lo que representó la primera aplicación de esta técnica al análisis de galactosildiglicéridos. Asimismo, se realizó un estudio de secuencia genética de iones con el compuesto XXXIV, utilizando la técnica de EM/EM.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Scheuer, P. J., "Chemistry of Marine Natural Products", Academic Press (1973).
- [2] "Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives", (ed: P.J. Scheuer), Academic Press, vol. I y II (1978), vol. III (1980), vol. IV (1981), vol. V (1983).
- [3] "Marine Natural Products Chemistry", (ed: D.J. Faulkner, W. Fenical), NATO Conference Series IV, Marine Sciences, Plenum Press, (1977).
- [4] J. Baker, V. Murphy, "Compounds from Marine Organisms", Handbook in Marine Science Series, CRC Press, vol. I (1976), vol. II (1981).
- [5] J. Siuda y J. De Bernardis. *Lloydia* **36**, 107 (1973).
- [6] D. Faulkner y R. Anderson, en "The Sea", (ed: E. Goldberg), Vol. V, Wiley, N.Y., (1974).
- [7] W. Fenical. *J. Phycology* **11**, 245 (1975).
- [8] D. Bhakuni y M. Silva. *Bot. Mar.* **17**, 40 (1974).
- [9] D. Faulkner. *Tetrahedron*, **33**, 1 (1978).
- [10] D. Faulkner. *Nat. Prod. Rep.*, **1**, 251 (1984).
- [11] D. Faulkner. *Nat. Prod. Rep.*, **3**, 1 (1986).
- [12] M. Baslow. "Marine Pharmacology", Williams and Wilkins Publishers, Baltimore (1969).
- [13] D. F. Martin y G. Padilla. "Marine Pharmacognosy", Academic Press, (1973).
- [14] J. Accorinti. "Algas: fuente potencial de nuevos fármacos", Pub. N°18 Recursos Marinos, Dirección Nacional del Antártico - Instituto Antártico Argentino, (1987).

- [15] L. Jaenicke. "Biochemistry of Sensory Functions", Springer-Verlag, (1974).
- [16] P. Grant y A. Mackie. "Chemoreception in Marine Organisms", Academic Press, (1974).
- [17] R. Moore. *Acc. Chem. Res.* **10**, 40 (1977).
- [18] C. Ireland, M. Stallard, D. Faulkner, J. Finer y J. Clardy. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3413 (1973).
- [19] B. Willcott, J. Davis, D. Faulkner y M. Stallard. *Tetrahedron Lett.*, 3967 (1973).
- [20] D. Faulkner y M. Stallard. *Tetrahedron Lett.*, 1171 (1973)
- [21] D. Faulkner y M. Stallard. *Comp. Biochem. Physiol.* **49B**, 25 (1974).
- [22] M. Stallard y D. Faulkner. *Comp. Biochem. Physiol.* **49B**, 37 (1974).
- [23] D. Faulkner, M. Stallard, J. Fayos y J. Clardy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 3654 (1974).
- [24] C. Ireland, M. Stallard, D. Faulkner, J. Finer y J. Clardy. *J. Org. Chem.* **41**, 2461 (1976).
- [25] I. Kato y P. Scheuer. *Pure & Appl. Chem.* **41**, 1 (1975).
- [26] P. Scheuer. *Acc. Chem. Res.* **10**, 33 (1977).
- [27] I. Kato y P. Scheuer. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 2245 (1974).
- [28] I. Kato y P. Scheuer. *Pure Appl. Chem.* **48**, 29 (1976).
- [29] J. Rose, P. Scheuer, R. Springer y J. Clardy. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 7665 (1978).
- [30] P. Silva. "CRC Handbook of Biosolar Resources", (ed: O. Saborsky), (1982).

- [31] O. Mc. Connell y W. Fenical. *Phytochemistry* **16**, 367 (1977).
- [32] F. Woolard, R. Moore y P. Roller. *Phytochemistry* **18**, 617 (1979).
- [33] O. Mc. Connell y W. Fenical. *Phytochemistry* **19**, 233 (1980).
- [34] A. Rose, J. Pettus y J. Sims. *Tetrahedron Lett.* 1847 (1979).
- [35] R. Kazlauskas, R. Lidgard y R. Wells. *Tetrahedron Lett.* 3165 (1978).
- [36] P. Crews. *J. Org. Chem.* **42**, 2634 (1977).
- [37] J. Mynderse y D. Faulkner. *Tetrahedron* **31**, 1963 (1975).
- [38] J. Blunt, M. Hartshorn, M. Munro y S. Yorkee. *Tetrahedron Lett.* 4417 (1978).
- [39] P. Bates, J. Blunt, M. Hartshorn, A. Jones y M. Munro. *Aust. J. Chem.* **32**, 2545 (1979).
- [40] P. Crews, en "Marine Natural Products", (ed: D. Faulkner, W. Fenical), Plenum Press, (1977), 211.
- [41] M. Brennan y K. Erickson. *Tetrahedron Lett.* 1637 (1978).
- [42] K. Erickson, en "Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives", (ed: P. Scheuer), Academic Press, (1983), Vol V, 131.
- [43] K. Glombitza, H. Stoffelen, V. Munawski, J. Bielaczek y H. Egg. *Planta Medica* **25**, 105 (1974).
- [44] K. Kurata, T. Amiya y K. Yobe. *Nippon Suisan Gakkaishi* **39**, 973 (1973).
- [45] M. Pedersén, P. Saenger y L. Fries. *Phytochemistry* **13**, 2273 (1974).

- [46] L. Lundgren, K. Olsson y O. Theander. *Acta Chem. Scand.* **B33**, 105 (1979).
- [47] T. Higa, en "Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives", (ed: P. Scheuer), Academic Press, (1981), Vol. IV, Cap. 3, 93.
- [48] B. Burreson, F. Woolard y R. Moore. *Tetrahedron Lett.* 2155 (1975).
- [49] F. Woolard, R. Moore, D. Van Engen y J. Clardy. *Tetrahedron Lett.* 2367 (1978).
- [50] F. Woolard, R. Moore, M. Mahendran y A. Sivopolan. *Phytochemistry* **15**, 1069 (1976).
- [51] N. Ichikawa, Y. Naga y S. Enomoto. *Chem. Letters*, 1333 (1974).
- [52] O. Mc. Connell y W. Fenical. *J. Org. Chem.* **43**, 4238 (1978).
- [53] V. Paul, O. Mc. Connell y W. Fenical. *J. Org. Chem.* **45**, 3401 (1980).
- [54] M. L. Mendoza. *Bull. Soc. Phycol. France* **19**, 67 (1974).
- [55] M. L. Mendoza. *Physis, Secc. A* **35**, 15 (1976).
- [56] G. Santos. *J. Chem. Soc. C.* 842 (1970).
- [57] V. Amico, G. Oriente, M. Piattelli, C. Tringalli, E. Fattorusso, S. Magno y L. Mayol. *Tetrahedron Lett.* 3593 (1978).
- [58] J. Madgwick y B. Ralph. *Bot. Mar.* **15**, 205 (1972).
- [59] G. Impellizzeri, S. Magnifico, G. Oriente, M. Piattelli, S. Sciuto, E. Fattorusso, S. Magno, C. Santacroce y D. Sica. *Phytochemistry* **14**, 1549 (1975).
- [60] K. Ito, K. Miyazawa y F. Matsumoto. *J. Fac. Fish. Anim. Hsub. Hiroshima Univ.* **16**, 77 (1977).

- [61] K. Miyazawa, K. Hori y K. Ito. *Hiroshima Daigaku Subutsu Seisangakubu Kiyō* **21**, 11 (1982).
- [62] M. El-Sayed. *J. Fac. Mar. Sci. (King Abdulaziz Univ.)* **3**, 141 (1983).
- [63] M. Karawya, S. Fuad, N. Naim, A. Hamdy, A. El-Refai y L. Sallam. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **21**, 349 (1982).
- [64] R. Johns, P. Nichols y G. Perry. *Phytochemistry* **18**, 799 (1979).
- [65] K. Guven, E. Mutiluay, E. Atkin y H. Koyunchoglu. *Planta Medica* **21**, 5 (1975).
- [66] A. Goldberg, C. Hubby y D. Cobb. *Bot. Mar.* **25**, 351 (1982).
- [67] L. Sallam, A. Hamdy, N. Naim, A. El-Rafei y M. Karawya. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **23**, 179 (1984).
- [68] E. Bogger y H. Johansen. *Phyton* **32**, 129 (1974).
- [69] K. Ohta y M. Takagi. *Phytochemistry* **16**, 1085 (1977).
- [70] K. Ohta y M. Takagi. *Phytochemistry* **16**, 1063 (1977).
- [71] J. A. Palermo, A. M. Seldes y E. G. Gros. *Phytochemistry* **23**, 2688 (1984).
- [72] J. A. Palermo, A. M. Seldes y E. G. Gros. *An. Asoc. Quim. Argent.* **74**, 497 (1986).
- [73] D. Fox, en "Biochemical and Biophysical perspectives in Marine Biology", (ed: D. Malins, J. Sargent), Academic Press, (1974), 173.
- [74] R. Emerson y C. Lewis. *Am. J. Bot.* **30**, 165 (1943).
- [75] J. Goldener. *Biochim. Biophys. Acta* **102**, 73 (1965).
- [76] P. Song, P. Koka, B. Prézelin y F. Haxo. *Biochemistry* **15**, 4422 (1976).

- [77] J. Burnett, en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", (ed: T. Goodwin), Academic Press, (1976), Vol. 1, 655.
- [78] N. Krinsky. *Pure & Appl. Chem.* **51**, 649 (1979).
- [79] S. Liaaen - Jensen. *Pure & Appl. Chem.* **57**, 649 (1985).
- [80] S. Liaaen - Jensen, en "Marine Natural Products, Chemical & Biological Perspectives", (ed: P. Scheuer), Academic Press, (1978), Vol. 2, 1.
- [81] A. Jensen y E. Sakshaug. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **5**, 180 (1970).
- [82] P. O'Carra, en "Chemistry & Biochemistry of Plant Pigments", (ed: T. Goodwin), Academic Press, (1976), Vol. 1.
- [83] J. Porter y S. Spurgeon. *Pure & Appl. Chem.* **51**, 609 (1979).
- [84] G. Britton, W. Lockley, N. Patel, T. Goodwin y G. Englert. *Chem. Commun.* 655 (1977).
- [85] G. Britton, T. Goodwin, W. Lockley, A. Mundy y N. Patel. *Chem. Commun.* 27 (1979).
- [86] B. Milborrow, en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (ed: G. Britton, T. Goodwin), Pergamon Press, (1982), 279.
- [87] T. Björnland y M. Aguilar - Martínez. *Phytochemistry* **15**, 291 (1976).
- [88] M. Mathews - Roth, en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (ed: G. Britton, T. Goodwin, Pergamon Press, (1982), 297.
- [89] M. Mathews - Roth, M. Patlock, T. Fitzpatrick, L. Harber y E. Kass. *J. Am. Med. Assoc.* **228**, 1004 (1974).

- [90] M. Mathews - Roth, M. Patlock, T. Fitzpatrick, L. Harber y E. Kass. *Arch. Dermatol.*, **113**, 1229 (1977).
- [91] G. Stretcher. *Arch. Dermatol.* **114**, 1242 (1978).
- [92] H. Storck y J. Kaufmann. *Dermatologia* **157**, 323 (1978).
- [93] R. Peto, R. Doll, J. Buckley y M. Sporn. *Nature* **290**, 201 (1981).
- [94] H. Kläui, en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (ed: G. Britton, T. Goodwin, Pergamon Press, (1982), 309.
- [95] P. Rüedi. *Pure & Appl. Chem.* **57**, 793 (1985).
- [96] M. Vecchi y R. Muller. *J. High Resol. Chrom. Comm.* **2**, 195 (1979).
- [97] H. Ronnenberg, S. Liaaen - Jensen, M. Vecchi y R. Muller. *Helv. Chim. Acta* **63**, 711 (1980).
- [98] R. Muller, K. Bernhard y M. Vecchi. *Helv. Chim. Acta* **63**, 1654 (1980).
- [99] G. Englert, en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (ed: G. Britton, T. Goodwin, Pergamon Press, (1982), 107.
- [100] G. Englert. *Pure & Appl. Chem.* **57**, 801 (1985).
- [101] H. Kessler, G. Krack y G. Zimmermann. *J. Magn. Res.* **44**, 208 (1981).
- [102] J. Hoggle y R. Schirmer, "The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Applications", Academic Press, (1971).
- [103] R. Freeman y G. Morris. *Bull. Magn. Res.* **1**, 5 (1980).
- [104] A. Mandsley y R. Ernst. *Chem. Phys. Lett.* **50**, 368 (1977).

- [105] A. Bax, R. Freeman y S. Kempell. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4849 (1980).
- [106] D. Doddrell, D. Pegg y M. Bendall. *J. Magn. Res.* **48**, 323 (1982).
- [107] D. Turner. *J. Magn. Res.* **49**, 175 (1982).
- [108] U. Schwieter, G. Englert, N. Rigassi y W. Vetter. *Pure & Appl. Chem* **20**, 365 (1969).
- [109] C. Enzell. *Pure & Appl. Chem.* **20**, 497 (1969).
- [110] C. Enzell, R. Appleton y I. Wahlberg, en "Biochemical Applications of Mass Spectrometry", (ed: G. Waller), Wiley, N.Y., (1972), 375.
- [111] C. Enzell y I. Wahlberg, en "Biochemical Applications of Mass Spectrometry, First Supplementary Volume", (ed: G. Waller, O. Dermer) Wiley, N.Y., 407.
- [112] H. Budzikiewicz. en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (ed: G. Britton, T. Goodwin), Pergamon Press, (1982), 155.
- [113] G. Francis. *Acta Chem. Scand.* **26**, 1443 (1972).
- [114] B. Johanness, H. Brzezinka y H. Budzikiewicz. *Org. Mass Spectrom* **9**, 1095 (1982).
- [115] U. Schwieter, M. Bollinger, L. Chopard, G. Englert, M. Kofler, A. König, R. Rüegg, W. Vetter y O. Isler. *Chimia* **19**, 294 (1965).
- [116] M. Rose, en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (ed: G. Britton, T. Goodwin), Pergamon Press, (1982), 167.
- [117] G. Nybraaten y S. Liaaen - Jensen. *Acta Chem. Scand.* **25**, 370 (1971).

- [118] M. Aguilar - Martínez y S. Liaaen - Jensen. *Acta Chem. Scand.* **B28**, 1247 (1974).
- [119] J. Baldas, A. Porter, L. Cholnoky, J. Szabolcs y B. Weedon. *Chem. Commun.* 852 (1966).
- [120] J. Baldas, A. Porter, A. Leftwick, R. Holzel y B. Weedon. *Chem. Commun.* 415 (1969).
- [121] R. Bonnett, A. Mallams, A. Spark, J. Tee, B. Weedon y A. Mc. Cormick. *J. Chem. Soc. C* 429 (1969).
- [122] H. Budzikiewicz, H. Brzezinka y B. Johannes. *Monatsh. Chem.* **101**, 579 (1970).
- [123] A. Benson en "Structure and functions of Chloroplasts", (ed: M. Gibbs), Springer-Berlin (1971), 129.
- [124] J. Rullkötter, E. Heinz y A. Zulloch. *Z. Pflanzenphysiologie* **76**, 163 (1975).
- [125] G. Jamieson y E. Reid. *Phytochemistry* **8**, 1489 (1969).
- [126] G. Jamieson y E. Reid. *Phytochemistry* **10**, 1575 (1971).
- [127] G. Jamieson y E. Reid. *Phytochemistry* **10**, 1837 (1971).
- [128] G. Jamieson y E. Reid. *Phytochemistry* **11**, 269 (1972).
- [129] R. Safford y B. Nichols. *Biochim. Biophys. Acta* **210**, 57 (1970).
- [130] G. Jamieson y E. Reid. *Phytochemistry* **11**, 1423 (1972).
- [131] M. Noda y N. Fujiwara. *Biochim. Biophys. Acta* **137**, 199 (1967).
- [132] G. Auling, E. Heinz y A. Zulloch. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **352**, 905 (1971).
- [133] E. Heinz en "Lipids and lipid polymers in higher plants", (ed: M. Tevini, H. Lichtenthaler), Springer-Berlin, (1977), 102.

- [134] M. Bertrams y E. Heinz. *Planta* **132**, 161 (1976).
- [135] E. Nuffeld y C. Hall. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**, 503 (1964).
- [136] B. Bowden y P. Williams. *Phytochemistry* **12**, 1059 (1973).
- [137] S. Chang y N. Kulkarni. *Phytochemistry* **9**, 927 (1970).
- [138] A. Ongun y J. Mudd. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1558 (1968).
- [139] M. Siebert y E. Heinz. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **358**, 27 (1977).
- [140] M. Gurr y P. Brown. *Eur. J. Biochem.* **9**, 70 (1969).
- [141] P. Roughan. *Biochem. J.* **117**, 1 (1970).
- [142] R. Appleby, R. Safford y B. Nichols. *Biochim. Biophys. Acta* **248**, 205 (1971).
- [143] G. Rouser, G. Kutchevsky y G. Simon. *Lipids* **2**, 37 (1967).
- [144] K. Carroll. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **40**, 413 (1963).
- [145] B. Nichols y A. James. *Fette Seifen Anstrichim.* **66**, 1003 (1964).
- [146] B. Nichols y R. Moorehouse. *Lipids* **4**, 311 (1969).
- [147] D. Lynch, R. Gundersen y G. Thompson. *Plant Physiol.* **72**, 903 (1983).
- [148] Ch. Demandre, A. Tremolières, A. Justen y P. Mazliak. *Phytochemistry* **24**, 481 (1985).
- [149] T. Tweeten y D. Wetzal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 664 (1981).

- [150] B. Entressangles, H. Sari y P. Desnuelle. *Biochim. Biophys. Acta* **125**, 597 (1966).
- [151] W. Weiermann, W. Holman, R. Gordon y R. Jensen. *Lipids* **8**, 45, (1973).
- [152] J. Gellerman, W. Anderson, D. Richardson y H. Schlenck. *Biochim. Biophys. Acta* **388**, 277 (1975).
- [153] H. Budzikiewicz, J. Rullkötter y E. Heinz. *Z. Naturforsch.* **28c**, 499 (1973).
- [154] E. Heinz. *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 537 (1971).
- [155] S. Johns, D. Leslie, R. Willing y D. Bishop. *Aust. J. Chem.* **30**, 813 (1977).
- [156] S. Johns, D. Leslie, R. Willing y D. Bishop. *Aust. J. Chem.* **30**, 823 (1977).
- [157] S. Johns, D. Leslie, R. Willing y D. Bishop. *Aust. J. Chem.* **31**, 65 (1978).
- [158] J. Coddington, S. Johns, R. Willing, D. Leslie y D. Bishop. *Biochim. Biophys. Acta* **663**, 653 (1981).
- [159] J. Batchelor, R. Cushley y J. Prestegard. *J. Org. Chem.* **39**, 1698 (1974).
- [160] L. Harwood. *Aldrichimica Acta* **18**, 25 (1985).
- [161] J. Burrell, R. Garwood, L. Jackman, E. Oskay y B. Weedon. *J. Chem. Soc. (C)* 2144 (1966).
- [162] B. Knights. *J. Gas Chromatography* **5**, 273 (1967).
- [163] S. Wyllie y C. Djerassi. *J. Org. Chem.* **33**, 305 (1968).

- [164] Z. Zaretskii, en "Mass Spectrometry of Steroids", Jerusalem University Press, J. Wiley & Sons, (1976), cap. IV, 92.
- [165] C. Djerassi. *Pure & Appl. Chem.* **50**, 171 (1978).
- [166] I. Massey y C. Djerassi. *J. Org. Chem.* **44**, 2448 (1979).
- [167] S. Manley y D. Chapman. *FEBS Lett.* **93**, 97 (1978).
- [168] S. Manley y D. Chapman. *Phytochemistry* **19**, 1453 (1980).
- [169] K. Bernhard, G. Moss, G. Toth y B. Weedon. *Tetrahedron Lett.* 3899 (1974).
- [170] H. Cadosch, U. Vogeli, P. Ruedi y C. Eugster. *Helv. Chim. Acta* **61**, 783 (1978).
- [171] H. Cadosch, U. Vögeli, P. Rüedi y C. Eugster. *Helv. Chim. Acta* **61**, 1511 (1978).
- [172] M. Acemoglu, R. Prewo, J. Bieri y C. Eugster. *Helv. Chim. Acta* **67**, 175 (1984).
- [173] C. Eugster, en "Carotenoid Chemistry & Biochemistry", (Ed: G. Britton, T. Goodwin), Pergamon Press, (1982), 1.
- [174] E. Märki-Fischer, P. Bucheker y C. Eugster. *Helv. Chim. Acta* **65**, 2198 (1982).
- [175] M. Barber, R. Bordoli, R. Sedgwick y A. Tyler. *Nature*, **293**, 270 (1981).
- [176] P. Devienne y J. Roustan. *Org. Mass Spectrometry* **17**, 173 (1982).
- [177] C. Mc Neal. *Analytical Chemistry* **54**, 43A (1982).
- [178] V. Reinhold. *Spectra* **8**, 19 (1982).
- [179] D. Williams, C. Bradley, S. Santikarn y G. Bojesen. *Biochem. J.* **201**, 105 (1982).

- [180] K. Rinehart. *Science* **218**, 254 (1982).
- [181] J. Gower. *Biomed. Mass Spectrometry* **12**, 191 (1985).
- [182] E. Clayton y A. Wakefield. *Chem. Commun.* 969 (1984).
- [183] R. Freas, M. Ross y J. Campana. *J. Am. Chem. Soc.* **107** 6195 (1985).
- [184] D. Williams, A. Findels, S. Naylor y B. Gibson. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1980 (1987).
- [185] D. Williams, G. Bojessen, A. Auffert y L. Taylor. *FEBS Lett.* **128**, 37 (1981).
- [186] R. Clark y M. Blumer. *Limnol. Oceanogr.* **12**, 79 (1967).
- [187] W. Youngblood, M. Blumer, R. Guillard y F. Fiore. *Mar. Biol.* **8**, 190 (1971).
- [188] W. Youngblood y M. Blumer. *Mar. Biol.*, **21**, 163 (1973).
- [189] G. Mc Innes, J. Walter y J. Wright. *Lipids* **15**, 609 (1980).
- [190] T. Halsall e I. Hills. *Chem. Commun.*, 448 (1971).
- [191] L. de Napoli, E. Fattorusso, S. Magno y L. Mayol. *Phytochemistry* **21**, 782 (1982).
- [192] P. Sastry y M. Kates. *Biochemistry* **3**, 1280 (1964).
- [193] P. Helmsing. *Biochim. Biophys. Acta* **178**, 519 (1969).
- [194] T. Galliard. *Phytochemistry* **9**, 1725 (1970).
- [195] I. Iwata e Y. Sakurai. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **27**, 253 (1963).
- [196] N. de Souza y W. Nes. *Phytochemistry* **8**, 819 (1969).
- [197] J. Sims y J. Pettus. *Phytochemistry* **15**, 1076 (1976).
- [198] B. Wood, en "Botanical Monographs" (Ed: W. Stewart), Blackwell, Oxford, (1974), Vol.10, 235.

- [199] B. Nichols y R. Appleby. *Phytochemistry* **8**, 1907 (1969).
- [200] K. Tsuda, S. Akagi e Y. Kishida. *Science* **126**, 927 (1957).
- [201] K. Tsuda, S. Akagi e Y. Kishida. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **6**, 101 (1958).
- [202] K. Tsuda, S. Akagi, R. Hayatsu y K. Sakai. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **6**, 724 (1958).
- [203] K. Tsuda, K. Sakai, K. Tanabe e Y. Kishida. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **7**, 747 (1959).
- [204] K. Tsuda, K. Sakai, K. Tanabe e Y. Kishida. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1442 (1960).
- [205] A. Saito y R. Idler. *Can. J. Biochem.* **44**, 1195 (1966).
- [206] G. Gibbons, L. Goad y T. Goodwin. *Phytochemistry* **6**, 677 (1967).
- [207] A. Alcaide, M. Devys y M. Barbier. *Phytochemistry*, **1**, 329 (1968).
- [208] R. Idler y P. Wiseman. *Comp. Biochem. Physiol.*, **35**, 679 (1970).
- [209] A. Kanazawa, M. Yoshioka y S. Teshima. *Nem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* **21**, 103 (1972).
- [210] G. Patterson. *Lipids* **6**, 120 (1971).
- [211] T. Goodwin, en "Algal Physiology & Biochemistry", (Ed: W. Stewart), Blackwell, Oxford (1974), Vol. 10, 266.
- [212] J. Ferezou, M. Devys, J. Allais y M. Barbier. *Phytochemistry* **13**, 593 (1974).

- [213] L. Goad, en "Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology" (Ed: D. Mallins, J. Sargent), Academic Press, N.Y., (1976), Vol. 1, 213.
- [214] I. Chardon-Loriaux, M. Morisaki y N. Ikekawa. *Phytochemistry* **15**, 723 (1976).
- [215] B. Penna-Lisboa, J. Halket, F. Pinheiro-Joventino e I. Ganschow. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**, 257 (1982).
- [216] G. Combaut, L. Codomier, J. Teste y M. Pedersén. *Phytochemistry*, **20**, 1748 (1981).
- [217] C. Francisco, G. Combaut, J. Teste, C. Tarchini y C. Djerassi. *Steroids*, **34**, 163 (1979).
- [218] V. Amico, R. Chillemi, S. Sciutto, C. Tringalli, M. Comaci y G. Furnari. *Naturalista Scicil. S. IV*, **VI** (Suppl.), 95 (1982).
- [219] S. Kabore, G. Combaut, J. Vidal, L. Codomier, J. Passet, J. Girard y J. Rossi. *Phytochemistry*, **22**, 1239 (1982).
- [220] R. Kenkyusho, N. Morisaki, K. Tsuda y T. Yoshida. *Steroids* **12**, 41 (1968).
- [221] F. Schmitz, en "Marine Natural Products. Chemical and Biochemical Perspectives", (Ed: P. J. Scheuer), Academic Press, (1978), Vol I, Cap. 5, 241.
- [222] J. Boutry, A. Alcaide y M. Barbier. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D* **272**, 1022 (1971).
- [223] J. Mc Lachlan y J. Craigie. *J. Phycology*, **2**, 133 (1966).
- [224] D. Phillips. Tesis Ph. D., Univ. of British Columbia (1980).
- [225] K. Glombitza y H. Stoffelen. *Planta Medica* **22**, 391 (1972).

- [226] D. Phillips y G. Towers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **58**
285 (1982).
- [227] D. Phillips y G. Towers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **58**
295 (1982).
- [228] R. Willstätter y H. Page. *Ann.* **404**, 237 (1914).
- [229] K. Bernhard, G. Moss, G. Toth y B. Weedon. *Tetrahedron
Lett.* 115 (1976).
- [230] N. Withers, A. Fiksdahl, R. Tuttle y S. Liaaen-Jensen. *Comp.
Biochem. Physiol.*, **68B**, 345 (1981).
- [231] R. Berger, S. Liaaen-Jensen, V. Mc. Allister y R. Guillard.
Biochem. Syst. Ecol. **5**, 71 (1977).
- [232] H. Strain y W. Manning. *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 1235
(1942).
- [233] H. Strain, W. Manning y G. Hardin. *Biol. Bull.* **86**, 169
(1944).
- [234] S. Isoe, S. Hyeon, H. Ichikawa, S. Katsumura y T. Sakan. *Tetrahedron
Lett.*, 5561 (1968).
- [235] J. Hlubucek, J. Hora, S. Russell, T. Toubé y B. Weedon.
J. Chem. Soc. Perkin I, 848 (1974).
- [236] S. Isoe, S. Katsumura, S. Hyeon y T. Sakan. *Tetrahedron
Lett.*, 1089 (1971).
- [237] C. Foote, Y. Chang y R. Denny. *J. Am. Chem. Soc.*, **92**,
5218 (1970).
- [238] B. Czeczuga. *Biochem. Syst. Ecol.*, **11**, 329 (1983).
- [239] T. Bjornland, G. Borch y S. Liaaen-Jensen. *Phytochemistry*
23, 1711 (1984).