

## Composición química y biotoxicidad del alga roja *Kappaphycus alvarezii* Doty (Solieriaceae) Chemical composition and biotoxicity of red algae *Kappaphycus alvarezii* Doty (Solieriaceae)

D'Armas Haydelba<sup>1,2</sup>, Neyra Marylin<sup>2</sup>, Segnini Mary Isabel<sup>3</sup>, Brito Leonor<sup>3</sup>, Barrios Jorge<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Provincia de Guayas, Ecuador

<sup>2</sup>Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, estado Sucre, Venezuela

<sup>3</sup>Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, estado Sucre, Venezuela

Correspondencia: Haydelba T. D'Armas R.  E-mail: [hdarmasr@gmail.com](mailto:hdarmasr@gmail.com)

Artículo original | Original article

### Palabras clave

*Artemia salina*

Fitoquímica

*Kappaphycus alvarezii*

Metabolitos secundarios

Toxicidad

**RESUMEN** | Se realizó un estudio fitoquímico y de bioactividad a los extractos en cloroformo, acetato de etilo y metanol del alga *Kappaphycus alvarezii* Doty (recolectada en la Isla de Cubagua, Venezuela). Los valores de CL<sub>50</sub> en el bioensayo realizado con todos los extractos obtenidos, mostraron toxicidad ante larvas del crustáceo *Artemia salina* (CL<sub>50</sub> < 300 µg.ml<sup>-1</sup>). Mediante cromatografías en columna y capa fina preparativa, se fraccionaron continuamente los extractos en cloroformo y en acetato de etilo, analizándose algunas subfracciones obtenidas mediante CG-EM e identificándose algunos de sus constituyentes por sus patrones de fragmentación y comparación de sus espectros de masas con los existentes en la base de datos. Encontrándose que la fracción A2 proveniente del extracto en acetato de etilo presentó como componentes mayoritarios al ácido hexadecanoico, dibutilftalato y el compuesto esteroideal colestano; además de 2,6-diter-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona, 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, ácido 2-fenilacético y 1-(1-propoxi) propano. Mientras que la fracción FD del extracto en cloroformo exhibió a los ácidos grasos saturados palmítico, esteárico y mirístico, como componentes abundantes; y en menor proporción a la 3-etil-4-metil-1H-pirrol-2,5-diona. En la fracción EM7 proveniente del fraccionamiento del extracto metanólico, se logró identificar al ácido octadecanoico a través de RMN uni y bidimensional. En la fracción FG del extracto en cloroformo, se caracterizó al 1-fenilbutan-1-ol, mediante esta misma técnica espectroscópica. Los distintos metabolitos secundarios identificados constituyen el primer reporte para *K. alvarezii* y posiblemente sean los responsables de la bioactividad *in vitro* observada. Se puede inferir que esta alga roja es una fuente promisoría de compuestos bioactivos.

### Keywords

*Artemia salina*

Phytochemistry

*Kappaphycus alvarezii*

Secondary metabolites

Toxicity

**ABSTRACT** | A phytochemical and bioactivity study was carried out on the chloroform, ethyl acetate and methanol extracts of the *Kappaphycus alvarezii* Doty algae (collected on the Island of Cubagua, Venezuela). The LC<sub>50</sub> values obtained in the bioassay performed with all the extracts, showed toxicity to crustacean larvae *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> < 300 µg.ml<sup>-1</sup>). By means of column chromatography and preparative thin layer, the extracts were continuously fractionated with chloroform and ethyl acetate, some sub-fractions obtained by GC-MS were analyzed, and some of their constituents were identified by their fragmentation patterns and comparison of their mass spectra with the existing in the database. Finding that fraction A2 from the ethyl acetate extract showed hexadecanoic acid, dibutyl phthalate and the steroidal compound cholestane as major components; in addition to 2,6-diter-butylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, 2- phenylacetic acid and 1- (1-propoxy) propane as minor components. While the FD fraction of the chloroform extract exhibited saturated palmitic, stearic and myristic fatty acids as abundant components, and 3-ethyl-4-methyl-1H-pyrrole-2,5-dione in smaller proportion. Octadecanoic acid was identified in the EM7 fraction from the methanolic extract through uni and two-dimensional NMR. 1-phenylbutan-1-ol was characterized by the same spectroscopic technique in the FG fraction of the chloroform extract. The different secondary metabolites identified are the first report for *K. alvarezii* and are possibly responsible for the *in vitro* bioactivity observed. It can be inferred that this red algae is a promising source of bioactive compounds.

## INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos se han revelado como una fuente importante de sustancias bioactivas, de gran valor para el tratamiento de numerosas enfermedades por sus propiedades terapéuticas (antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antibióticas, entre otras). Dentro de ellos, se encuentran las algas de agua dulce y marinas, las cuales han desarrollado estrategias de defensa que dan lugar a un nivel significativo de diferentes estructuras químicas, de diversas rutas metabólicas (Puglisi *et al.*, 2004; Barros *et al.*, 2005). Encontrándose grupos de metabolitos como: diterpenos, eicosanoides, lectinas, esteroides y alcaloides (Lenis *et al.*, 2007). La biodiversidad de las especies de algas marinas, junto a la diversidad química encontrada en cada especie, constituye un recurso prácticamente ilimitado que puede ser utilizado de forma beneficiosa, para el desarrollo de biofármacos antitumorales, antivirales y antibióticos (Valdés *et al.*, 2003).

En relación con bioproductos provenientes de algas, las tendencias recientes en la investigación de las drogas procedentes de fuentes naturales, sugieren que las algas son un grupo prometedor para suministrar nuevas sustancias bioquímicamente activas (Mayer y Hamann, 2004; Mayer y Hamann, 2005; Singh *et al.*, 2003). Siendo numerosas las revisiones que señalan a las algas como uno de los principales productores de compuestos bioactivos (Faulkner, 2002), en algunos casos con estructuras moleculares no encontradas en otros organismos, con posibles usos antibacterianos, anticancerígenos, cardiotónicos, antivirales, antitumorales, antiinflamatorios y anticoagulantes, entre otros (Freile, 2001). Desde el punto de vista ambiental, el cultivo y explotación de algas marinas representan una actividad amigable al medio ambiente, ya que no genera desechos ni efluentes; aumenta, asimismo, la biodiversidad local al servir como sustrato y refugio a numerosas especies de peces e invertebrados y diversifica las actividades productivas tradicionales, reduciendo la pesca de ciertas especies amenazadas como las tortugas marinas, caracol de pala y langosta (Ondarza y Rincones, 2008).

Cabe destacar, que son muy pocas las publicaciones científicas realizadas en Venezuela, en las que se hayan caracterizado metabolitos provenientes de algas marinas de costas venezolanas y determinado su actividad biológica, pudiendo así establecerse el mecanismo de acción de esos compuestos activos identificados. Entre los que se encuentra el estudio de la actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del Oriente de Venezuela, concluyéndose que las tres especies de algas rojas *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* producen metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Brito y Crescente, 2009). Las especies de algas invasoras y comercialmente importantes, pertenecen a la familia Solieriaceae; *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Gigartinales, Rhodophyta), es una de las carragenofitas cultivadas que ha tenido mayor éxito en mares tropicales, constituyendo la principal fuente mundial de materia prima para la producción de carragenina kappa-I (Estévez *et al.*, 2000).

Todos los trabajos de investigación existentes de *K. alvarezii*, hacen referencia a aspectos taxonómicos, biológicos, de cultivo, respecto a sus propiedades antioxidantes (Suresh *et al.*, 2007; Kanatt *et al.*, 2015) y antiinflamatoria (Ranganayaki *et al.*, 2014), caracterización biológica y química (Pérez, 2013); así como estudios químicos enfocados a la identificación de los polisacáridos que presenta (Pereira *et al.*, 2007), principalmente en el aspecto económico de producción. Acerca de la identificación de algunos metabolitos secundarios, su caracterización, así como la determinación de la actividad biológica, solo se ha realizado una investigación, donde las muestras de *K. alvarezii* provenían del estado Nueva Esparta (Venezuela), donde se identificaron el 5- octadeceno, el 1- octadeceno y el eicosiltriclorosilano entre otros; determinándose además la actividad antibacteriana (Brito y Crescente, 2009). Además, en otro estudio realizado por Prabha *et al.* (2013) a esta alga marina recolectada en la región Mandabam (India), se caracterizaron algunos compuestos bioactivos en extractos de tres solventes distintos con sensibilidad antimicrobiana.

Una evaluación del potencial letal o tóxico, y la caracterización química de sus metabolitos secundarios, aporta información científica relevante y abre la posibilidad de concretar investigaciones en biotecnología marina, con aplicaciones en la industria farmacéutica y nutracéutica. Es de gran importancia el cultivo *in situ* (en el mar y en tanques) de esta especie, a fin de disponer de la materia prima necesaria, obtener un

desarrollo sostenible en la zona costera, y un producto atractivo para la industria que dé oportunidades económicas a los cultivadores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de la muestra

*Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (Gigartinales, Rhodophyta) fue recolectada en las aguas costeras de Cubagua, municipio Tubores, estado Nueva Esparta, Venezuela, a 10°50'23" Lat. N y 64°05'08" Lat. W, por el Prof. Jorge Barrios del Instituto Oceanográfico de Venezuela (I.O.V.), quién realizó también la identificación taxonómica. Fue almacenada en una cava con hielo y trasladada al Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, para su respectivo análisis. La cantidad de muestra algal total de los muestreos fue de 5 Kg, aproximadamente, en masa húmeda.

### Obtención de los extractos del alga

El material vegetal recolectado fue lavado varias veces con abundante agua destilada, se deshidrató a temperatura ambiente y a la sombra durante un período de 5 días. Luego, se procedió a pulverizarla en un molino eléctrico y se pesó la muestra en una balanza analítica. Los diferentes metabolitos secundarios o principios activos se extrajeron exhaustivamente con 500 mL de éter de petróleo, por espacio de 72 horas; posteriormente, se separó el filtrado y el residuo se maceró o volvió a re-extraer sucesivamente con 500 mL de cada uno de los solventes más polares (polaridad creciente de cloroformo, acetato de etilo y metanol), siguiendo el proceso de extracción anteriormente señalado. Cada uno de los filtrados se combinaron y fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador Hildolph a una temperatura menor de 45°C, obteniéndose los extractos crudos en los distintos solventes, se pesaron y almacenaron bajo refrigeración para análisis posteriores.

### Actividad tóxica contra *Artemia salina*

Se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto, en una mezcla H<sub>2</sub>O/DMSO según la solubilidad de éste y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000 - 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada, en viales que contenían 10 nauplios de *A. salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 y 48 horas de haber montado dicho ensayo. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado para tal fin, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 % (Stephan, 1977; Meyer *et al.*, 1982).

### Fraccionamiento del extracto más letal o tóxico

Para el aislamiento de los metabolitos secundarios, provenientes de los extractos del alga, se llevó a cabo el respectivo fraccionamiento, mediante las técnicas Comatográficas de Columna (con sílica gel 75 mesh a una proporción m/m sílica: muestra de 1:30 y mezclas de solventes de distintas polaridades, según fuese el caso) y Capa Fina Preparativa (en placas de vidrio de 20x20 cm<sup>2</sup> recubiertas con sílica gel 60 mesh, con un espesor de 0,5 mm, y mezclas de solventes en diferentes proporciones como fases móviles).

### Cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-EM)

Distintas fracciones de los extractos del alga *K. alvarezii*, fueron analizadas por esta técnica. Las cromatografías de gases acoplada a espectrometría de masas se realizaron en un equipo marca VARIAN modelo Saturno 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV) y un detector de trampa de iones. Se utilizó una columna de CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I y helio (He) como gas de arrastre. Se inyectó una muestra de 1 µL a la columna capilar. La temperatura del inyector fue de 280°C, la

temperatura inicial del horno fue de 100 °C con una rapidez de calentamiento de 5 °C por minuto, hasta llegar a una temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST.

### Espectroscopia de RMN

Los metabolitos aislados y/o fracciones obtenidas fueron analizados en un equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 400 MHz de la Universidad Simón Bolívar (USB), así como también en el equipo de RMN marca Bruker AVANCE de 300 MHz perteneciente al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la obtención de estos espectros, las muestras fueron disueltas en un solvente deuterado y colocadas en un tubo de resonancia, el cual se introdujo en el equipo de RMN. Para la obtención de un buen espectro se disolvieron entre 5-10 mg de muestra en un volumen de 0,65 mL, que equivalen a una altura en el tubo de resonancia de 5 cm. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) obtenidos en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se reportaron en ppm relativo a un estándar interno de tetrametilsilano (TMS). También, se empleó el experimento Distortionless Enhancement through Polarization Transfer (DEPT).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad tóxica de *K. alvarezii* frente al crustáceo *Artemia salina*

Las concentraciones letales media ( $\text{CL}_{50}$ ) de los extractos del alga *K. alvarezii* frente a *Artemia salina*, luego de 24 y 48 horas de exposición, se muestran en la Tabla 1. Al haber transcurrido las primeras 24 horas ya se observaba un efecto tóxico de los extractos del alga en las larvas. El resultado de mortalidad de las larvas significa la existencia de grupos de compuestos potencialmente activos. El  $\text{CL}_{50}$  obtenido para el extracto en acetato de etilo de ( $6,85 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), permite posicionarlo como un blanco para posteriores estudios farmacológicos con los cuales se puedan aprovechar las propiedades terapéuticas que se le adjudican a *K. alvarezii*. Un extracto o sustancia es considerada potencialmente útil como citotóxico, cuando su  $\text{CL}_{50}$  es  $\leq 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Meyer et al., 1982), aunque un  $\text{CL}_{50} < 1\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  se considera significativo o no despreciable. Cabe mencionar que el bioensayo basado en nauplios de *A. salina* presenta una correlación positiva con la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388) (leucemia *in vivo*) (McLaughlin et al., 1998). También se ha empleado este ensayo con éxito en la búsqueda de compuestos citotóxicos del tipo de las acetogeninas (Amaro et al., 2009).

Por otro lado, el extracto en cloroformo presentó el mayor  $\text{CL}_{50}$  a las 48 horas ( $461,82 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); está concentración letal media es baja en comparación con la que exhibió el de acetato de etilo. Considerando el efecto tóxico de todos los extractos ante el crustáceo y analizando los valores de  $\text{CL}_{50}$  obtenidos, se puede inferir que todos son significativos y posiblemente letales o tóxicos, debido a que están en el rango de 100-1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Tabla 1** Actividad biotóxica de los extractos crudos de *K. alvarezii* contra *A. salina*.

Crustáceo	Extracto	$\text{CL}_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$		Intervalo de confianza 95%
		24 horas	48 horas	
<i>Artemia salina</i>	EC	945,23	461,82	100-1000
	EAE	784,15	6,85	0,10-1000
	EM	816,30	152,88	96,6-253,73

EC: Extracto en cloroformo, EAE: Extracto en acetato de etilo, EM: Extracto en metanol.

De acuerdo a los resultados obtenidos del efecto de toxicidad de los extractos de *K. alvarezii* frente a éste crustáceo, se pudo comprobar que es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los extractos en las larvas de *A. salina* y así predecir un efecto potencial primario de los compuestos químicos, presentes en los extractos. Pudiendo dar inicio a estudios posteriores en líneas celulares cancerígenas en cultivos de tejidos, efecto insecticida o pesticida y ejercer un amplio rango de actividades farmacológicas (Parra et al., 2001; Pino, y Lazo, 2010).

## Caracterización estructural

La fracción D, reveló una concentración letal media, considerablemente alta, en el bioensayo de toxicidad realizado, con un  $CL_{50}$  de 24,91  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , después de 24 horas de exponer las larvas de *A. salina* ante esta fracción ( $CL_{50}$  de 4,38  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a las 48 horas). Debido a su actividad tóxica y a que la CCF mostró dos manchas con  $R_f$  definidos, esta fracción fue seleccionada para ser analizada por CG-EM.

El cromatograma de la fracción D evidenció que se trataba mayormente de una mezcla de seis compuestos, entre los cuales se logró identificar los que estaban presentes en mayor abundancia, siendo éstos: 3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona (I) y los ácidos tetradecanoico (II), hexadecanoico (III) y octadecanoico (IV), a los tiempos de retención que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2** Compuestos identificados en la fracción D mediante CG-EM.

Pico	Tr(min)	M	Compuesto	Grupo Químico	Fórmula molecular
I	7,60	139	3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona	Cetona	$\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_2$
II	12,99	228	Ácido tetradecanoico	Ácido graso	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$
III	15,12	256	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$
IV	16,39	284	Ácido octadecanoico	Ácido graso	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$

El espectro de masas del metabolito, 3-etil-4-metil-1H-pirrole-2,5-diona, de la fracción D (Tr =7,60 minutos), desplegó un ión molecular a  $m/z$  139  $[\text{M}^+]$ , y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  124 y 53. El espectro de masas del ácido tetradecanoico, de la fracción D (Tr= 12,986), exhibió un ión molecular a  $m/z$  228  $[\text{M}^+]$ , y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a  $m/z$  185, 129, y 73 (pico base).

El tercer pico observado en el cromatograma, que aparece en mayor abundancia respecto a todos los compuestos identificados en la fracción D, a un tiempo de retención de 15,12 minutos, corresponde al ácido hexadecanoico (III). El espectro de masas de este compuesto mostró un ión molecular a  $m/z$  256  $[\text{M}^+]$ , el cual corresponde a la fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$  y los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a  $m/z$  227  $[\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5]$ , 213  $[\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7]$ , 199  $[\text{M}^+-\text{C}_4\text{H}_9]$ , 185  $[\text{M}^+-\text{C}_5\text{H}_{11}]$ , 71  $[\text{M}^+-\text{C}_6\text{H}_{13}]$ , 157  $[\text{M}^+-\text{C}_7\text{H}_{15}]$ , 143  $[\text{M}^+-\text{C}_8\text{H}_{17}]$ , 129  $[\text{M}^+-\text{C}_9\text{H}_{19}]$ , 115  $[\text{M}^+-\text{C}_{10}\text{H}_{21}]$ , 97  $[\text{M}^+-\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}]$ , 83  $[\text{M}^+-\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{O}]$ , 73  $[\text{M}^+-\text{C}_{13}\text{H}_{27}]$  (pico base), 57  $[\text{M}^+-\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_2]$  y 43  $[\text{M}^+-\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_2]$ .

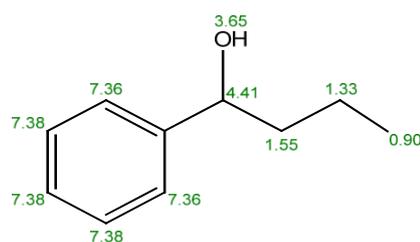
Un estudio realizado a tres algas rojas, de diferentes órdenes, determinó que las especies de distintos órdenes presentaban patrones similares de ácidos grasos, con cuatro ácidos dominantes: palmítico, oleico, araquidónico y eicosapentanoico (Lenis *et al.*, 2007). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este estudio, debido a que entre los ácidos grasos identificados en *K. alvarezii*, perteneciente al orden Gigartinales, se identificaron por medio de CG-EM, la presencia de los ácidos palmítico, mirístico y esteárico, resultando los dos primeros los más abundantes. En contraste a la presencia de estos ácidos, recientemente, una investigación realizada por Pérez (2013) en *K. alvarezii* recolectada en Panamá reporta la extracción de ficocoloides como ácido algínico, agar y carragenano para fines comerciales.

La subfracción G2 (sólido blanco) fue analizada resonancia magnética nuclear de protón, a campo alto se observan cinco señales, la primera a  $\delta_H$  0,86 ppm, la cual integra para tres protones, visualizándose como un triplete, correspondiente a un metilo terminal, que probablemente se encuentra enlazado a un metileno, el segundo desplazamiento químico se encuentra en  $\delta_H$  1,24 ppm, la cual integra para dos protones, asignables a un metileno; la tercera señal aparece a  $\delta_H$  1,53 ppm, integrando para dos protones asignables a un metileno unido a un C-H (metínico), como cuarta señal se observó a  $\delta_H$  3,84 ppm un singlete correspondiente a un protón unido a un carbono oxigenado, a  $\delta_H$  4,42 ppm está presente la señal de un protón anomérico, correspondiente al carbono unido al grupo hidroxilo. La señal de los protones aromáticos se considera que esta superpuesta con la señal del solvente (cloroformo deuterado) a campo bajo de ( $\delta_H$  7,15- $\delta_H$  7,30) ppm. En la Tabla 3 se detallan cada una de las señales del espectro de RMN- $^1\text{H}$ .

**Tabla 3** Desplazamientos químicos ( $\delta_H$ ) de la subfracción G2 y sus respectivas señales

Asignación	Multiplicidad	$\delta_H$ (ppm)	Asignación
H <sub>11</sub>	Triplete (t)	0,86	-CH <sub>3</sub>
H <sub>10</sub>	Multiplete (m)	1,24	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -
H <sub>9</sub>	Cuarteto (q)	1,53	CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
H <sub>8</sub>	Singulete (s)	3,84	-OH
H <sub>7</sub>	Triplete (t)	4,42	CH-OH
H <sub>1</sub> -H <sub>6</sub>	Singulete (s)	7,15 - 7,30	Ar-H

En la (Fig. 1) se muestran los diferentes desplazamientos químicos  $\delta_H$  teóricos para una estructura similar, según el programa predictor del ChemBioDraw, los cuales fueron comparados con los datos experimentales del RMN-<sup>1</sup>H de la subfracción G<sub>2</sub>. Resultando varias señales con  $\delta_H$  muy parecidas, reiterando la estructura propuesta para dicha subfracción.

**Figura 1** Posible estructura propuesta para G<sub>2</sub>, indicando  $\delta_H$  teóricos

El cromatograma de gases de la fracción A<sub>2</sub> presentó cuatro constituyentes en mayor proporción: el dibutilftalato (VI), el ácido hexadecanoico (V), el 1-(1-propoxietoxi)propano (II) y el colestano (VII), los cuales fueron observados a tiempos de retención de 19,10; 14,90; 9,34 y 22,92 min, respectivamente (Tabla 4). El espectro de masas del compuesto I mostró un ión molecular a m/z 136 [M<sup>+</sup>], el cual corresponde a la fórmula molecular C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>. Los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a m/z 91(pico base), 65 y 39.

**Tabla 4** Compuestos identificados en la fracción A<sub>2</sub> mediante CG-EM.

Pico	Tr(min)	M+	Compuesto	Grupo Químico	Fórmula
I	7,74	136	Ácido 2-fenilacético	Ácido carboxílico	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
II	9,34	146	1-(1-propoxietoxi)propano	Alcano	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
III	10,19	220	dieno-1,4-diona	Cetona aromática	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
IV	13,75	268	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	Cetona alifática	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O
V	14,90	256	Ácido hexadecanoico	Ácido graso	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
VI	19,10	278	Dibutilftalato	Éster aromático	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>
VII	22,92	372	Colestano	Esterol	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub>

El compuesto identificado con el número dos (II) fue uno de los que se encontraba en mayor proporción en la fracción A<sub>2</sub> y por consiguiente uno de los más abundantes en la mezcla, y tuvo relación con el 1-(1-propoxietoxi) propano, el cual se detectó con un tiempo de retención de 9,34 min y no evidenció el ión molecular correspondiente a m/z 146[M<sup>+</sup>], en el respectivo espectro de masas. A un tiempo de retención de 13,76 minutos, apareció la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, encontrada en mayor proporción en la fracción A<sub>2</sub>. El espectro de masas de este compuesto, desplegó un ión molecular a m/z 250 [M<sup>+</sup>], y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 210, 165 y 43 (pico base).

Este metabolito, también conocido como hexahidrofarnesil acetona, ha sido reportado en diversas especies de plantas tales como: la fracción hexánica de las hojas de *Ludwigia octovalvis*, la cual presenta

actividad tóxica contra *Artemia salina*, antibacteriana contra *S. aureus* y citotóxica en huevos de erizo de mar *Lytechinus variegatus* (Noguera, 2007). También ha sido informado en la literatura, que existen otros compuestos producidos por las algas marinas como los ácidos grasos, que presentan actividad antiinflamatoria y efectos en el sistema inmune (Ondarza y Rincones, 2008). Específicamente, el ácido hexadecanoico (C16) junto a otra variedad de ácidos grasos, ha sido reportado en una variedad de especies de algas y celenterados (Ordaz *et al*, 2009).

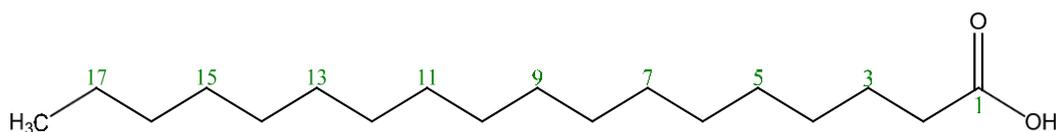
A un tiempo de retención de 22,93 minutos, apareció el esteroil colestanol, uno de los compuestos mayoritarios de la fracción A<sub>2</sub>. Pudiendo observarse el pico característico del ión molecular en el correspondiente espectro de masas. Los otros fragmentos significativos se observaron a m/z 357 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 315 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 217 [M-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>]<sup>+</sup>, 149 [M-C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>]<sup>+</sup>, 109 [M-C<sub>19</sub>H<sub>35</sub>]<sup>+</sup> y 43 [M-C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>]<sup>+</sup>, los mismos indicaron la presencia de un sistema esteroidal, grupo químico detectado en el análisis químico preliminar del EAE (prueba positiva para esteroides).

La fracción EM<sub>7</sub>, analizada a través de resonancia magnética de protón (RMN- <sup>1</sup>H), del extracto metanólico, mostró la presencia a campo alto de un triplete con un desplazamiento químico de δ<sub>H</sub> 0,89 ppm, correspondiente a un (-CH<sub>3</sub>) terminal, unido a un metileno (H<sub>17</sub>) que integra para tres hidrógenos. A campo menos alto, apareció un multiplete (H<sub>3</sub>), asignado a protones de metilenos más desapantallados con un desplazamiento de δ<sub>H</sub> 1,59 ppm. Además, en la misma zona alifática, se evidenció a δ<sub>H</sub> 1,23-1,31 ppm, un multiplete (H<sub>9</sub>-H<sub>4</sub>) bastante intenso; en el mismo rango de estos metilenos, se considera que se encuentra superpuesta la señal del H<sub>12</sub>, que sale a 1,29 ppm, debido a que se encuentra menos apantallado por la cercanía al oxígeno (Tabla 5).

**Tabla 5** Desplazamientos químicos (δ<sub>H</sub>) de la subfracción EM<sub>7</sub> y sus respectivas señales.

Posición	Multiplicidad	δ <sub>H</sub> (ppm)	Asignación
H <sub>18</sub>	Triplete (t)	0,86	-CH <sub>3</sub>
H <sub>4</sub> -H <sub>17</sub>	Multiplete (m)	1,23	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -
H <sub>3</sub>	Multiplete (m)	1,59	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COO-
H <sub>2</sub>	Triplete (t)	2,33	CH <sub>2</sub> -COO-

Mediante el experimento DEPT- 135°, se pudieron establecer los diferentes tipos de carbonos presentes en la estructura, resultando la existencia de un carbono metílico (C<sub>18</sub>) y un átomo de carbono cuaternario correspondiente al del grupo carboxilo (C<sub>1</sub>). Según el análisis combinado de los espectros RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y DEPT 135°, concretamente, debido a los desplazamientos químicos y las multiplicidades en el caso de RMN <sup>1</sup>H, se pudo determinar que el compuesto que conforma la fracción EM<sub>7</sub>, es el ácido octadecanoico (Figura 2), el cual ya fue identificado por CG-EM en la fracción D, perteneciente al extracto soluble en cloroformo, junto con otros metabolitos; sin embargo, se logró aislar en el extracto metanólico y caracterizar estructuralmente. Este hecho evidencia nuevamente la abundancia de los ácidos grasos en las algas rojas. La presencia del ácido hexadecanoico, octadecanoico, entre otros, ha sido reportada en muestras de algas y otras especies marinas, a los cuales se les atribuye actividad biológica, y que su biosíntesis en el organismo, pudiera no estar dirigida hacia funciones de defensa (Ordaz *et al*, 2009; Pastrana *et al*, 2016).



**Figura 2** Estructura del compuesto (ácido octadecanoico) de la fracción EM<sub>7</sub>.

## CONCLUSIONES

Los extractos de metanol, acetato de etilo y cloroformo de *K. alvarezii* y algunas de sus fracciones cromatograficas mostraron actividad biológica significativa; en tal sentido se podría decir que los distintos metabolitos identificados posiblemente sean los responsables de la bioactividad *in vitro* observada en los nauplios de *A. salina*. Además, constituyen una fuente promisoría de compuestos bioactivos con posible actividad antitumoral.

Todos los componentes químicos identificados en los extractos del alga, constituyen el primer reporte de los mismos para *K. alvarezii*, tanto en Venezuela como en otras latitudes.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad Simón Bolívar e Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por el apoyo científico en la realización de los análisis biológicos y químicos; así como al Departamento de Química de la Universidad de Oriente por el apoyo en infraestructura, materiales y reactivos necesarios para la investigación.

## REFERENCIAS

- Amaro M., Monasterios M., Avendaño M., Charris J. (2009). Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *Journal of Applied Toxicology*, 29(1):36-41.
- Barros M., Pinto E., Sigaud-Kutner T., Cardozo K., Colepicolo, P. (2005). Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. *Biological Rhythm Research*, 36:67-82.
- Brito L., Crescente, O. (2009). Actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del oriente de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 48(1):29- 33.
- Estévez J., Ciancia M., Cerezo A. (2000). The system of low molecular weight carrageenan and agaroids from the room temperature extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydrate Research*, 325: 287-299.
- Faulkner D. (2002). Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Natural Products Reports*, 19:1-48.
- Freile Y. (2001). Algas en la "Botica". *Avance y Perspectiva*, 20:283-293.
- Kanatt S., Lahare P., Chawla S., Sharma A. (2015). *Kappaphycus alvarezii*: its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(1):1-6.
- Lenis L., Benítez R., Peña, E., Trujillo D. (2007). Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia Et Technica*, 13:97-102.
- Mayer A., Hamann M. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Journal of Marine Biotechnology*, 6:37-52.
- Mayer A., Hamann M. (2005). Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and

- nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 140:265-286.
- Meyer B., Ferrigni N., Putnam J., Jacobsen L., Nichols D., McLaughlin J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45(1):31-34.
- McLaughlin J., Lingling L., Anderson J. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32:513-524.
- Noguera T. (2007). Aislamiento, elucidación estructural y posible bioactividad de algunos de los metabolitos secundarios de la planta *Ludwigia octovalvis* (Onagraceae), Trabajo de pregrado, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela (junio 2007).
- Ondarza M., Rincones R. (2008). El cultivo de algas marinas: alternativa industrial en acuicultura sustentable a mediano y largo plazo. *CienciaUAT*, 3(2): 68-73.
- Ordaz G., D'Armas H., Hernández J., Camacho A. (2009). Identificación mediante CG/EM de algunos constituyentes con actividad biológica del extracto apolar del celenterado *Eunicea* sp. *CIENCIA*, 17(3): 245-254.
- Parra, L., Silva, Y., Iglesias, B., y Guerra, S. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5):395-400.
- Pastrana O., Santafé G., Torres O. (2016). Perfil de Ácidos Grasos y Evaluación de las Actividades Antioxidante y Antifúngica del Holotureo *Isostichopus badionotus*. *Información Tecnológica*, 27(3):3-10.
- Pereira L., Amado A., Critchley A., Velde F., Ribeiro P. (2009). Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR- ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*, 23:1903-1909.
- Pérez C. (2013). Caracterización biológica y química de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá, Tesis Doctoral, Departamento de Biología, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España (febrero 2013).
- Pino O., Lazo J. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1):35-36.
- Prabha V., Prakash D., Sudha P. (2013). Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (1):306-310.
- Puglisi M., Tan L., Jensen P., Fenical W. (2004). Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thallasiae*. *Tetrahedron*, 60:7035-7039.
- Ranganayaki P., Susmitha S., Vijayaraghavan R. (2014). Study on metabolic compounds of *Kappaphycus alvarezii* and its *in-vitro* analysis of anti-inflammatory activity. *International journal of current research and academic review*, 2 (10):157-166.
- Singh S., Kate B., Banerjee U. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25:73-95.

Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an  $LC_{50}$ . In: Mayer FL, Hamelink J. (eds). Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: ASTM STP 634. American Society for Testing and Material, Philadelphia.

Suresh K., Ganesan K., Subba, R. (2007). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – an edible seaweed. *Food Chemistry*, 107:289-295.

Valdés O., Díaz N., Cabranes Y., Acevedo M., Areces A., Graña L., Díaz C. (2003). Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia*, 16:36-45.

Recibido: 10-11-2019

Aprobado: 02-03-2020

Versión final: 10-03-2020

