

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**SECCION DE POST-GRADO Y SEGUNDA  
ESPECIALIZACION PROFESIONAL**



**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS  
MENCION QUIMICA**

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO QUIMICO DE TRES ESPECIES DE  
ALGAS MARINAS PERUANAS**

**PRESENTADA POR**

**OTILIA ACHA DE LA CRUZ**

**LIMA - PERU**

**1995**

## ABREVIATURAS

$\lambda$ max	=	longitud de onda de máxima <b>absorbancia</b>
$\nu$ max	=	frecuencia de máxima <b>absorbancia</b>
$^{13}\text{C}$ -RMN	=	Resonancia Magnética Nuclear de carbono - 13
$^1\text{H}$ -RMN	=	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
ac	=	ácido.
$\text{Ac}_2\text{O}$	=	<b>anhidrido</b> acético.
AcOEt	=	acetato de etilo
BAW	=	<b>Butanol:ácido</b> acético:agua
CC	=	<b>Cromatografía</b> de columna
CCD	=	<b>Cromatografía</b> de capa delgada
CM	=	centímetro.
EM	=	Espectro de masas
EP	=	<b>Eter</b> de Petróleo
$\text{Et}_2\text{O}$	=	<b>Eter</b> etílico.
EtOH	=	Etanol
Fig.	=	figura
g	=	gramos
gt	=	gotas
IR	=	Infrarrojo
Me	=	metilo.
$\text{Me}_2\text{CO}$	=	acetona.
MeOD	=	<b>Metanol</b> Deuterado
MeOH	=	<b>Metanol</b>
mg	=	miligramos
Ms	=	Muestra
NaOMe	=	<b>Metóxido</b> de sodio
nm	=	<b>nanómetro</b>
Pag.	=	Página
Pf.	=	Punto de fusión
ppm	=	partes por millón de desplazamiento químico (6) relativo al <b>tetrametilsilano</b> , en el RMN
R	=	reactivo
$R_f$	=	Desplazamiento relativo
Sol.	=	Solución
UV-Vis.	=	Ultravioleta - visible
$^{\circ}\text{C}$	=	grado <b>centigrado</b>
sat	=	saturado
Tol.	=	Tolueno
CCDP	=	<b>Cromatografía</b> de capa delgada preparativa.
lts	=	litros
$^{\circ}\text{F}$	=	grados <b>Fahrenheit</b>
DMSO- $d_6$	=	<b>Dimetilsulfoxido</b> hexadeuterado
cps	=	<b>centipoises</b>
nm	=	<b>nanómetro</b>
Basif.	=	<b>Basificación</b>
Extrac.	=	<b>Extracción.</b>

## **EQUIPOS USADOS EN EL ANALISIS INSTRUMENTAL**

- **Espectrómetro de RMN Bruker WP-80 FT** para medir espectros de  $^1\text{H-RMN}$ .
- **Espectrómetro Infrarrojo Perkin Elmer 577** con mezclador **Perkin Elmer Vibrating Mill** para medir espectros de IR.
- **Espectrofotómetro UV-vis Perkin Elmer 552** con **graficador Perkin Elmer 561 Recorder** para medir espectros UV.
- **Fisher-Johns Melting Point Apparatus Bock-Monoscop M.** para medir punto de fusión.

Los Espectros de los compuestos M4 y M6 fueron tomados en España, Universidad de Salamanca, Facultad de Farmacia.

# CONTENIDO

Pág.

## INTRODUCCIÓN

<b>I. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS DE ALGAS MARINAS A NIVEL MUNDIAL.</b>	
1.1 Clasificación de las algas marinas.	
1.2 Compuestos orgánicos e inorgánicos en algas marinas pardas ( <b>Macrocystis p.</b> ) y rojas ( <b>Gigartina ch.</b> y <b>Peterosiphonia d.</b> )	2
1.2.1. Compuestos inorgánicos	2
1.2.2. Compuestos orgánicos	2
A. Estudio de <b>ficocoloides</b> en algas marinas pardas y rojas.	3
B. Estudios de principios activos en algas pardas y rojas.	13
<b>II. DESCRIPCION DE LAS ALGAS MARINAS.</b>	17
2.1 Identificación Botánica.	17
2.2 Distribución geográfica.	17
2.3 Descripción botánica de las algas marinas.	18
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.</b>	20
3.1 Algas marinas Peruanas estudiadas.	20
3.2 Especie <b>Macrocystis pyrifera</b> (alga marina parda).	20
3.2.1 Colección del material, muestreo preparación y almacenamiento del alga.	20
3.2.2 Estudios químicos en <b>Macrocystis p.</b> Constituyentes inorgánicos y orgánicos.	20
A. Métodos de análisis de compuestos inorgánicos en <b>Macrocystis pyrifera.</b>	20
B. Métodos de análisis de compuestos orgánicos en la <b>Macrocystis p.</b>	23
3.2.3 Estudio de <b>ficocoloides</b> en <b>Macrocystis pyrifera.</b>	39
A. Procedimiento de extracción del ácido <b>algínico</b> , método de <b>Haug.</b>	39
B. Análisis del ácido <b>algínico.</b>	41
C. Determinación de la pureza del ácido <b>algínico.</b>	41
D. Proceso de degradación del ácido <b>algínico</b> (compuesto M4).	42

E.	Obtención del <b>alginato</b> de sodio a partir del ácido <b>algínico</b> .	46
F.	Ensayos físicos y químicos del <b>alginato</b> de sodio.	46
G.	Determinación de la pureza de <b>alginato</b> de sodio.	47
3.2.4.	Estudio de compuestos orgánicos en <b>Macrocystis pyriferá</b> .	48
A.	Estudio cuantitativo de hidrocarburos.	48
B.	Identificación sistemática de compuestos orgánicos en <b>Macrocystis pyriferá</b> .	50
C.	Extracción separación, purificación e identificación de compuestos orgánicos.	53
3.3	Especie <b>Gigartina Chamissoi</b> (alga marina Roja).	60
3.3.1	Colección del material.	60
3.3.2	Estudios de compuestos orgánicos Identificación sistemática.	60
A.	Estudio de <b>Ficocoloides: El Carrageno</b> .	60
B.	Marcha <b>Fitoquímica</b> preliminar	64
C.	Extracción, separación, purificación e identificación de compuestos orgánicos de <b>Gigartina chamissoi</b> .	66
3.4	Especie <b>Peterosiphonia d.</b> (alga marina roja).	76
3.4.1	Colección del material.	76
3.4.2	Estudio de compuestos orgánicos Identificación sistemática.	76
A.	Estudio de <b>Ficocoloides: agar-agar</b> .	76
B.	Marcha <b>Fitoquímica</b> preliminar.	84
C.	Extracción, separación, purificación y caracterización de compuestos orgánicos de <b>Peterosiphonia d.</b>	86
IV.	RESULTADOS Y <b>DISCUSION</b>	95
V.	ESPECTROS	139
VI.	CONCLUSIONES	163
VII.	RECOMENDACIONES	168
VIII.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	171
IX.	ANEXOS	176

## RESUMEN

En el presente trabajo de Investigación, se hicieron estudios químicos en tres especies de algas marinas peruanas.

En la especie **Macrocystis piryfera** se hicieron estudios de compuestos orgánicos e inorgánicos.

Respecto a los compuestos inorgánicos, se determinó un gran contenido de minerales, (esta especie es un suplemento ideal para fertilizantes en la agricultura).

Respecto a los compuestos orgánicos se hizo un estudio con variación estacional del contenido del ácido **algínico**, **manitol** y **laminarina**; así mismo se efectuó la extracción, purificación y caracterización (mediante propiedades físicas) del ácido **algínico**; adicionalmente se realizó estudio de principios activos, determinándose la presencia de esteroides y/o **triterpenoides**, **flavonoides** e **Hidrocarburos**, de los cuales se aisló el **flavonoide**, lográndose identificar como un **dihidroflavonoide**.

Los otros principios activos no se lograron identificar por la excesiva interferencia del ácido **algínico** (componente principal), el cual se **polimeriza** tornándose insoluble en casi todos los solventes.

En la especie **Gigartina chamissoi** se ha logrado realizar estudios químicos correspondientes a la **optimización** de un proceso de extracción de la fracción mayoritaria de la variedad de **Kappa-carrageno**, el cual fue identificado de acuerdo a sus propiedades físicas.

También se realizaron estudios de compuestos químicos (principios activos) en el extracto con éter de petróleo (40-65°C).

Se aislaron por CC, CCD por extracciones sucesivas con solventes de diferentes polaridad, tres compuestos los cuales fueron identificados como: un hidrocarburo superior, un esteroide, un **triterpenoide (Lupeol)**, por correlación de sus propiedades **espectroscópicas**. En esta especie, no se detecto presencia de alcaloides.

En la especie **Peterosiphonia dendroidea**, se ha logrado realizar un estudio de extracción del **agar-agar**, así como el estudio de sus propiedades físicas.

Se realizaron estudios de compuestos químicos en los extractos de éter de petróleo (40-65°C), cloroformo y **metanol** al 70%. Se aislaron por CC, CCD, mediante extracciones sucesivas con solventes de diferente polaridad, dos compuestos, de los cuales uno fue identificado como una sustancia **monoterpénica**, llamado "alcanfor", y el otro compuesto como un "colorante", cuya estructura es una **ortoquinona**, estas estructuras fueron determinadas por correlación de sus propiedades **espectroscópicas**. No se detecto presencia de alcaloides

# INTRODUCCION

El mar constituye el **area** más grande de producción de materia orgánica, por lo que se espera llegar en un futuro próximo tener el suficiente conocimiento científico y tecnológico y practicar la **maricultura**, convirtiéndola en una nueva fuente de la industria alimentaria y farmacéutica, capaz de satisfacer el explosivo desarrollo demográfico de la humanidad.

El presente trabajo de investigación es una contribución proyectada a hacer un estudio específico de los compuestos orgánicos e inorgánicos en algunas especies de algas marinas peruanas.

Para efectuar este estudio se han escogido tres especies de algas marinas peruanas, estas especies son: **MACROCYSTIS PYRIFERA** (alga parda), recolectada en **Pucusana** - Perú, especie **GIGARTINA CHAMISSOI** (alga roja), recolectada en las costas de Ancón-Perú (muy conocida por el poblador costeño, quien lo utiliza en la alimentación acompañando al tradicional "cebiche"). Y especie **PETEROSIPHONIA DENDROIDEA** (alga marina roja), recolectada en las costas de **Pucusana** - Perú.

Las algas pardas (especie **Macrocystis pyrifera** de tamaño más grande que existe, proporciona más del 50% de ácido **algínico** que se consume en el mundo), poseen usos variados que aumentan día a día con el desarrollo tecnológico y la demanda alimenticia (1). Nos parece acertado mirar a los recursos naturales como una de las reservas alimenticias del futuro, lo que justifica su importancia económica, el interés en su explotación racional y la importancia que reviste esta investigación en particular.

Respecto a la especie **Gigartina chamissoi** (alga roja muy abundante durante todo el año en el litoral Peruano), se han hecho estudios de principios activos en Chile, habiéndose encontrado algunos tipos de **esteroles** (2). Con referencia al estudio de coloides, poco se ha estudiado, por este motivo, se ha efectuado el estudio del **carrageno**, como compuesto de importancia económica, complementándose con el estudio de los principios activos.

La especie **Peterosiphonia dendroidea**, (alga roja) es oriunda del Perú. En nuestro País, se ha hecho un estudio desde el punto de vista biológico (actividad antibiótica) (3). Debido a esta referencia, se hizo un estudio de principios activos, complementándose con el estudio del **agar-agar** como compuesto de interés económico.

# I. ANTECEDENTES DE ESTUDIOS DE ALGAS MARINAS A NIVEL MUNDIAL

## 1.1 CLASIFICACION DE LAS ALGAS MARINAS (1), (4)

A nivel mundial hay cientos de variedades de algas marinas, cuya clasificación, aún está incompleta. Por el momento, la clasificación es la siguiente:

- a) esquisofíceas, cianofíceas ó algas azules
- b) flageladas
- c) silíceas, diatomeas ó baciliarofítas.
- d) amarillas ó crisofítas
- e) verdes ó chlorofítas
- f) pardas ó phaeofítas
- g) rojas ó rhodofítas

## 1.2. COMPUESTOS ORGANICOS E INORGANICOS EN ALGAS MARINAS PARDAS ( MACROCYSTIS PYRIFERA ) Y ROJAS (GIGARTINA CHAMISSOI Y PETEROSIPHONIA DENDROIDEA).

### 1.2.1 COMPUESTOS INORGANICOS (5)

En la bibliografía consultada existe una gran información de estudios de compuestos inorgánicos en la especie *Macrocystis pyrifera* (alga parda). Los estudios hechos en esta especie han sido con la finalidad de dar utilidad a este tipo de algas, en forma de alimento animal, abonos y los múltiples usos que tiene dentro de la industria.

Una forma de conocer si es conveniente su explotación y en qué época, es recurriendo a estudios de análisis químico de compuestos inorgánicos de la especie por un período prolongado que abarque todas las estaciones climáticas del año.

Con respecto a las algas rojas: *Gigartina chamissoi* y *Peterosiphonia dendroidea* no se ha encontrado información sobre el estudio de compuestos inorgánicos.

### 1.2.2 COMPUESTOS ORGANICOS (5)

Los compuestos orgánicos, están relacionados con la composición química de las algas, las cuales comparadas con las plantas terrestres, poseen una composición más sencilla, debido a que los componentes en su mayor parte son específicos y sufren variaciones estacionales.



La celulosa es el principal constituyente de la pared de las plantas terrestres; en la **Macrocystis pyrifera**, además de ésta se encuentra el ácido **algínico**, corrientemente denominado "**algina**", **ficocoloide** de molécula compleja, cuya estructura aún se discute (5). El producto de la fotosíntesis, en las plantas terrestres es el almidón el cual es reemplazado en las algas pardas por la **laminarina**, sustancia de estructura similar pero no idéntica al almidón. Otra diferencia entre las algas pardas y las plantas terrestres se refiere al **manitol**, alcohol **hexahídrico**, que se forma como resultado del proceso de asimilación y que ocupa en ellas el lugar de la glucosa (5). Dentro del estudio de compuestos orgánicos, los más importantes son: los hidrocarburos y **ficocoloides**, tales como: **alginas** en algas pardas, **agares** y **carragenos** en algas rojas .

#### **A. ESTUDIO DE FICOCOLOIDES EN ALGAS MARINAS PARDAS Y ROJAS**

Los **ficocoloides** más importantes extraídos de las algas marinas de acuerdo a su importancia económica son: el **agar-agar** y el **carrageno**, extraídos de las algas rojas y las **alginas** (el ácido **algínico** y sus derivados) extraídas de las algas pardas (6).

##### **1. EL AGAR (O AGAR-AGAR) (6) :**

###### **a) DESCRIPCION**

Es un coloide de algas (**ficocoloide**) extraído de especies del género **Gelidium** y otras **agarófilas**, todas ellas pertenecientes a las algas rojas (**rhopoditas**). Es una sustancia amorfa y en el comercio se halla en forma de polvo, escamas, bloques rectangulares y haces de tiras delgadas. Es poroso, translúcido, **membranoso**, de color un tanto amarillento, quebradizo cuando está seco, y flexible cuando está húmedo.

###### **b) NATURALEZA QUIMICA (6) .**

El **agar** es el **éster** sulfúrico de una **galactosa** lineal. Consta de una cadena larga de residuos de **D-galactopiranosas** unidos por enlaces **1,3-glicosídicos**.

Esta cadena termina en su extremidad reductora en un residuo de **L-galactopiranososa** unido al resto de la cadena por medio del carbono 4, este residuo de **L-galactosa** está **esterificado** en el carbono 6 con ácido sulfúrico. Probablemente hay hasta 53 unidades de **galactosa** por cada grupo **-SO<sub>3</sub>H** y por lo menos 140 de dichas unidades por cada grupo terminal no reductor. La constitución de la molécula de **agar** se puede representar con la siguiente fórmula propuesta por **Jones** y Peat (1942) (7).

#### **FORMULA ESTRUCTURAL DEL AGAR-AGAR**

En su estado natural el **agar** es un componente de la membrana celular de las **agarófilas** probablemente en forma de sal cálcica o de mezcla de sales de calcio y magnesio.

c) **PROPIEDADES Y REACCIONES (8)**

El **agar** es insoluble en agua fría, pero se hincha mucho al absorber hasta veinte veces su peso en agua. Se disuelve fácilmente en agua hirviendo, y al enfriarse se convierte en un gel firme, basta 0.5% de **agar** en agua para la formación del gel.

En poder de gelación, el **agar** sobresale entre todos los coloides. Aunque la solución de 1% de **agar** se solidifica aproximadamente a 40°C; su gel no se funde hasta 95°C.

La solución de 1% de **agar** en el punto de neutralidad tiene viscosidad de 1.6 Cps con relación al agua, medida con el viscosímetro de Ostwald a 45°C. La solución de **agar** tiene carga ligeramente negativa, su estabilidad depende de la hidratación y de la carga eléctrica, y si se suprimen ambos factores se produce **floculación**.

El gel de **agar**, como otros geles, manifiesta el fenómeno de la sinéresis; esto es: cuando permanece en reposo se contrae y exuda algo de líquido por la superficie, el grado de sinéresis varía según la procedencia del **agar**.

Por hidrólisis con solución de 1% de ácido sulfúrico, el **agar** produce **galactosa**, que reduce la solución de **Fehling**.

d) **PROCEDENCIA (8)**

La fuente principal del **agar** es

la especie **Gelidium** (algas rojas), las cuales se crían en las aguas del Japón, China, California y Baja California. Como estas plantas crecen más abundantemente sobre rocas en aguas de tres a doce metros de profundidad, o aún más, es necesario bucear para encontrarlas y desprenderlas a mano, otra fuente importante del **agar** son las algas rojas en las especies: **Ahnfeltia** de Sajalín, Siberia y costa del Mar Blanco; **Pterocladia** de Nueva Zelandia y **Gracilaria**, de Australia, Sud Africa, Carolina del Norte y Florida. Hay más de cuarenta especies de algas rojas que sirven de materia prima secundaria o suplementaria en la producción de **agar**.

e) **ENZIMAS QUE DESCOMPONEN EL AGAR-AGAR (8)**.

La **gelasa** que disuelve el **agar**, produciendo una pequeña cantidad de azúcares reductores se produce por el "**Bacterium gelaticus**".

Aparte de las enzimas **microbianas** la **gelasa** que producen las vísceras de los **abalones** y de los caracoles también intervienen en la misma reacción.

La **agarosa** producida por el **Vibrio agarlicuofaciens** tiene su **pH** óptimo de **licuofacción** entre 6.0 y 7.0 a temperatura de 40° C, perdiendo actividad a 60° C por 30 minutos, el **agar-agar** debido a las enzimas, en su primera etapa pierde violentamente su grado de viscosidad resultando una producción de 1 a 2% de azúcares reductores y aún a baja temperatura no coagula.

f) **USOS DEL AGAR AGAR (8)**

El **agar** no aparece como un artículo importante en el comercio hasta la segunda mitad del siglo XIX. Una de las primeras aplicaciones fue como medio de cultivo semi-sólido de bacterias.

En la actualidad, el agar-agar ha encontrado numerosos usos siendo un **ficocoloide** de mucha importancia. Su empleo técnico se ha incrementado enormemente en las últimas décadas, especialmente en las industrias farmacéutica y alimentaria.

## 2. EL CARRAGENO (7)

### a) DESCRIPCION.

El carrageno es un extracto ficocoloide obtenido de las algas rojas; como *Chondrus crispus* y *Gigartina stellata*.

El lambda carragenina, muestra su estructura como un polisacárido lineal que tiene enlazado 1,3-d-galactosa-2-sulfato y 1,4-d-galactosa-2,6-disulfatos en residuos. También las unidades 1,3-enlazadas pueden ser unisulfatados. Su estructura es:

El kappa carrageno contiene más del 34% de 3,6 anhidro-D-galactosa y 25 % de sulfato de ester, no es soluble en agua fría, excepto en la forma de sal de sodio, en agua fría se dispersa normalmente para formar una dispersión gruesa, que requiere de calentamiento para lograr solubilidad completa.

La estructura del kappa carrageno es:

**b) VARIEDADES DE CARRAGENOS (7)**

Se conoce 6 tipos diferentes de carragenos: (kappa) k, (Iota) i; (lambda) l; (mu) u; (nu)  $\mu$  y (Xi) E carrageno.

**c) PROPIEDADES FISICAS Y REACCIONES (7).**

El carrageno forma una solución coloidal con el agua.

El gel licúa a baja temperatura 27-41°C, en comparación con los 80-100°C en el caso del agar dependiendo de su procedencia y concentración. La gelificación ocurre sólo en presencia de ciertos iones como potasio, calcio, amonio, rubidio y cesio su cualidad principal está dada por su capacidad de aglomeración en las moléculas de caseína, cualidad aprovechada con propósitos prácticos.

El carrageno difiere químicamente del agar por su fracción sulfatada muy alta, así mismo, por su alto contenido de cenizas. La mayor cantidad de investigaciones lo hicieron en el *Chondrus crispus*, el mismo que difiere ligeramente del obtenido de *Gigartina stellata*.

**d) USOS DEL CARRAGENO (7)**

En el mercado se encuentran muchos productos que llevan carrageno puro o con agregados de sales y otras sustancias.

Es muy utilizado en múltiples industrias, sobre todo en la industria alimenticia.

### 3. LA ALGINA (EL ACIDO ALGINICO Y SUS DERIVADOS)

#### a) DESCRIPCION (9)

Algina es un término de referencia para el ácido algínico y sus derivados de sodio, amonio, potasio, propilenglicol, etc. Se presenta en casi todas las algas pardas como principal constituyente en su pared celular. Las alginas, casi siempre se encuentran con otros polisacáridos, tales como laminarina (5-30%), fucoidina (2-12%), diferenciándose de estas dos últimas por la propiedad de insolubilidad en el agua y por encontrarse asociado por varios cationes: calcio, magnesio y sodio.

El ácido algínico es un poliuronido complejo, estable a la hidrólisis, su degradación es complicada y cuando se realiza el fraccionamiento se encuentra conformado por unidades de grupos uronilos, caracterizados por los enlaces glicosídicos.

#### b) ESTRUCTURA QUIMICA DEL ACIDO ALGINICO (10)

Al ácido algínico se le considera un polisacárido ácido coloidal hidrofílico, de fórmula general:  $(C_nH_xO_n)_n$  donde "n" se repite tantas unidades estructurales que pueden ser de 80 a 83 veces. Químicamente, el ácido algínico no es un compuesto simple, sino pertenece a la familia de los polisacáridos, con una composición variada de ácido gluconico y manurónico. Se confirmó la existencia de un enlace B(1-4) de unidades del ácido manurónico, evidenciado por el espectro de rayos X.

También se estableció, que dos de los cuatro ácidos **mannurónicos** están orientados en oposición a los otros dos, y el ácido **algínico** obtenido de **Macrocystis pyrifera**, tiene ácido **L-gulurónico** como mayor porcentaje de constituyente. Este ácido está presente en cantidades variables, dependiendo del tipo de alga, y de la estación en que se cosecha.

## **ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DEL ACIDO ALGINICO**

Las **alginas** se extraen por medio de un álcali, y luego de blanquearlas se precipitan, filtran, coagulan, neutralizan, deshidratan y se muelen.

### **c) CARACTERISTICAS FISICAS (11)**

Las propiedades de las **alginas**, varían según la materia prima y método del proceso de obtención. Aunque generalmente tienen los siguientes límites:

- 1) **pH** de la solución acuosa: 3.5-10.
- 2) viscosidad de la solución acuosa al 1% : 5-20 (**Cps**)
- 3) tamaño de las partículas: 10-2100 mesh.
- 4) color: blanco ó marrón



**d) GRADOS DE PUREZA (9)**

Hay refinado (para alimentos), y técnico (comercial), la **algina** refinada está libre de celulosa, los cuales se eliminan por filtración y el producto es blanqueado y purificado, en cambio, la **algina** comercial contiene celulosa y no se blanquea .

**e) PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL ACIDO ALGINICO Y ALGINATOS (10).**

El ácido **algínico** es insoluble en agua fría y poco soluble en agua hirviendo. Cuando está húmedo puede absorber varias veces su peso en agua, si se seca, se endurece mucho, se vuelve córneo y resistente a los disolventes. Es insoluble en alcohol, reduce la solución de **Fehling**, pero forma rápidamente sustancias reductoras si se seca a 100°C ó se hierve con ácido diluido. Su actividad óptica es muy intensa: diversos investigadores han hallado valores de poder rotatorio entre -132,6° y -164.2°.

El ácido **algínico** es un ácido débil, pero su constante de disociación es suficiente para desprender dióxido de carbono de las soluciones de carbonatos. Su equivalente de neutralización teórica es 176, puede ser titulado con álcali usando como indicador **fenolftaleína**.

Las sales de ácido **algínico** con metales alcalinos, **amonio**, magnesio y **aminas** inferiores son hidrosolubles. Otros **alginatos** son insolubles en agua. Los **alginatos** solubles son coloides muy hidrófilos que forman soluciones sumamente viscosas a baja concentración. Por ejemplo la solución 1% de **alginato** sódico, puede tener viscosidad aproximadamente de 1000 **centipoises** a 17°C. La viscosidad de las soluciones de **algina** varía mucho según el método de preparación.

El pH del **alginato** sódico que resulta de la combinación **estequiométrica** de ácido **algínico** e hidróxido sódico es aproximadamente 7,7. En la industria conviene **em-plear algina** con **interválo** de pH de 4 a 10; cuando el pH es menos de 4, el ácido **algínico** tiende a precipitarse, y si pasa de 10, pierde rápidamente su viscosidad y se vuelve inestable. El aumento de la temperatura reduce la viscosidad de las soluciones de **algina**.

#### **f) CUALIDAD Y USO DEL ACIDO ALGÍNICO Y ALGINATOS (II)**

Una de las cualidades más sobresalientes de la **algina** es su alta capacidad de absorción de agua, esta cualidad la convierte en uno de los productos más utilizados por numerosas industrias que requieren de agentes espesantes, **estabilizante, emulsificantes** de suspensión que formen un gel o película coloidal.

El ácido **algínico** por otro lado tiene una alta capacidad de reacción. Puede ser mezclado con álcalis, **amonio, aminas** y bases orgánicas formando sales solubles en agua como **alginatos** de **amonio, fierro, litio, magnesio, potasio, sodio** o sales insolubles en agua como: **alginatos** de aluminio, cobre, **niquel, plata, zinc**.

Los más importantes son los **alginatos** de sodio, potasio, **amonio** y calcio.

Su empleo es alto y variado sobre todo en la tecnología de alimentos. Los **alginatos** empleados con éste fin son de varias calidades, con fórmulas y detalles de usos, grados de pureza y otros factores como: viscosidad, tamaño del grano y color.

## B. ESTUDIOS DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN ALGAS PARDAS Y ROJAS (12).

En la bibliografía consultada (últimos 30 años), se encuentran muchos reportes de estudios realizados en las especies de algas marinas pardas y rojas.

Estos han sido realizados en diferentes países del mundo, tales como: Alemania, Italia, Francia, España, Japón, Australia, Estados Unidos de Norte América, Costa Rica y Chile. Los principios activos de algas marinas en su mayoría, presentan las siguientes estructuras: sustancias **terpénicas**, esteroides (**esteroles** en su mayoría), compuestos **aminados**, **fenólicos**, hidrocarburos superiores. La mayoría de estas estructuras se caracterizan por ser fuertemente **halogenadas** (especialmente bromadas) (13).

Estos principios activos en su mayoría presentan actividad antibiótica, **antibacteriana** y **antitumoral**; otros tienen poder fungicida (insecticidas). Por esta razón tienen una amplia aplicación dentro de la Industria farmacéutica.

Se ha encontrado un estudio de hidrocarburos superiores en la **Macrocystis pyrifera** (14). Respecto a las algas rojas: **Gigartina chamissoi** y **Peterosiphonia dendroidea**, en la primera hay estudios de esteroides (**esteroles**), (15) y de la segunda no se reporta estudios de principios activos, esta especie es autóctona; en ella se han realizaron estudios desde el punto de vista biológico, que consistieron en la investigación de actividad **antibacteriana** en extractos de esta planta (16).

### 1. ESTUDIO DE HIDROCARBUROS EN ALGAS PARDAS (MACROCYSTIS PYRIFERA) (14).

En Chile (Estrecho de Magallanes), se ha hecho un estudio de identificación de hidrocarburos en **Macrocystis pyrifera**, estos están constituidos principalmente por hidrocarburos saturados, **insaturados**, normales y ramificados, con largas cadenas entre 16 y 35 átomos de carbono.

En la bibliografía consultada (14) se han encontrado estudios de perfiles de distribución y metabolismo de fracciones **hidrocarbonadas** en algas marinas pardas.

Tanto los organismos marinos como terrestres sintetizan **n-alcános** en el que predominan cadenas con número impar de carbonos, Ejm:  $C_{13}$ ,  $C_{15}$ ,  $C_{17}$ ,  $C_{19}$ .

## 2. ESTUDIO DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN ALGAS PARDAS (17).

En estas especies se han hecho estudios de componentes volátiles (hidrocarburos odoríferos) algunos presentan actividad **antitumoral** y otros actividad **antimicrobial**.

En la mayoría de estas especies se han logrado aislar compuestos **esteroidales (esteroles)**, predominando el **fucosterol** y otros componentes minoritarios, tales como el **demosterol** y el **colesterol**.

El contenido de **esteroles** en estas especies, varían de acuerdo a la estación. Algunas especies de algas pardas con sus principios activos (**esteroles**) aislados son los siguientes:

### a) ESPECIE **SARGASSUM THUMBERGII** (17)

En esta especie (tanto en el material fresco como en el seco), se ha encontrado compuestos **esteroidales (esteroles)**. Una de las estructuras es la siguiente:

**b) ESPECIE FUCUS EVANESCENS (17)**

En esta especie se ha logrado aislar una estructuras **esteroidales** (esterol). La estructura es la siguiente:

**3. ESTUDIO DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN ALGAS ROJAS (18)**

La mayoría de estas especies de algas se caracterizan por contener **metabolitos polihalogenados**, así como lípidos y sustancias **terpénicas** (algunos con actividad biológica). Se han logrado aislar una gran cantidad de esteroides (**fucosterol**, **colesterol**). Algunos ejemplos son los siguientes:

**a) ESPECIE LAURENCIA NIPONICA (18)**

En esta especie se ha logrado aislar algunos **metabolitos** con poder insecticida, cuyas estructuras son las siguientes:

**b) ESPECIE ACANTOPHORA SPICIFERA (12)**

En esta especie, se han logrado aislar compuestos **esteroidales**; una de cuyas estructuras es la siguiente:

## II. DESCRIPCION DE LAS ALGAS MARINAS

### 2.1. IDENTIFICACION BOTANICA

Las especies recolectadas en su estado fresco, fueron remitidas al Museo de Historia Natural "Javier Prado", Herbario de la UNMSM (Lima-Perú), en donde fueron identificadas por el Dr. Cesar Acleto O, como *Macrocystis piryfera* (alga parda recolectada en Pucusana-Perú), *Gigartina chamissoi* (alga roja recolectada en Ancón-Perú) y *Peterosiphonia dendroidea* (alga roja, recolectada en Pucusana-Perú).

### 2.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

#### 2.2.1 ESPECIE MACROCYSTIS PIRYFERA (alga parda) (1)

Esta especie se encuentra distribuida en las siguientes localidades del Perú :

DEPARTAMENTO	LOCALIDAD
PIURA	Isla Lobos de Tierra
LA LIBERTAD	Punta Negra Cerro Prieto
ANCASH	Punta Culebras Bahía Samanco Bahía Chimbote
LIMA	Callao Pucusana
ICA	Punta San Juan Islas Chincha Lagunilla

#### 2.2.2 ESPECIE GIGARTINA CHAMISSOI (alga roja) (1).

Esta especie es muy abundante a lo largo de todo el litoral peruano, y abunda durante casi todos los meses del año, las localidades en donde se encuentran en mayor abundancia, son las siguientes:

<b>DEPARTAMENTO</b>	<b>LOCALIDAD</b>
ICA	Bahía de San Nicolás Laguna Grande Playa <b>Mendieta</b> <b>Lagunilla</b> Bahía Independencia Pisco Islas Chincha
LIMA	<b>Pucusana</b> San <b>Bartolo</b> Chorrillos Barranco Isla San <b>lorenzo</b> La Punta Bahía Ancón
LA LIBERTAD	Punta Negra Puerto <b>Chicama</b>
PIURA	Paíta <b>Lobitos.</b>

### **2.2.3 ESPECIE PETEROSIPHONIA DENDROIDEA (19)**

Esta especie está circunscrita a dos **areas** bien definidas de la costa Peruana, tales como en la Costa Central a la Bahía de la Independencia y en la zona Norte entre la Isla de Lobos de Tierra a Máncora.

## **2.3. DESCRIPCION BOTANICA DE LAS ALGAS MARINAS**

### **2.3.1 ESPECIE MACROCYSTIS PIRYFERA (alga parda) (1)**

Son plantas perennes con ejes erectos que derivan de un **rizoide** masivo, de **hapterios** ramificados **dicotómicamente**. Los **estípites** son cilíndricos o ligeramente compresos ramificados dos a muchas veces cerca a la base, estas ramas llevan **esporofilos pedicelados** sin neumáticos, posteriormente los ejes **axilares** llevan láminas en toda su longitud, unilateralmente y a intervalos regulares, cada lámina lleva en su base un **neumatóforo subgloboso** o **piriforme** de cerca **2** cm de diámetro, la lámina es simple, **lanceolada**, angosta o amplia, u oval atenuada de 80 cm a 1 m de longitud por 2.8 a 11 cm de ancho, rígida a **membranacea**, lisa a rugosa, de margen **ciliadocerrado**.



### 2.3.2 **ESPECIE GIGARTINA CHAMISSOI (alga roja) (1)**

En esta especie se distinguen dos grupos morfológicos; uno que incluye a las formas angostas (**grupo-Lessonni**) y el otro que incluye a las formas amplias (**grupo Chauvinnii**).

En resumen el talo de esta especie se caracteriza por ser **membranacea** de 1 mm de ancho en las formas "**chauvinnii**", alcanzan desde 6 a 45 cm de altura. Su color es tan variado como su forma y tamaño, frecuentemente es verde oscuro, verde **violacio**, verde iridiscente, marrón rojizo y negro. Está constituido generalmente por varios ejes axiales que derivan de un disco **basal** pequeño.

Los ejes en la base son cilíndricos, divididas **subdicotonamente** una a dos veces, pronto se convierten en ejes primarios, laminares **percurrente**. Las ramificaciones son generalmente **dísticas** y **pinnadas**, ocasionalmente **subdicótomas** abundantes, las ramas laterales se originan sucesivamente y son de diferente tamaño y longitud según la edad. Cuando están fértiles, los **cistocarpos**, aglomerados a lo largo del margen de las ramas primarias y secundarias.

### 2.3.3 **ESPECIE PETEROSIPHONIA DENDROIDEA (alga roja) (19)**

Estas especies se presentan agrupadas constituyendo matas erguidas, marrón y **olivaceas** o negras, alcanzan de 10 a 20 cm de alto; el talo es cilíndrico, **acuminado** de la base al ápice, ramificado en la parte inferior. El eje principal como las ramas llevan gran cantidad de ramificaciones.

# 01 PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1. ALGAS MARINAS PERUANAS ESTUDIADAS

Se han estudiado 03 especies de algas marinas:

1. *Macrocystis pyrifera* (alga marina parda) Pucusana-Isla Galápagos, Lima-Perú.
2. *Gigartina chamissoi* (alga marina roja) Ancón-Playa Hermosa, Lima-Perú.
3. *Peterosiphonia dendroidea* (alga marina roja) Pucusana-Isla Naplo, Lima-Perú.

## 3.2. ESPECIE MACROCYSTIS PYRIFERA (alga marina parda)

### 3.2.1 COLECCION DEL MATERIAL, MUESTREO, PREPARACION Y ALMACENAMIENTO DEL ALGA

Las muestras de *Macrocystis pyrifera*, se recolectaron mediante buceo a 4 y 6 metros de profundidad en Pucusana-Perú, en el mismo lugar en que se realizaron los demás muestreos que contempla el presente trabajo de investigación. Las fechas de muestreo corresponden a Setiembre de 1991; diciembre de 1991; abril de 1992, y Julio de 1992.

En cada fecha de recolección, se analizaron ejemplares completos.

Las plantas recolectadas, se secaron a 40°C, durante 15 horas aproximadamente, se molieron en un molino eléctrico, pasando por varios tamices hasta obtener un tamaño de 50 pm, en este estado, las muestras se almacenaron en bolsas de papel, en lugar seco, para su posterior análisis y estudio.

Una forma de conocer si es conveniente su explotación y época, es recurriendo a estudios de análisis químico de la especie por un período prolongado que abarque todas las estaciones climáticas del año. Para cumplir con este objetivo se estudiaron muestras recolectadas en las estaciones de Invierno (Julio), Primavera (Setiembre) y Verano (Enero) de la Ciudad de Lima-Perú.

### 3.2.2 ESTUDIOS QUIMICOS EN MACROCYSTIS PYRIFERA; CONSTITUYENTES INORGANICOS Y ORGANICOS

#### A. METODOS DE ANALISIS DE COMPUESTOS INORGANICOS EN LA MACROCYSTIS PYRIFERA (5)

Para realizar los análisis se utilizaron métodos clásicos, los cuales se definen a continuación:

**1) PESO SECO**

Las muestras recién recolectadas se pesaron, denominándose al valor obtenido peso fresco. Después del tratamiento de secado se volvieron a pesar (peso seco) y se determinó la diferencia de peso.

**2) HUMEDAD**

Se pesaron 10 g de alga seca y molida y se calentaron aproximadamente 4 horas en una estufa a 100°C. La pérdida de peso fue usada para calcular el porcentaje de humedad (Tabla 1 y Fig.1).

**3) CENIZAS TOTALES**

Se pesaron 2 g de alga seca y molida, se calcinaron durante 4 horas en una mufla eléctrica a 500°C, la pérdida de peso fue un índice para calcular el porcentaje de cenizas totales (Tabla 2 y Fig.2a).

**4) CENIZAS INSOLUBLES**

Las cenizas totales obtenidas en el análisis se lavaron 3 veces con 5 ml de agua destilada hirviendo y posteriormente en el mismo filtro se lavaron 4 veces más. Se calcinó el residuo durante 3 horas a 800°C, se enfrió y se pesó. Calculándose de este modo el porcentaje de cenizas insolubles (Tabla 2 y fig.2b).

**5) CATIONES Y ANIONES (20)**

Se pesaron 2 g de alga seca y molida se calcinaron durante 4 horas en una mufla eléctrica a 800°C. Las cenizas resultantes se trataron con porciones sucesivas de 5 ml de **HNO<sub>3</sub> concentrado**, hasta obtener decoloración total. Se filtró y se enrasó a 100 ml la solución original.

**a) SODIO Y POTASIO**

Se tomaron 0.5 ml de la solución anterior, se enrasaron a 100 ml y se determinó Na y K por fotometría de llama (Tabla 3 y Figs.3a, 3b).

**b) CALCIO**

Se tomó 5 ml de la solución original y se enrasó a 100 ml con agua destilada y se determinó el calcio por métodos volumétricos (Tabla 4 y Fig. 4a)

c) **MAGNESIO**

Se tomó la misma solución preparada para determinar Na y K y se analizó el magnesio por métodos **gravimétricos** (Tabla 4 y Fig.4b).

d) **CLORUROS**

Se determinó por el método de **Mohr** diluyendo 0.15 ml de la solución original a 20 ml aproximadamente y valorando con nitrato de plata 0.01N, en presencia de **cromato** de potasio (Tabla 5 y Fig.5a).

e) **SULFATOS**

Se determinaron por un método de **turbidimetría**, diluyendo 3 ml de la solución inicial hasta 100 ml con agua destilada, agregando 5 ml de una solución  **acondicionadora**, 0.5 g de **BaCl<sub>2</sub>** sólido, agitándose durante 5 minutos con agitador magnético, la turbidez provocada por la presencia de sulfatos se leyó a 420 nm en un **espectrofotómetro** (Tabla 5 y Fig.5b)

f) **COBRE Y HIERRO**

En la solución original se leyó directamente Cu y Fe en un **espectrofotómetro** de absorción atómica (Tabla 6 y Figs. 6a y 6b)

g) **NITROGENO**

Se procedió a digerir 0.25 g según el método de **Kjedahl**, con 3 ml de ácido **sulfúrico** en presencia de 2g de **K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** y 0.25 g de **HgO** hasta decoloración total. En seguida se destiló el **NH<sub>3</sub>**, liberado por adición de 1.2 g **NaOH** y 0.15 g de **tiosulfato** sódico y se recibió en ácido bórico saturado, **tiulándose** con **HCl** 0.02 N. (Tabla 7 y Fig. 7a)

h) **FOSFORO**

Se tomó 0.1 ml de la solución inicial, tratándose en medio **sulfúrico** en presencia de ácido **ascórbico** y **molibdato** de **amonio**, formándose un complejo azul de **fosfomolibdato** y leyéndose su **absorbancia** a 825 nm en el **colorímetro**. (Tabla 7 y Fig. 7b).

**B. METODOS DE ANALISIS DE COMPUESTOS ORGANICOS EN LA MACROCYSTIS PYRIFERA.****1. ENSAYO DE RECONOCIMIENTO DEL ACIDO ALGINICO EN LAS HOJAS DE LA MACROCYSTIS PYRIFERA (21)**

Para reconocer el ácido algínico se aplicó el test de Scott directamente en las hojas de las algas. El procedimiento se describe a continuación :

**PROCEDIMIENTO :**

Se tomó 0.5 g de muestra seca (hojas), se agregó 10 ml de HCl 0.2N, dejándose toda la noche en maceración, se filtró el residuo de la muestra, lavándose con 20 ml de agua destilada; luego se agregó 20 ml de una solución de carbonato de sodio (6%), controlando la temperatura a 70 °C, con agitación continua, dejándose reposar toda la noche, después se filtró, y el residuo se lavó con 20 ml de carbonato de sodio al 1.5%, seguidos por lavados con agua destilada.

Al filtrado se agregó 20 ml de HCl 1N, dejándose reposar hasta precipitación completa del gel el cual se acumuló en el fondo, se decantó y se lavó con EtOH y HCl 1N (10 ml de HCl y 50 ml de EtOH).

Al filtrado anterior que contenía al ácido algínico, se le agregó 20 ml de cloruro de calcio 3M (CaCl<sub>2</sub>), y se tomó 5 ml en un tubo de ensayo, comparándose con un respectivo blanco, a cada uno de ellos se le agregó 2 ml del reactivo de Scott (cloruro de cetilpiridina), observándose formación de un precipitado amarillento, (complejo de "cetilpiridina del ac.algínico").

**2. DETERMINACION CUANTITATIVA DEL ACIDO ALGINICO (21)**

Se hizo el análisis por el método de Cameron Ross y Percival: se tomó 0.1 g de muestra seca y molida. Se adicionó 20 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N a fin de extraer el ácido algínico (macerándose 24 horas), se filtró el residuo de la muestra, lavándose con 20 ml de agua destilada; luego se agregó 20 ml de una solución de carbonato de sodio (6%), controlándose la temperatura a 70 °C, con agitación continua, dejándose reposar 24 horas, después se filtró y el residuo se lavó con 20 ml

de carbonato de sodio al 1.5 %, seguido por lavados con agua destilada.

Al filtrado anterior se agregó 20 ml de **HCl** 1N, dejándose reposar hasta precipitación completa del gel, se decantó y se lavó con **EtOH** y **HCl** 1N (10 ml de **HCl** y 50 ml de **EtOH**).

Al filtrado anterior que contenía al **ac.algínico**, se le agregó 25 ml de acetato calcio 3M, valorándose el ácido acético liberado con **NaOH** 2N (Tabla 8 y Fig.8a).

### 3. **MANITOL (22)**

Se pesó 0.1 g de alga seca y molida, y se hidrolizó el alga, adicionando 15 ml de  $\text{HIO}_4$  2N y 10 ml de **KI** al 5% y se valoró el **I**, liberado con **tiosulfato** de sodio 0.1N (Tabla 9 y Fig.8b).

### 4. **LAMINARINA (22)**

Se hidrolizó el **polisacárido** y se tituló la glucosa liberada por el método de Bertrand. En un balón de 150 cc, se pesó 1 g de alga seca y molida y se agregó 25 ml de **HCl** 2N, después de realizada la hidrólisis, se adicionó 15 ml de licor cúprico, 15 ml de licor tartárico alcalino, y 25 ml de agua destilada, todo el conjunto se sometió a reflujo durante 3 minutos exactamente.

Se dejó en reposo 20 minutos el precipitado se separó del líquido por filtración y se lavó con agua hervida destilada, disolviéndose con 5 ml de licor férrico, y se titulándose directamente con **KMnO<sub>4</sub>** 0.1N.

Equivalencia: 1 ml de **KMnO<sub>4</sub>** 0.1N equivale a 6.35 miligramos de cobre; en la tabla Bertrand está el porcentaje de azúcares reductores en función de los miligramos de cobre titulado.

Los **reactivos** usados fueron:

Licor cúprico: 4 g de **CuSO<sub>4</sub>.5** disuelto en 100 ml de agua destilada.

Licor tartárico alcalino: 20 g de **C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.NaK.4H<sub>2</sub>O** + 15 g de **NaOH** disuelto en 100 ml de agua destilada.

Licor Férrico: 5 g de **Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>** + 20 g de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.** disueltos en 100 ml de agua. (Tabla 9 y Fig. 9a)

### 3.2.3 ESTUDIO DE FICOCOLOIDES EN MACROCYSTIS PYRIFERA

#### A. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DEL ACIDO ALGINICO METODO DE HAUG (10).

**Extracción por Lixiviación:** a 10 g de alga, seca y molida, se añadió  $\text{CaCl}_2$  al 1% en proporción de 3 a 1 con relación a la muestra seca. La lixiviación duró una hora, luego se filtró y se lavó con agua destilada.

La muestra fue tratada nuevamente, con carbonato de sodio al 4% en relación a su peso, calentándose durante 90 minutos a  $60^\circ\text{C}$

**Clarificación:** La solución que contenía el **alginato** sódico impuro (celulosa y otras impurezas) se diluyó con agua en proporción de 3 a 7, agitándose hasta formar una suspensión homogénea, se centrifugó a fin de separar la celulosa.

**Blanqueado:** A la solución en caliente se añadió 0,5 g de carbón activado, calentando por 10 min. a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , luego se filtró separando el carbón activado.

**Precipitación del Acido algínico:** a la solución que contenía el **alginato** de sodio se añadió  $\text{HCl}$  al 10 % hasta un pH de 2-3, precipitándose el ácido **algínico**, el cual se filtró con una bomba de vacío utilizándose una tela simple; se lavó con alcohol etílico, se secó a  $40^\circ\text{C}$  en una estufa, calculándose el rendimiento de extracción.

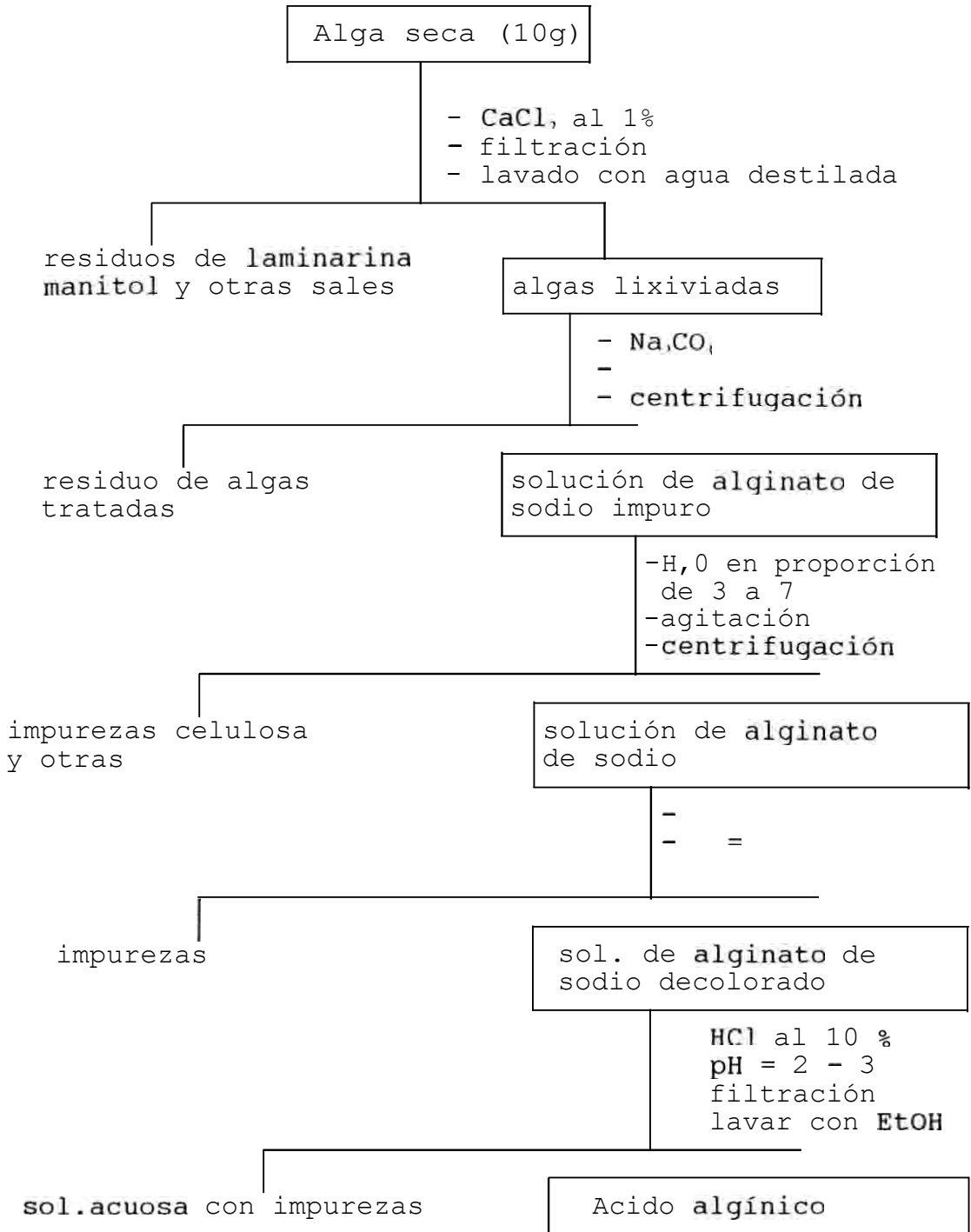
El rendimiento obtenido fue de 13.5 %.

El proceso de extracción del ácido **algínico** se esquematiza en la Fig. 10

#### EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION DEL ACIDO ALGINICO (10)

Con la finalidad de obtener las condiciones óptimas de extracción del ácido **algínico**, se ensayó varias veces el método anterior con diferentes temperaturas. Obteniéndose los siguientes resultados:

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	% en ácido algínico obtenido
25	6.2
40	9.7
60	13.5
70	15.8



**Fig. 10:** Método de extracción del ácido algínico de la *Macrocyctis pyrifera*.



## B. ANALISIS DEL ACIDO ALGINICO (21)

### 1. Humedad

Se pesó exactamente en una cápsula previamente pesada 1 g de ácido **algínico**, se llevó a la estufa por 5 horas a la temperatura de 100°C. Se pesó repetidamente hasta que no hubo pérdida sensible de peso, se obtuvo 23% de humedad con respecto a la materia seca.

### 2. Intercambio iónico

A una solución al 10% se hizo reaccionar con soluciones al 5 % de cationes monovalentes, formándose sales hidrosolubles con Na y K; y con los cationes **divalentes** también se formó sales solubles, excepto con el magnesio (Mg) con quien forma sales insolubles.

### 3. Reconocimiento del ácido algínico

El ácido **algínico** extraído de una misma planta, presenta características heterogéneas, debido a que está constituido por dos residuos; el ácido **manurónico** y el ácido **gulurónico** y de la proporción de estos, depende su composición química.

Para el reconocimiento del ácido **algínico** se ensayó con el reactivo de **Scott** (cloruro de **cetilpiridina**), con esta reacción de precipitación, se formó un complejo de **cetilpiridina** del ácido **algínico** (color amarillento).

## C. DETERMINACION DE LA PUREZA DEL ACIDO ALGINICO (23)

Para determinar la pureza del ácido **algínico** se utilizó un método proporcionado por el laboratorio **ABBOTT**, para este análisis se diseñó un equipo diferente al modelo "**USP Alginates Assay**", el cual fue utilizado con mucha efectividad y buenos resultados.

### 1. PROCEDIMIENTO (23)

Se pesó 1.2 g de muestra previamente secada en un horno al vacío durante 4 horas a 60 °C.

La muestra se colocó dentro de un balón de tres bocas el cual estaba conectado a un condensador a reflujo, a un embudo de separación y a un frasco (trampa); se adicionó perlas de ebullición, y 25 ml de **HCl**

dil. (1 en 120) al balón, y en el frasco (trampa) se colocó una solución saturada de **NaOH**, con la finalidad de atrapar el **CO<sub>2</sub>**, que podría contener el **N<sub>2</sub>**.

Se verificaron que todas las conexiones estuvieran perfectamente selladas y se hizo pasar una corriente de **N<sub>2</sub>**, libre de **CO<sub>2</sub>**, a través del equipo a una velocidad de 3000 a 6000 ml por hora, el cual fue controlado mediante el burbujeo en glicerina.

Se calentó hasta ebullición el contenido del balón, durante 2 minutos, y se dejó enfriar 15 minutos.

Por el embudo de separación, se adicionó 23 ml de **HCl** concentrado.

En el frasco (trampa), rápidamente se introdujo 25 ml de **NaOH** 0.25 N, agregándose 5 gotas de alcohol butílico y nuevamente se conectó al equipo.

Se volvió a calentar el contenido del balón hasta ebullición durante 02 horas y se continuó pasando **N<sub>2</sub>**, durante toda la experiencia.

Concluido el proceso de **descarboxilación**, al frasco (trampa) se le agregó 10 ml de una solución de **BaCl<sub>2</sub>**, (1 en 10), se agitó durante 2 minutos, se agregó gotas de **fenolftaleína** y se tituló con **HCl** 0.1 N .

**EQUIVALENCIA** : 1 ml de 0.25 N de **NaOH** consumido es equivalente a 5.5 mg de **CO<sub>2</sub>**.

**RESULTADOS** : Se obtuvo 4.09 % de **CO<sub>2</sub>**, el cual cumple con las especificaciones de la muestra patrón (4 - 5 % de **CO<sub>2</sub>**).

#### **D. PROCESO DE DEGRADACION DEL ACIDO ALGINICO (COMPUESTO M4)**

##### **1. HIDROLISIS EN MEDIO ACIDO CON MeOH EN ALGA FRESCA (COMPUESTO M4) (24)**

###### **Método:**

Se cortaron en pequeños pedazos 3 kg. de hojas de alga fresca (de color pardo marrón), se licuaron con dos lts. de **CH<sub>3</sub>OH** al 70%, a continuación todo este material se

vertió en un frasco de vidrio y se agregó 300 ml de ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  2N; se tapó herméticamente y se dejó mácerar al material durante dos meses; después de ese tiempo se observó la formación de gran cantidad de gel de color transparente el cual cubría al "bagazo" ( color blanco-pardusco), se trató de filtrar el gel pero resultó muy dificultoso, por este motivo se puso en congelación (en un refrigerador), durante 78 horas, luego se descongeló y filtró, recogiendo aproximadamente 2 litros de solución metanólica de color amarillo claro, esta solución se concentró, hasta obtenerse una sustancia resinosa de color crema oscuro (52g), el cual contenía al compuesto M4.

## **2. SEPARACION DEL COMPUESTO M4 (24)**

50 g de sustancia resinosa se disolvió con 300 ml de NaOH 1N, agitándose durante 5 minutos y observándose la precipitación de un sólido blanco pardusco.

El sólido formado se separó por filtración, y la solución se concentró hasta 250 ml, se extrajo con  $CHCl_3$  (4 x 50 ml), la solución clorofórmica se concentró hasta un volumen de 150 ml, obteniéndose una solución de color amarillo intenso. Al extracto orgánico se le agregó, gota a gota HCl 2N 15 ml, observándose la formación de un precipitado blanco.

El proceso de extracción y separación, se esquematiza en la Fig. 11

## **3. PURIFICACION DEL COMPUESTO M4 (24)**

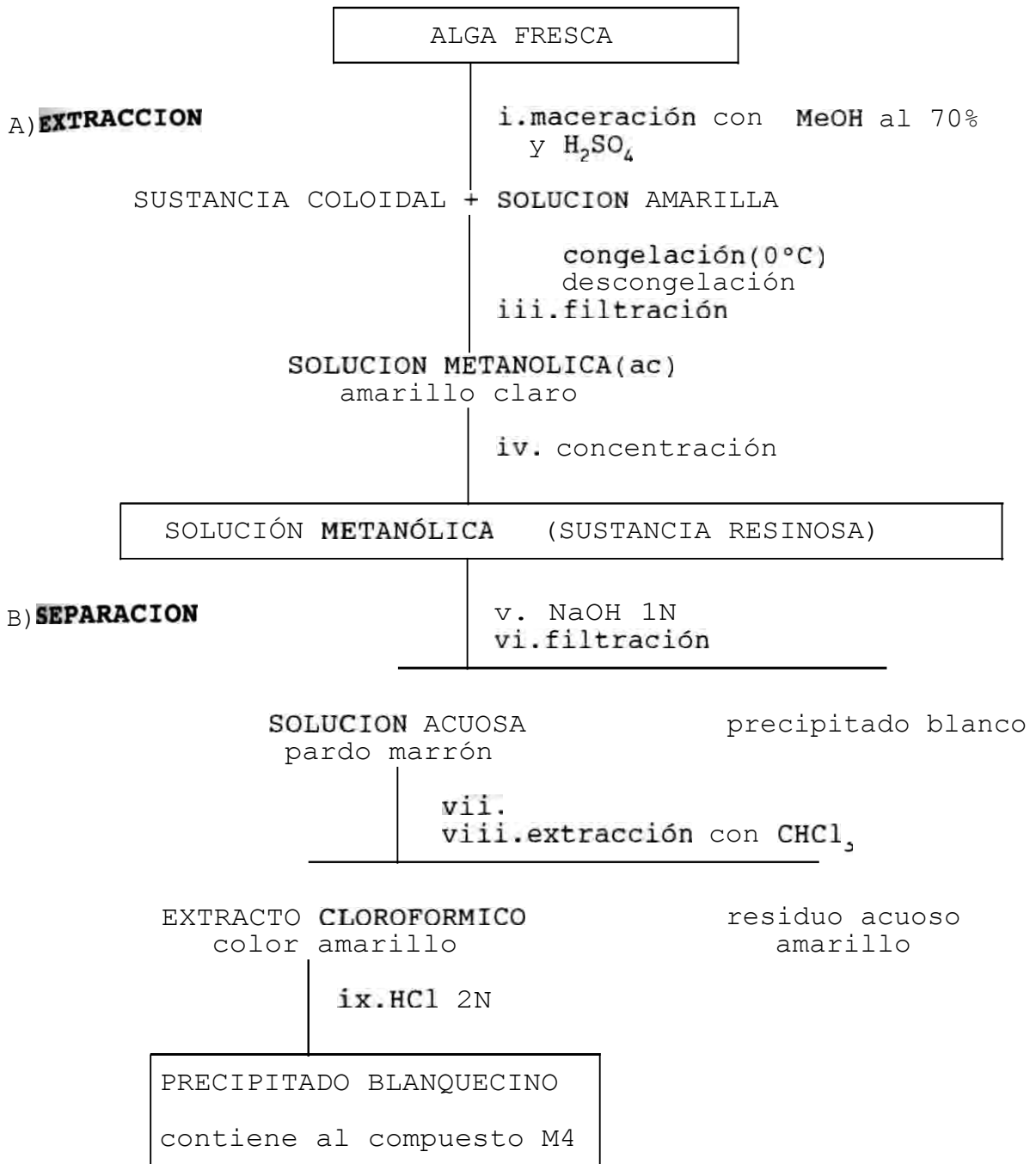
### **i. Eliminación de impurezas coloreadas.**

Se estudió la solubilidad del precipitado blanquecino en agua, etanol, y acetona, observándose su poca solubilidad mientras que las impurezas que lo acompañaban eran muy solubles en acetona, por lo que aprovechando esta diferencia de solubilidades se lavó repetidas veces el producto con acetona, hasta eliminar las impurezas coloreadas, obteniéndose un sólido de color blanco crema.

## **ii. Recristalización.**

Para la **recristalización** se utilizó una mezcla de **EtOH:H<sub>2</sub>O** (3:1) (mezcla óptima que resultó después del ensayo previo que se hizo con agua y **EtOH**, en diferentes proporciones).

La **recristalización** se realizó a una temperatura controlada de 60 °C, agregándose suficiente cantidad de carbón activado para decolorar las impurezas. Luego se filtró a través de un papel de filtro lento, obteniéndose una solución incolora la cual se enfrió en una mezcla de hielo y Cloruro de sodio ( $t = 0^{\circ}\text{C}$ ), observándose la inmediata precipitación de un sólido fino de color blanquecino, el cual se recuperó por filtración y se lavó con agua helada (3 x 10 ml), dejándose secar al aire libre, obteniéndose 42 mg de muestra (compuesto M4)



**11: Proceso de degradación del ácido algínico con MeOH al 70% en medio ácido en alga fresca (compuesto M4).**

#### 4. CARACTERIZACION DEL COMPUESTO M4

##### i. Métodos clásicos

- a) Estado físico : polvo fino de color blanco, inodoro.
- b) Punto de fusión : indefinido, se descompone a la temperatura de 188-190 °C.
- c) Pruebas de solubilidad : poco soluble en agua, etanol y acetona, parcialmente soluble en cloruro de metileno y cloroformo (con calentamiento). Después de un cierto tiempo se torna insoluble en algunos solventes.

##### ii. Métodos Espectroscópicos

A este compuesto, se le tomaron sus espectros de IR (Fig.12) y  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{CDCl}_3$  (Fig.13),  $^1\text{H-RMN}$  en  $\text{DMSO-d}_6$  (Fig.14),  $^1\text{H-RMN}$  de c. M4 acetilado (Fig.15).

#### E. OBTENCIÓN DEL ALGINATO DE SODIO A PARTIR DEL ACIDO ALGINICO (25).

Se pesó 0.5 g de ácido algínico, y se agregó 25 ml de agua más 10 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 4%, hasta obtener un pH neutro y convertir el ácido algínico en alginato de sodio. El alginato de sodio (0.87g) se colocó en una luna de reloj, llevando a secarse en la estufa a una temperatura de 60°C por 5 horas.

#### F. ENSAYOS FISICOS Y QUIMICOS DEL ALGINATO DE SODIO (25)

1. Es un polvo de color ligeramente crema, insoluble en alcohol, éter, cloroformo, soluble en agua fría y en caliente, es soluble en álcali (dando soluciones viscosas, incoloras, inodoras e insípidas).
2. Es inodoro, sin sabor, es muy higroscópico, se descompone a 110°C y se carboniza a 190°C .
3. pH = 6.8.
4. Humedad = 19.4 % a 25 °C
5. Viscosidad:  
Se preparó una solución acuosa al 1% de alginato de sodio, se mezcló homogéneamente con un agitador magnético, y se dejó reposar 2 horas y se midió la viscosidad.

Se tomaron los siguientes promedios:  
 Tiempo del flujo: de la solución = 72 seg;  
 del agua tomada como patrón = 25 seg.

Densidades: de la solución de **alginato** al  
 1 % = 1.0065, del agua destilada = 0.9980.  
 Siendo los valores de la viscosidad:  
 Solución del **alginato** problema = 28 Cps  
 solución del **alginato** comercial = 31 Cps

6. El **alginato** de sodio se asemeja a la goma arábica en forma laminar, se distingue de la dextrina y goma arábica porque estos son insolubles en ácidos diluidos.
7. El **alginato** de sodio se distingue de la gelatina, por no formar soluciones **gelosas** y no reaccionar con **taninos**.
8. Se distingue de la albúmina, por no coagular por calentamiento, del almidón por no dar coloración con el Iodo.
9. Tiene un poder rotatorio  $[\alpha]^{20}_D = -132$

#### **G. DETERMINACION DE LA PUREZA DEL ALGINATO DE SODIO (25)**

Para determinar el grado de pureza se hicieron los siguientes análisis :

##### **1. Análisis Organolépticos**

color : ligeramente crema  
 textura : quebradiza  
 apariencia : brillante

##### **2. Análisis químico**

% de humedad : 19.74  
 % de **proteína** cruda : 7.23  
 % Ceniza : 30.32

##### **3. Determinación de los ácidos urónicos (25)**

Este método sirve para determinar la pureza del **alginato** de sodio en forma cualitativa como cuantitativa, en función de los ácidos **urónicos**.

Para el ensayo se tomó como referencia una muestra patrón y se determinó el ensayo en forma comparativa, con la muestra problema.

Se pesó y se colocó en un frasco, 100 mg de **alginato** de sodio, se añadió 1 ml de  $H_2SO_4$  al 80 %, dejándose en reposo 24 horas a temperatura ambiente, luego se agregó 13 ml de agua destilada, se cerró herméticamente el frasco y se llevó a baño de vapor por 5 horas, se enfrió y se filtró; el mismo método se usó para la muestra patrón.

Se tomaron 0.3 ml de la muestra hidrolizada en un tubo de ensayo y se añadieron 4 ml del reactivo **antrona** y se agregó 5 ml de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**, 27.5 N, agitándose fuertemente y dejándose en reposo al medio ambiente por 24 horas y luego se leyó en la zona visible del **espectrofotómetro** a 540-545  $\mu$ , comparado con la muestra patrón.

Para la muestra patrón, se realizó el mismo procedimiento, observándose una lectura de 544  $\mu$ , y para la muestra problema se leyó a 544  $\mu$ .

### **3.2.4 ESTUDIO DE COMPUESTOS ORGANICOS EN MACROCYSTIS PYRIFERA (26)**

Las investigaciones bibliográficas efectuadas en **Macrocystis pyrifera** hacen notar que es muy complicado estudiar principios activos en este tipo de algas, especialmente hidrocarburos, debido a la presencia del petróleo en el medio ambiente marino o el efecto que este ejerce en las algas. Para establecer la cantidad de compuestos orgánicos se hizo una identificación sistemática de ellos, en las hojas y en los bulbos, los cuales se maceraron en **EtOH**, y se hicieron estudios de **cromatografía** de capa delgada CCD, empleando **CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**, como sistema de **elución**.

#### **A. ESTUDIO CUANTITATIVO DE HIDROCARBUROS**

##### **1. EXTRACCION DE HIDROCARBUROS-FRACCIONAMIENTO DE LA MUESTRA (26).**

Las muestras de alga seca (40 g) fueron saponificadas con 200 ml de **KOH metanólico** al 15%, manteniéndose a reflujo durante 3 horas, de acuerdo al método de extracción-digestión.

Los hidrocarburos y lípidos no **saponificables** fueron extraídos del extracto **metanólico** con 200 ml de **n-hexano** en extracciones sucesivas de 25 ml cada una. La fase orgánica se concentró hasta un volumen de 2.5 ml, este extracto se trasvasó cuantitativamente (peso exacto = 2.56 g) a un frasco previamente pesado, se secó con **N**, y se guardó herméticamente bajo refrigeración.

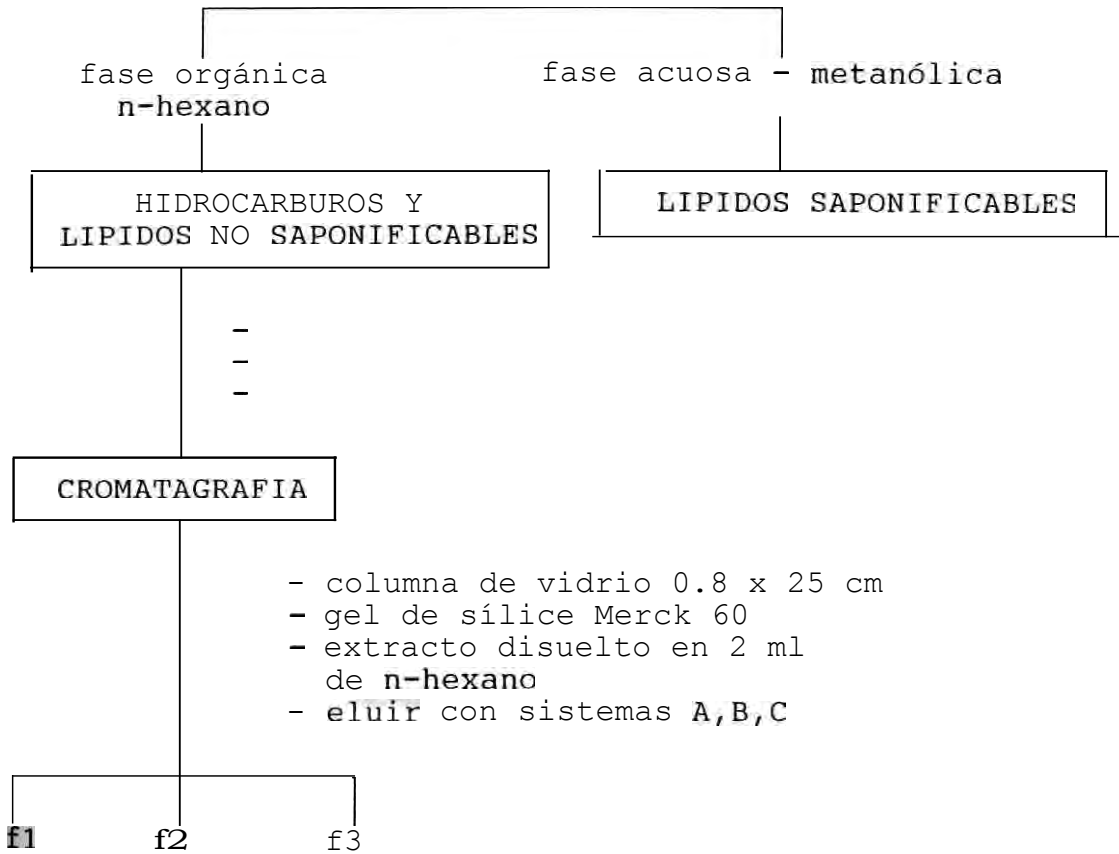
##### **2. PURIFICACION E IDENTIFICACION**

El extracto orgánico fue **cromatografiado** en una **cromatografía** de columna sobre gel de sílice 60, Merck y **eluida** con **n-hexano**; **n-hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**, (7:3) y **CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**.



40 g de alga seca en polvo

- saponificación con KOH/MeOH
- reflujo 3 horas
- filtración al vacío
- lavado con MeOH /HCl 1N
- concentración a presión red. a 40 °C
- extracción con n-hexano



Sistemas de elución:

- A = n-hexano
- B = n hexano:diclorometano (7:3)
- C = diclorometano

**Fig. 16** : Esquema de fraccionamiento de la alga *Macrocyctis pyrifera*.

Las fracciones recibidas f1, f2, f3, previo secado con N, fueron pesadas; siendo los pesos respectivos: 65.8, 77.0 y 98.0 mg.

El proceso de fraccionamiento de las muestras de *M. pyrifer* se muestra en la Fig. 16.

## **B. IDENTIFICACION SISTEMATICA DE COMPUESTOS ORGANICOS EN MACROCYSTIS PYRIFERA**

Para establecer la cantidad de compuestos orgánicos se maceraron separadamente las hojas y bulbos en EtOH, luego se hicieron estudios de cromatografía de CCD, empleando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como sistema de elución.

De acuerdo a los resultados cromatográficos, se detectaron en las hojas y bulbos un gran número de componentes orgánicos observados a simple vista, y revelados con luz UV y vapores de Iodo. Haciendo un examen minucioso de las manchas se establecieron similitudes en los valores de R<sub>f</sub> de las hojas y de los bulbos.

### **1. ANALISIS CUALITATIVO PRELIMINAR (MARCHA FITOQUIMICA).**

#### **a) Hojas**

Con el objeto de conocer el tipo de compuestos orgánicos se llevó a cabo un de análisis cualitativo, siguiendo la marcha fitoquímica de Rondine Cousio (27) cuyo proceso se esquematiza en la Fig.17. Se hicieron pruebas a las diferentes fracciones, cuyos resultados fueron:

#### **Fracción A :**

Dio reacción positiva de Ninhidrina y FeCl<sub>3</sub>, indicando grupos amino y fenólicos libres.

#### **Fracción B :**

Dio reacción positiva a la reacción de Lieberman Burchard, indicando sustancias tri-terpénicas y esteroides.

#### **Fracción C :**

Dio positiva a la reacción de Shinoda indicando presencia de flavonoides.

#### **Fracciones D y E:**

Dieron positiva a la reacción de Shinoda indicando presencia de flavonoides.

**REACCIONES ADICIONALES: fracciones A y B.**

- i Test de **Dragendorf** y Mayer; el resultado fue negativo, indicando la ausencia de alcaloides.
- ii Reacción de la espuma; dio reacción positiva indicando presencia de **saponinas**.

**b) Bulbos**

La marcha **fitoquímica** se llevó a cabo en forma paralela y en condiciones similares de las hojas; se detectaron compuestos semejantes, excepto **flavonoides** encontrados en la fracción E.

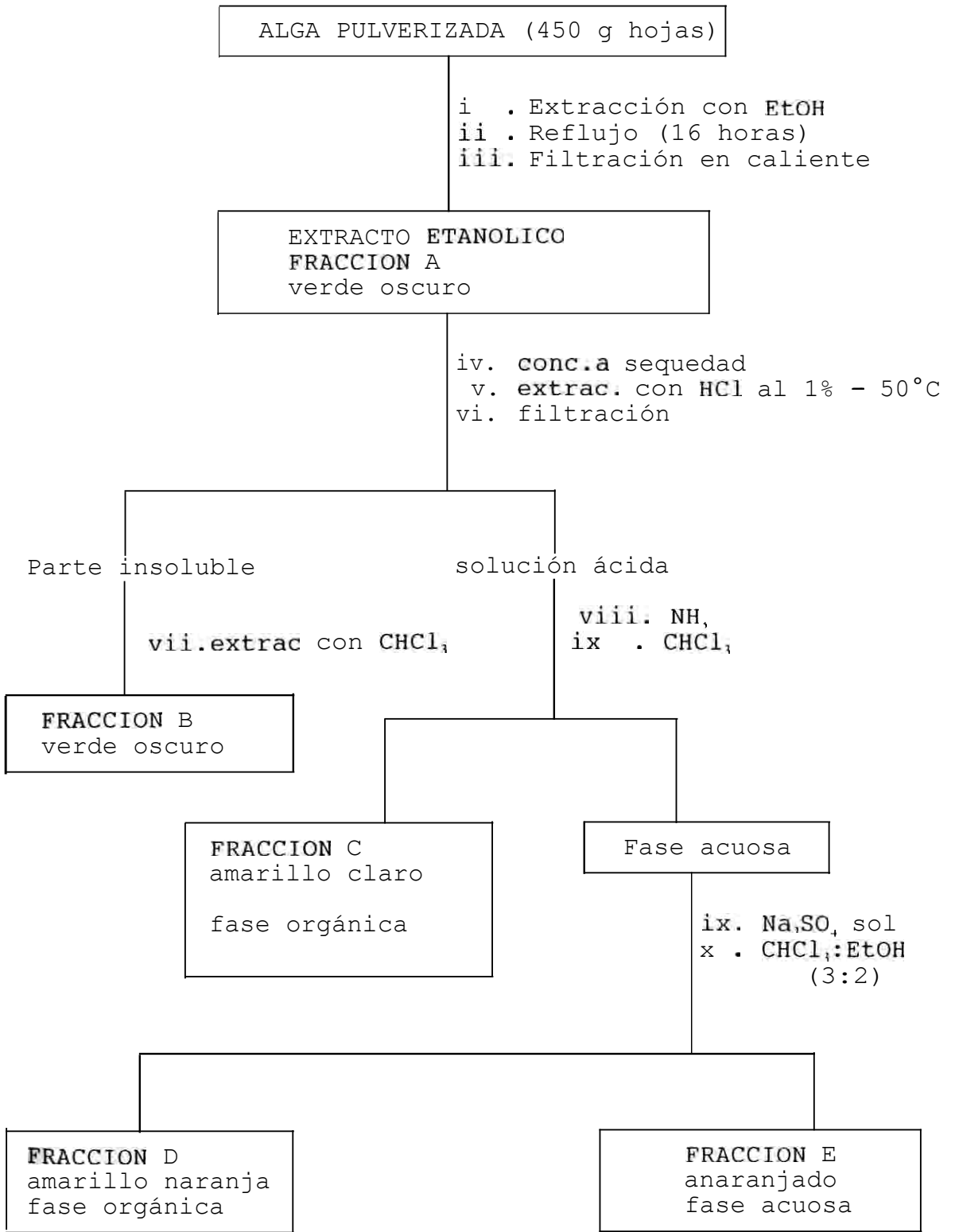


Fig. 17 : Marcha fitoquímica para la determinación cualitativa de los componentes orgánicos de las hojas de la *Macrocyctis pyrifera*.

## C. EXTRACCION, SEPARACION, PURIFICACION E IDENTIFICACION DE COMPUESTOS ORGANICOS (28).

### 1. EXTRACCION CON MeOH EN ALGA SECA

En un equipo **soxhlet** se colocó 450 g de alga seca y pulverizada extrayéndose con **metanol** técnico destilado (350 ml), y concentrándose hasta 250 ml.

El proceso anterior se repitió, hasta extraerse un total de 1.8 kg de alga.

Los concentrados **metanólicos** obtenidos de la extracción de 1.8 kg se reunieron (900 ml) y se concentraron hasta 250 ml (sustancia gomosa de color verde oscuro), seguidamente se "desengrasó" con éter de petróleo (3 x 200 ml), y luego se extrajo con cloroformo (3 x 200 ml), el cual se descartó.

En el extracto **metanólico** gomoso se hizo extracciones con **n-butanol** (3 x 200 ml), obteniéndose dos fases, la fase **butanólica** se separó y concentró (45 g de una sustancia gomosa de color verde pardo claro), el cual constituye el extracto "F".

### 2. SEPARACION DE COMPUESTOS ORGANICOS DEL EXTRACTO "F"

#### i. Tratamiento con tetraacetato de plomo al 5% .

Se disolvió 5 g de extracto "F" con 100 ml de etanol, y se adicionó 100 ml de **tetraacetato** de plomo al 5%. Se ajustó el pH = 5 con ácido acético observándose la precipitación de un sólido amarillo oscuro, el cual se separó mediante filtración simple, descartándose la solución filtrante (verde amarillento).

#### ii. Tratamiento con sulfuro de hidrógeno H<sub>2</sub>S gaseoso

El sólido amarillo oscuro se suspendió en etanol y se hizo burbujear sulfuro de hidrógeno, observándose la precipitación de un sólido negrozco, el cual se separó y descartó mediante filtración simple, recibiendo la solución amarilla clara en un vaso de precipitados.

Esta disolución se calentó en un "baño María" a fin de eliminar el exceso de sulfuro de hidrógeno, observándose al mismo tiempo la formación de una sustancia amarillenta "pegajosa" en las paredes del vaso, la evaporación total del solvente dejó en el vaso una pequeña cantidad de sustancia resinosa amarillenta de consistencia similar a un "chiclete", al cual se le llamó "extracto F1".

El procedimiento precedente se repitió con 30 g de extracto "F", proporcionando un total de 1.5 g de "extracto F1", el cual dio resultados positivos a las pruebas de  $\text{FeCl}_3$  y de Shinoda.

El proceso de extracción y separación del "extracto F1" se esquematiza en la Fig. 18.

### 3. PURIFICACION DEL "EXTRACTO F1" (RESINA AMARILLENTA) .

Purificación cromatográfica y recristalización.

#### i. Pruebas de solubilidad preliminar.

La sustancia resinosa amarillenta era insoluble en agua y éter de petróleo, escasamente soluble en MeOH, EtOH y n-butanol.

#### ii. Cromatografía en capa delgada CCD

La cromatografía de CCD se realizó con la finalidad de conocer el número de componentes orgánicos en la mezcla.

#### Condiciones de trabajo

##### Muestra:

"Extracto F1", sustancia resinosa amarillenta.

##### Adsorbente:

"Cromatofolios" tipo GF 254 Merck con revelador UV

##### Eluentes:

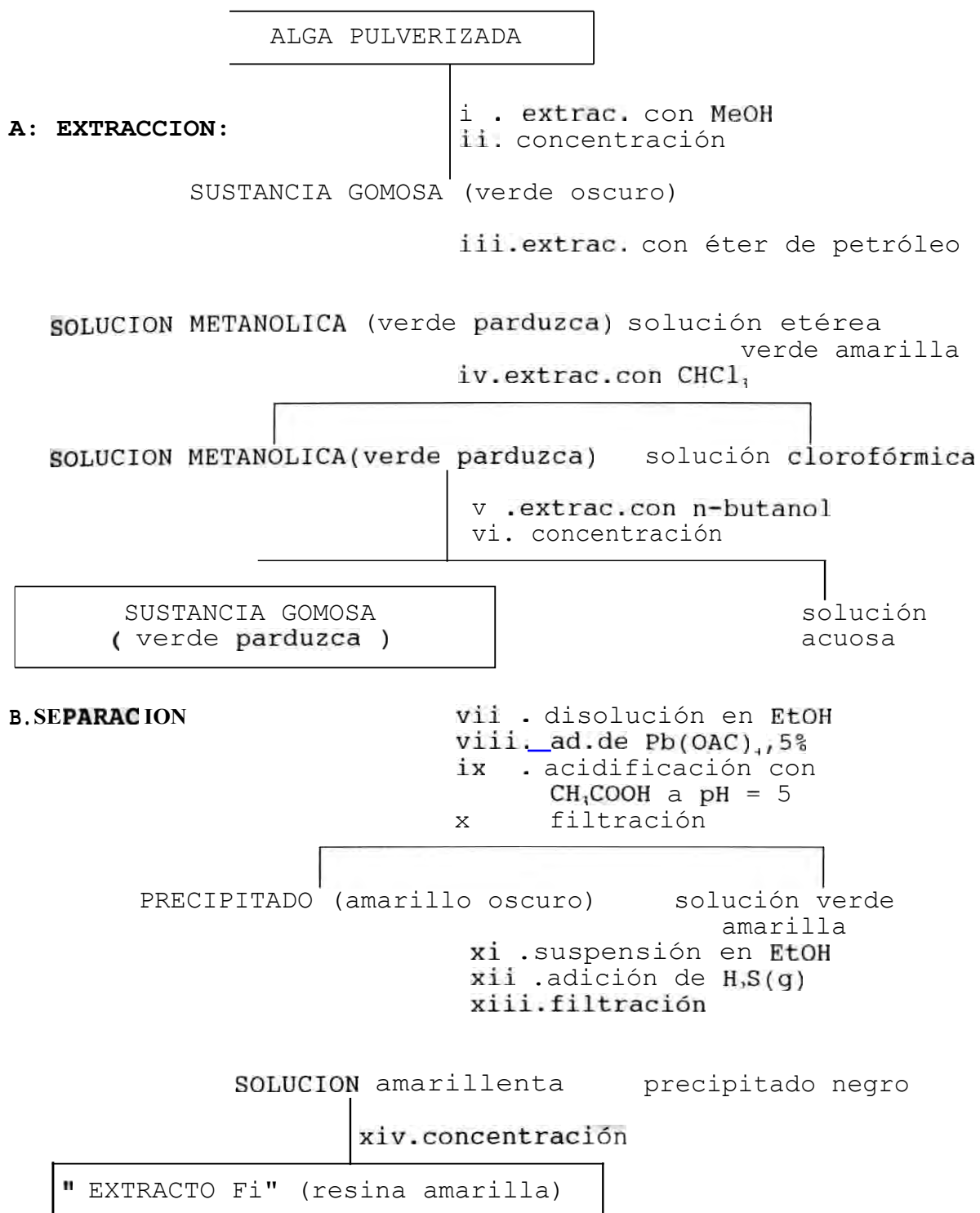
Se utilizaron los siguientes sistemas respectivamente.

- i .  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (3:1)
- ii .  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1)
- iii.  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:15)
- iv .  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:19)

**Reveladores:** vapores de  $\text{NH}_4\text{OH}$  luz UV.

#### Resultados

- a) El mejor sistema de elución fue:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:15), en donde se observó mejor separación de las manchas .  
A simple vista en el cromatograma se observan una serie de manchas anaranjadas y amarillas.



<sup>Fi</sup> g. 18 : Proceso de extracción y separación del extracto "F1"

- b) En el **cromatograma**, revelado con luz UV se observaron aproximadamente 08 manchas, destacando 01 mancha, en mayor proporción ( $R_f = 0.69$ ).
- c) Revelando el **cromatograma** con vapores de  $NH_3$ , se observaron 03 manchas de coloración amarilla intensa, una de ellas en mayor proporción ( $R_f = 0.69$ ).

### **iii. Cromatografía en columna(CC)**

#### **Condiciones de trabajo**

##### **Muestra:**

0.2 g de "extracto F1" resina amarillenta.

##### **Adsorbente:**

60 g de **silicagel** (70-280 mesh ASTM)

##### **Eluentes:**

$CHCl_3$ , 50 ml

$CHCl_3:MeOH(1:20)$ , 20 ml

$CHCl_3:MeOH(1:25)$ , 25 ml

$EtOH:MeOH(1:10)$ , 20 ml

#### **Total de fracciones eluídas**

Se recogieron 08 fracciones de 10 ml cada una.

#### **Dimensión de columna:**

20 cm de long. x 1.5 cm de diámetro

#### **Numero de columnas cromatográficas corridas**

Se corrieron 10 columnas cromatográficas

#### **Resultados:**

Los resultados del análisis (CCD), de las fracciones **eluídas** en la **cromatografía** de columna (CC), se muestran en la tabla N°11.

### **iv. Recristalización**

El contenido de la fracción N°7, (65 mg polvo fino amarillento), se disolvió en 20 ml de **EtOH** y se calentó en un "baño María", hasta disolución completa, se filtró a fin de eliminar pequeñas impurezas, recibiendo-se el filtrado en un vaso y dejándose evaporar el solvente al medio ambiente. A este compuesto (polvo fino amarillento), se le llamó M6.



#### 4. IDENTIFICACION (CARACTERIZACION) DEL COMPUESTO M6

##### i. Métodos clásicos:

- Estado físico: color amarillo pálido, polvo fino inodoro.
- Punto de fusión: indefinido se descompone a 160-161°C
- Solubilidad: Insoluble en agua y éter de petróleo, escasamente soluble en MeOH, EtOH y n-butanol.

Se hicieron ensayos adicionales de solubilidad (específicamente para flavonoides), los cuales orientaron a determinar la presencia de sustituyentes como -OH y -OCH<sub>3</sub> en los anillos A, B y C de un flavonoide (29).

Los resultados se resumen en la tabla N°12.

**TABLA N°12 : Ensayos de solubilidad del compuesto M6**

TIPO DE SUSTITUYENTE		SOLUBILIDAD EN SOLUCION			
-OH	-OCH <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub> sat.	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2N	NaOH 2N	HCl 12N
3, 5, 3 <sup>1</sup> , 4	7	-	+s	+s	-
3, 5, 4'	7, 3	-	+s	+s	-

donde: "(-)", significa insoluble y "(+s)", muy soluble.

Nota : Después de un cierto tiempo la muestra se torno insoluble en casi todos los solventes (se **polimerizó**).

- Reacciones químicas características (29), (30).

Se hicieron ensayos químicos específicos, cuyos resultados se resumen en la tabla N 13. La preparación de los reactivos, se detalla en el ANEXO N°1.

##### ii. Métodos Espectroscópicos.

Al compuesto M6 se le tomaron los espectros de UV-Visible (Fig. 19a, 19b) e IR (Fig. 20).

### 3.3 ESPECIE GIGARTINA CHAMISSOI (ALGA MARINA ROJA)

#### 3.3.1 COLECCION DEL MATERIAL.

El material fue colectado en los peñascos y riscos de las costas de Ancón-Perú. La planta fue lavada con agua de caño, secada durante varios días de sol y pulverizada.

Estas algas son utilizadas en la alimentación del poblador costeño.

#### 3.3.2 ESTUDIO DE COMPUESTOS ORGANICOS-IDENTIFICACION SISTEMATICA

Se maceraron 150 g de algas en 300 ml de EtOH durante 15 días, luego se hicieron estudios de cromatografía de capa delgada, empleando dicloruro de metileno como sistema de elución, detectándose un gran número de componentes orgánicos observados a simple vista y revelados con luz UV.

Por otra parte en un primer ensayo con acetato de sodio (1.5 g en 300 ml de agua), se detectó un gran contenido de carrageno, ficocoloide de importancia económica industrial.

#### A. ESTUDIO DE FICOCOLOIDES : EL CARRAGENO

##### 1. EXTRACCION DEL CARRAGENO (31)

Se utilizó alga secada en una corriente de aire a 25 °C durante 8 horas, con un contenido de 12 % de Humedad.

Se tomó 10 g de alga seca pulverizada y se agregó una solución de acetato de sodio (1.5 g en 300 ml de agua), agitándose durante dos horas a una temperatura de 80°C. Se filtró en caliente, extrayéndose dos veces el mismo residuo con igual volumen de solución de acetato de sodio.

Después de este proceso se secó y se pesó el residuo (6 g).

Todas las filtraciones se dializaron en una solución de acetato de sodio acuoso al 0.1 % durante 24 horas. La solución restante después del proceso de diálisis (fuertemente coloreada), se calentó a 80 °C, agregándose 05 g de carbón activado, agitándose y filtrándose.

Al filtrado se agregó una solución de cloruro de potasio (40 g en 200 ml de agua) dejándose enfriar lentamente en un baño de hielo.

El precipitado gelatinoso dispersado en acetato de sodio acuoso (200 ml al 1 %) se separó y se disolvió con 200 ml de solución de acetato de sodio, se calentó a 80 °C, se agregó carbón activado y se filtró. El filtrado se trató con cloruro de potasio (40 g con 200 ml de agua) repitiéndose el proceso descrito anteriormente, dispersándose el precipitado en agua y dializándose en acetato de sodio hasta disolverse el precipitado.

Dicha solución se vertió sobre etanol saturado con acetato sódico (115 ml), recogién-dose el precipitado, el cual se lavó en etanol acuoso al 85 %, y con alcohol absoluto y se dejó secar en una temperatura controlada de 40 °C. Obteniéndose 0.64 g de un polvo blanquecino (**carrageno**).

El proceso de extracción se esquematiza en la Fig. 21.

## 2. PROPIEDADES FISICAS DEL CARRAGENO (31)

Se hicieron ensayos de las principales propiedades del **carrageno** tales como:

### a) SOLUBILIDAD

Para los estudios de solubilidad, se utilizó solventes usados en la línea de alimentos tales como: agua fría, caliente, leche fría, leche fría con **pirofosfato tetrasódico**, soluciones concentradas de azúcar y sal.

Los resultados fueron los siguientes:

agua caliente : soluble a 80°C

agua fría : soluble con adición de pequeña cantidad de Azúcar.

leche caliente : soluble

leche fría : insoluble

leche fría con **pirofosfato tetrasódico** : se observó espesamiento o **gelificación**.

Sol. caliente concentrada de azúcar es soluble.

Sol. fría concentrada de azúcar : es insoluble.

Sol. caliente concentrada de sal : es insoluble.

**Sol. fría** concentrada de sal : es insoluble.

Se tomaron muestras de referencia tales como los **carragenatos** de potasio observándose que no son completamente solubles en agua fría por lo que para solubilizarlo completamente se requería de un calentamiento. También se observó que son **dispersables** en glicerina, viéndose así favorecida la solubilidad en agua.

El grado de hidratación fue afectado por la temperatura, agitación, pH y presencia de otros **solutos**.

#### **b) VALOR DE pH (31) .**

El pH de la solución al 1.5 % a 20 °C = 7.5

El pH de la solución al 0.1. % a 20 °C = 7.8

Se agregó **HCl conc.** y se observó que el **carrageno** se solubiliza.

Cuando se agregó **NaOH** diluido, **pH > 7** se observó que la viscosidad no sufría modificación hasta **pH = 11**, a pH superiores, se observó la disminución de la viscosidad. El **carrageno** se hirvió en medio neutro, durante varias horas, observándose la conservación de su estabilidad.

#### **c) FUERZA DE GEL O GELIFICACION (32)**

Para medir la fuerza de **gelificación**: se hizo el ensayo con diferentes iones, tales como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ , observándose mayor fuerza de **gelificación** con los iones  $K^+$ , no se observó **gelificación** con los iones  $Na^+$  y  $Ca^{++}$ . El tipo de gel que se formó con los iones de  $Ca^{++}$  fue frágil con sinéresis.

#### **d) VISCOSIDAD (32)**

El **carrageno** es insoluble en agua fría, cuando se le adiciona este líquido, se forma una especie de esponja, motivo por el cual se calentó hasta 70°C, para lograr la solubilidad completa; la solución resultante exhibía una viscosidad baja: por ejemplo, para la concentración de 1.5 % a 75°C la viscosidad fue 50 **cps**.

## B. MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Con el objeto de conocer un tipo de compuestos orgánicos, se llevó a cabo el análisis cualitativo, siguiendo la marcha **fitoquímica** de **Rondine Cousio** (27), cuyo proceso se esquematiza en la Fig. 22. Cuyos resultados fueron:

### **FRACCION A:**

Dio negativo a la reacción de la **ninhidrina**, y **FeCl<sub>3</sub>**, lo que indica la ausencia de grupos **aminos** y **fenólicos** libres.

### **FRACCION B:**

Dio positiva a la reacción de **Lieberman Burchard**, lo que indica la presencia de **triterpenos** y/o esteroides.

### **FRACCIONES C, D, y E:**

Dieron resultados negativo a la reacción de **Shinoda**, lo que indica la ausencia de **flavonoides**.

**REACCIONES ADICIONALES:** en las fracciones A y B

### **Test de alcaloides:**

Dió resultado negativo a los test de **Dragendorff** y **Mayer**.

### **Test de Saponinas:**

Dió resultado positivo a la reacción de la espuma y al test de **Lieberman Burchard**. Lo que indica la presencia de **saponinas esteroidales** ó **triterpenoidales**.

**C. EXTRACCION, SEPARACION, PURIFICACION E IDENTIFICACION DE COMPUESTOS ORGANICOS DE GIGARTINA CHAMISSOI.**

**1. EXTRACCION DE COMPUESTOS ORGANICOS (33)**

En 350 g de alga seca se realizó una extracción en un equipo **soxhlet**, utilizando **EtOH** durante 40 horas (el proceso se repitió hasta extraer 1 kg de alga), luego se filtró y se concentró, obteniéndose un residuo gomoso (54 g) de color verde oscuro.

Se tomó 50 g de residuo gomoso y se sometió a un proceso de saponificación con 300 ml de **KOH** al 50% en **EtOH**, manteniéndose en reflujo el sistema durante 2 horas, hasta observarse el cambio en el color de la solución (marrón oscuro). El exceso de base se neutralizó con **HCl 2N**, posteriormente se filtró para separar las sustancias **saponificables** (precipitado blanquecino) de las **insaponificables** (líquido marrón), seguidamente se realizó una extracción con éter de petróleo (40-60°C), obteniéndose una solución anaranjada amarillenta, la cual se concentró y se observó una mezcla de diminutos cristales con una sustancia resinosa amarillenta (extracto "G").

El esquema de este proceso, se observa en la Fig. 23.

**2. SEPARACION Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS EN EL EXTRACTO G.**

El extracto G (muy soluble en éter de petróleo), se purificó por **cromatografía** de capa delgada **CCD** y **cromatografía** de columna **CC**.

**a) CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA CCD**

**Condiciones de trabajo**

**Muestra:**

Extracto "G" (mezcla de diminutos cristales con jarabe amarillento).

**Adsorbente :**

Se utilizó "**cromatofolios**" tipo **GF 254 Merck** con revelador **UV**.

**Eluentes:**

- i . éter de Petroleo: n-hexano(30:1)
- ii . éter de Petroleo: n-hexano(1:1)
- iii. n-hexano:CHCl<sub>3</sub>(30:1)
- iv . n-hexano:CHCl<sub>3</sub>(15:1)

**Reveladores:**

Vapores de Iodo y luz UV.

**Resultados:**

- i. El mejor sistema de elución fue: n-hexano:CHCl<sub>3</sub> (30:1), en donde se observó mejor separación de las manchas. Se observó poca cantidad de manchas coloreadas en comparación con las manchas incoloras (vistas con luz UV).
- ii. El cromatograma visto con luz UV, presentaba 04 manchas, de color azul siendo una de ellas en mayor proporción ( $R_f=0.82$ ).

**b) CROMATOGRAFIA EN COLUMNA CC****Condiciones de trabajo****Muestra:**

Se utilizaron 2 g de extracto "G"

**Adsorbente:**

60 g de silicagel

**Eluentes:**

n-hexano ;150 ml  
 éter de petroleo:n-hexano (30:1); 150 ml  
 éter de petroleo:n-hexano (15:1); 150 ml  
 n-hexano:CHCl<sub>3</sub>(30:1); 150 ml

**Fracciones eluidas:**

Se recogieron 06 fracciones de 80 ml cada una.

**Dimensión de columna:**

30 cm de long. x 1.5 cm de diámetro.

**Número de columnas cromatográficas corridas:**

Se corrieron 06 columnas cromatográficas.

**Resultados:**

En las 06 fracciones, se hizo un estudio de cromatografía de capa delgada CCD, encontrándose los sistemas óptimos para posteriores separaciones, cuyos resultados se muestran en la tabla N°14.

- i. La fracción N°1, presentaba 04 manchas, una de ellas en mayor proporción ( $R_f = 0.72$ ). Al evaporarse totalmente el solvente se observó un sólido blanco cristalino adherido en las paredes del vaso.
- ii. La fracción N°4, presentaba 03 manchas, una de ellas en mayor proporción ( $R_f = 0.69$ ) y los otros dos en menor proporción, con valores de  $R_f$  muy cercanos.

**Observación:**

Se volvió a recromatografiar las fracciones: N°1 y 4, de acuerdo a las siguientes condiciones:

**b.1 Cromatografía de columna CC de la fracción N°1****Condiciones de trabajo****Muestra:**

300 mg de muestra (fracción N°1)

**Adsorbente:**

Se utilizó 20 g de silicagel

**Eluentes:**

n-hexano ; 50 ml  
éter de petróleo:n-hexano(30:1); 50 ml  
n-hexano : tolueno (15:1); 50 ml

**Fracciones eluidas:**

Se recogieron 06 fracciones de 20 ml cada una.



**Dimensión de columna:**

20 cm de long.x 0.5 cm de diámetro

**Número de columnas cromatográficas corridas:**

06 columnas cromatográficas.

**Resultados:**

- i. Después de evaporarse totalmente el solvente en la primera fracción, se observó gran cantidad de cristales de color blanco cristalino, se lavó con 20 ml de acetona helada. A estos cristales puros se les llamó G1.
- ii. En las fracciones restantes no se pudo aislar otros compuestos debido a la poca cantidad y por tener valores de  $R_f$  muy cercanos.

**b.2 CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA PREPARATIVA CCDP (fracción N° 4)****Condiciones de trabajo****Muestra:**

Se utilizaron las siguientes cantidades de muestra (fracción N° 4)

- i . w1. (150 mg)
- ii . w2. (205 mg)
- iii. w3. (183 mg)
- iv . w4. (192 mg)
- v . w5. (210 mg)
- vi . w6. (208 mg)

**Adsorbente**

Se usaron placas de 20 x 20 cm, con un espesor de 0.75 mm de silicagel tipo Gf 254 Merck, con revelador UV.

**Eluente**

Se utilizó el sistema n-hexano :  $\text{CHCl}_3$ , (30:1)

**Número de placas cromatográficas corridas**

06 placas cromatográficas

**Revelador**

Se utilizó una lámpara UV (366 nm)

**Solvente usado para extraer el compuesto de la silicagel**

Se utilizó la mezcla  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (1:1)

**Resultados**

- i. Se separó el compuesto de mayor proporción ( $R_f = 0.81$ ). Después de evaporarse totalmente el solvente se observó la formación de unos cristales de forma monoclinica, a este compuesto puro se le llamó G2.
- ii. También se aisló una pequeña cantidad de un compuesto con un valor de  $R_f = 0.79$ . A este compuesto puro de color blanquecino, se le llamó G3.

**3. ENSAYOS CARACTERISTICOS DE LOS COMPUESTOS: G1, G2 Y G3****A. ENSAYO CARACTERISTICO DEL COMPUESTO G1****1. Métodos clásicos**

- a) **Estado físico**  
Sólido de color blanco cristalino, altamente higroscópico.
- b) **Punto de fusión:**  
mayor de  $180^\circ\text{C}$
- c) **Estabilidad**  
Es muy estable a la luz solar y al medio ambiente.
- d) **Solubilidad**  
Es muy soluble en éter de petróleo y n-hexano, parcialmente soluble en  $\text{CHCl}_3$ , acetona, acetato de etilo, e insoluble en MeOH.
- e) **Comportamiento cromatográfico**  
= 0.49 en  $\text{CHCl}_3$   
= 0.61 en  $\text{CHCl}_3$  : MeOH(20:1)

## 2. Métodos espectroscópicos

Al compuesto **G1**, se le tomaron sus espectros de IR (Fig. 24a) y <sup>1</sup>H-RMN (Fig. 25)

## B. ENSAYOS CARACTERISTICOS DEL COMPUESTO G2

### 1. Métodos clásicos

- a) **Estado físico**  
Cristales de color blanco, monoclinicos.
- b) **Punto de fusión**  
Mayor de 140 C (en este punto se descompone)
- c) **Estabilidad**  
Es muy estable a la luz solar
- d) **Solubilidad**  
  
Es soluble en n- hexano, etér de petróleo, parcialmente soluble en acetona.
- e) **Comportamiento cromatográfico**  
  
R<sub>f</sub> = 0.68 en n-hexano: acetona (1:10)  
R<sub>f</sub> = 0.72 en n-hexano: acetona (1:30)
- f) **Reacciones químicas características.**  
  
Se hicieron algunos ensayos característicos cuyos resultados fueron negativos.

### 2. Métodos espectroscópicos

Al compuesto **G2**, se le tomaron sus espectros de IR (Fig. 26) y HRMN (Fig. 27a).

**C. ENSAYOS CARACTERISTICOS DEL COMPUESTO G3.****1. Métodos clásicos****a) Estado físico**

Cristales de color blanco brillante, monoclinicos.

**b) Punto de Fusión**

212°C

**c) Estabilidad**

Es muy estable a la luz solar.

**d) Solubilidad**

Es soluble en n-hexano, éter de petróleo, acetona, cloroformo, parcialmente soluble en EtOH y MeOH.

**e) Comportamiento cromatográfico**

$R_f = 0.45$  en n-hexano:acetona  
(1:10)

$= 0.72$  en n-hexano:acetona  
(1:30)

**f) Reacciones químicas características (29), (30)**

Se hicieron algunos ensayos característicos cuyos resultados se resumen en la tabla N°15.

La preparación de los reactivos se detalla en el ANEXO N°2.

**2. Métodos espectroscópicos**

Al compuesto G3, se le tomaron sus espectros de IR (Fig. 28) y HRMN (Fig. 29a).

## ESPECIE PETEROSIPHONIA DENDROIDEA (ALGA MARINA ROJA)

### 3.4.1 COLECCION DEL MATERIAL

El material fue colectado en las costas de **Pu-cusana** Islas Galápagos - Perú. La planta fue lavada con agua helada, secada durante varios días de sol y pulverizada.

Esta especie se caracteriza por su fácil descomposición, y cuando está seca presenta un olor penetrante.

### 3.4.2 ESTUDIO DE COMPUESTOS ORGANICOS: IDENTIFICACIÓN SISTEMÁTICA

Se maceraron 350 g de algas en **EtOH** (15 días), en el concentrado se hicieron estudios de **cromatografía** de capa delgada **CCD**, empleando como sistema de **elución dicloruro de metileno**.

De acuerdo a los resultados **cromatográficos** se detectaron un gran número de compuestos coloreados e incoloros, revelados con vapores de Iodo y luz **UV**.

Por otra parte al hacer extracciones con agua se observó un gran contenido de **agar-agar**, **ficocoloide** de importancia económica industrial.

## A. ESTUDIO DE FICOCOLOIDES: AGAR - AGAR

### 1. EXTRACCION DEL AGAR-AGAR (32)

El alga seca finamente dividida (100 g), se extrajo con 2 l de agua a 100 °C durante 02 horas.

El extracto aun caliente se filtró a través de un tejido sedoso hasta obtenerse una solución clara. Esta solución se dejó enfriar, observándose la formación de un gel, el cual se introdujo en un congelador (24 horas).

El gel congelado se colocó en un tejido sedoso para descongelarse y eliminar los restos de agua retenida. El residuo se volvió a disolver en 2 l de agua a 90°C y se repitió en esta solución el proceso de congelación y descongelación (tres veces). El residuo final se lavó con abundante agua fría, después con etanol y acetona, se seco al medio ambiente obteniéndose 3.12 g de un polvo fino de color ligeramente crema (**agar-agar**).

El proceso de extracción se esquematiza en la fig. N°30.

## 2. PROPIEDADES FISICAS DEL AGAR-AGAR

### 2.1 PODER O FUERZA GELIFICANTE DEL AGAR-AGAR (32)

La fuerza **gelificante** se determinó colocando una solución de **agar** al 1.5% en una pequeña copa y se dejó permanecer toda la noche a temperatura ambiente, sobre la superficie del **agar**, se colocó un peso de 100 g de forma cilíndrica con 1 cm' de área observándose que la superficie no se rompía (por la calidad se denominó, **agar** de grado N°3). La calidad de **agar**, que soportaba 200 g se marcó con el grado N°2 y el que soportaba 300 g se marcó con el grado N°1. Adicionalmente se hizo el ensayo de proteínas y se determinó el porcentaje de compuestos insolubles.

#### CARACTERISTICAS DE LA CALIDAD DE LOS 3 GRADOS DE AGAR

GRADO DEL GEL	FUERZA MAXIMA gf	PROTEINA %	C.INSOLUBLES %
1	300	1.7	2.5
2	200	2.2	3.3
3	100	3.1	4.1

### 2.2 EFECTO DE ADICION DE KCl EN LAS SOLUCIONES DE AGAR - AGAR

En diferentes' concentraciones de soluciones de **agar - agar** (extractos de **P.dendroidea**) se agregó soluciones de **KCl** en variadas concentraciones a fin de observar los efectos de poder de **gelificación** y temperatura. Los resultados del efecto de la adición de **KCl**, se muestran en la tabla N°16. Adicionalmente se observaron otros efectos tales como:

#### a) EFECTO SOBRE LA VISCOSIDAD (32)

El efecto de las concentraciones de **KCl** tiene influencia sobre la viscosidad de los extractos de **P. dendroidea**. Los resultados se observan en el gráfico "A", donde se hace la comparación con el **Agar** de **Gelidium J.**(muestra de referencia) y agua destilada.

**b) EFECTO EN LAS TEMPERATURAS DE GELIFICACION Y FUSION DEL AGAR (32)**

La temperatura de gelificación y de fusión, así como la medida de histéresis, de una solución de agar de *P.dendroidea* al 1%, y sus cambios de comportamiento por la presencia de KCl a varias concentraciones están representadas en el gráfico "B". Temperatura en °C vs porcentaje de KCl.

La diferencia entre la temperatura de gelificación y la fusión del gel (rango o grado de histéresis), determinado por el KCl es alrededor de 16°C, para todas las concentraciones de la sal y del extracto (agar-agar).

**2.3 HINCHAMIENTO DEL AGAR ( SWELLING ) (32)**

El agar-agar (es insoluble en agua fría), cuando está seco absorbe agua en grandes cantidades, acompañado de hinchazón. La cantidad de agua absorbida en equilibrio es una variable que depende de una variedad de factores, incluyendo el contenido de humedad original de la muestra de agar-agar seco.

La absorción total es progresivamente menor cuanto menos se acerca a cero la humedad original, los datos obtenidos experimentalmente se muestran en el gráfico "C". % de hinchamiento vs contenido de agua en mg de agua por g. de agar seco.

**2.4 FLOCULACION DEL AGAR (32) .**

Para efectuar la precipitación del agar, es necesario eliminar o neutralizar el factor que estabiliza la característica liofílica del coloide el cual determina la hidratación; según la eliminación de los cargas eléctricas de las partículas del agar.

El agar se precipitó tratando el gel fundido (50 ml) con un volumen igual de alcohol de 95%, también se hizo un ensayo similar añadiendo 1% de tanino. La precipitación por alcohol se usa para purificar y deshidratar el agar en escala comercial.

**B) MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR**

Se llevó a cabo un análisis cualitativo, siguiendo la marcha de **Rondine Cousio**. Cuyo proceso se esquematiza en la Fig. N°31.

En cada una de las fracciones, se hicieron ensayos químicos cuyos resultados fueron:

**FRACCION A:**

Dió resultado positivo a la reacción de la **ninhydrina** y a la reacción de **FeCl<sub>3</sub>**, lo que indica la presencia de los grupos: - NH<sub>2</sub> y fenoles libres.

**FRACCION B:**

Dió resultado positivo a la reacción de **Lieberman Burchard**, lo que indica la presencia de **triterpenos** y/o esteroides .

**FRACCIONES C , D y E :**

Dieron resultado negativo a la reacción de **Shinoda** indicando ausencia de **flavonoides**.

**REACCIONES ADICIONALES EN LAS FRACCIONES A Y B:****Test de alcaloides:**

Dió negativo a las reacciones de **Dragendorff** y **Mayer**, lo que indica la ausencia de alcaloides.

**Test de Saponinas:**

Dió positivo a la reacción de la espuma, lo que indica la presencia de **saponinas triterpenoidales** y/o **esteroidales**.



**C) EXTRACCION, SEPARACION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE COMPUESTOS ORGANICOS DE PETEROSIPHONIA DENDROIDEA**

**1. EXTRACCION DE COMPUESTOS ORGANICOS (28)**

350 g de alga seca y molida se colocaron en un extractor soxhlet, con éter de petróleo (40-60 C) (durante 100 horas). La solución etérea presentaba un color marrón **verduzco**. Luego se concentró en un **rotavapor** hasta la mitad del volumen (350 ml), posteriormente se realizó un proceso de extracción con **MeOH/H<sub>2</sub>O** al 70 %. La solución **metanólica** (color anaranjado intenso), se lavó con éter de **petroleo** para eliminar los restos de éter de **petroleo** y se agregó 50 ml de agua a la solución **metanólica**, observándose una turbidez blanquecina, seguidamente se realizó la extracción con cloroformo diferenciándose las dos fases por el color: amarillento (solución **metanólica**) y rojo vino (solución **clorofórmica**).

A la solución **clorofórmica** se agregó una pequeña cantidad de **Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro** para eliminar los restos acuosos, y se concentró en un rotavapor hasta obtenerse una mezcla **constituída** por cristales de color caramelo, cristales de color rojo violeta y una resina de color marrón (con un fuerte olor a **pinenos**). A esta mezcla se le denominó extracto "P".

El esquema de este proceso de extracción se muestra en la Fig. 32.

**2. SEPARACION Y PURIFICACION DEL EXTRACTO "P".**

El extracto "P" se purificó por cromatografía de capa delgada **CCD** y **cromatografía columna CC**.

**2.1 CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA CCD**

**Condiciones de trabajo**

**Muestra:**

Extracto "P"

**Adsorbente:**

Se utilizaron **cromatofolios** tipo **GF 254 Merck** con revelador **UV**.

**Eluente:**

Se **utilizaron** los siguientes sistemas:

- i . n-hexano:acetona (10:1)
- ii . n-hexano:acetona (8:1)
- iii. n-hexano:acetona (2:1)
- iv . n-hexano:acetona (1:1)

**Reveladores:**

Se utilizaron; vapores de Iodo y luz UV.

**Resultados**

- a) El mejor sistema **eluente** **fué: n-hexano:acetona** (4:1) en donde se observó mejor separación de las manchas.
- b) En el **cromatograma** se observó la presencia de dos compuestos en gran cantidad, cuyos valores de  $R_f$  fueron: 0.77 y 0.53.

**2.2 CROMATOGRAFIA DE COLUMNA cc (a)****Condiciones de trabajo****Muestra:**

Se tomó 02 g de extracto "P"

**Adsorbente:**

Se utilizó 60 g de **silicagel**

**Eluentes:**

n-hexano ; 100 ml  
 n-hexano : acetona (15:1) ; 80 ml  
 n-hexano : acetona (12:1) ; 50 ml  
 n-hexano : acetona ( 8:1) ; 50 ml  
 n-hexano : acetona ( 4:1) ; 50 ml  
 acetona : metano! (30:1) ; 50 ml  
 acetona : metano! (15:1) ; 50 ml

**Número de fracciones recogidas:**

08 fracciones de 50 ml cada una.

**Número de columnas cromatográficas corridas:**

se corrieron 10 columnas **cromatograficas**.

**Dimensión de la columna cromatográfica**

25 cm de long. x 1.5 cm de diámetro.

**Resultados**

Los resultados del análisis (CCD), de las fracciones **eluidas** en la **cromatografía** de columna (CC), se muestran en la tabla N°17.

- a) Las fracciones N°1 y 2 se caracterizaron por ser muy **sublimables** y presentar un olor a mentol y/o alcanfor intenso, estas fracciones, se volvieron a **recromatografiar** a fin de purificar.
- b) En la **CCD** de la fracción N°3 en el sistema **n-hexano:tol (1:1)**, se observó la presencia de 05 compuestos, inestables a la luz solar, excepto el compuesto con valor de  $R_f = 0.43$ .
- c) La fracción N°5, presentaba gran cantidad de cristales rojizos e incoloros, en la **CCD** con el sistema de **elución n-hexano: acetona (4:1)**, se observó la presencia de 04 compuestos, siendo más notoria la presencia de un compuesto rojizo con un valor de  $R. = 0.72$ .
- d) En la fracción N°6, se observaron cristales de color rojo-oscuro cubiertos por una resina, muy soluble en acetona.
- e) En la fracción N7 se observó la presencia de una sustancia de color marrón, muy soluble en **MeOH**.

### 2.3 PURIFICACION DEL COMPUESTO P1

Se juntaron las fracciones N°1 y 2 y se la llamó fracción "**M**" a la cual se **recromatografió**.

#### A) CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA CCD

##### Condiciones de trabajo

##### Muestra:

Fracción "M"

##### Adsorbente:

Cromatofolios tipo GF 254 Merck con revelador UV.

##### Eluentes :

Se utilizaron los siguientes sistemas:

<b>n-hexano</b>	tolueno (1:1)
<b>n-hexano</b>	tolueno (1:4)
<b>n-hexano</b>	acetona (20:1)
<b>n-hexano</b>	acetona (10:2)

**Reveladores:**

Vapores de Iodo y luz UV

**Resultados:**

- a) El mejor sistema eluyente fue **n-hexano:acetona** (10:2), en donde se observaron 04 manchas de color azul (vistos con luz UV).
- b) El compuesto de mayor proporción correspondía a un valor de  $R_f=0.57$  en el sistema **n-hexano:acetona** (10:2). Este compuesto es un poco volátil.
- c) Los compuestos con valores de  $R_f = 0.64$  y  $0.84$  eran extremadamente volátiles.

**B) CROMATOGRAFIA DE COLUMNA CC (b)****Condiciones de trabajo****Muestra :**

200 mg de muestra de la fracción

**Adsorbente:**

Se utilizó 30 g de silicagel

**Eluentes:**

n-hexano, 30 ml

n-hexano : tolueno (20:1), 20 ml

n-hexano : tolueno (15:1), 20 ml

n-hexano : tolueno (1:1), 20 ml

n-hexano : acetona (10:2), 20 ml

**Número de fracciones recogidas:**

06 fracciones de 10 ml cada una.

**Número de columnas cromatográficas corridas :**

06 columnas cromatográficas.

**Resultados**

- a) En las fracciones N°1, 2 y 3 se observaron restos de compuestos con fuerte olor a mentol los cuales se sublimaron con mucha facilidad.

b) En la fracción N°4, se observó la presencia de diminutos cristales, caracterizados por un olor aromático muy fuerte y fácilmente **sublimable**. A este compuesto puro se le llamó P1.

### C) ENSAYOS CARACTERISTICOS DEL COMPUESTO P1

#### 1. Métodos clásicos

##### Estado físico

Cristales monoclínicos.  
Color blanco  
Olor aromático fuerte

##### Punto de fusión

176 - 178 °C

##### Estabilidad

Se sublima con mucha facilidad

##### Solubilidad

Es soluble en éter de petróleo, n-hexano, CHCl<sub>3</sub> y Et<sub>2</sub>O.

#### 2. Métodos Espectroscópicos

Al compuesto P1, se le tomó sus espectros: Infrarrojo IR (Fig. 33a), y Resonancia Magnética Nuclear de protón <sup>1</sup>H-RMN (Fig.34).

### 2.4 PURIFICACION DEL COMPUESTO P2

Colorante rojo (Fracción N°5 de la CC(a))

#### a) Cromatografía de capa delgada preparativa CCDP

Condiciones de trabajo

Muestra :

Colorante rojizo.  
Se utilizaron las siguientes cantidades:

i . w1	( 250 mg)
ii . w2	( 258 mg)
iii. w3	( 309 mg)
iv . w4	( 296 mg)
v . w5	( 315 mg)
vi . w6	( 287 mg)

**Adsorbente:**

Placas de 20 x 20 cm' con un espesor de 0.75 mm de **silicagel** tipo G Merck.

**Eluente:**

Sistema **n-hexano**: acetona (4:1).

**Número de placas cromatograficas corridas:**

Se corrieron 12 placas **cromatográficas**.

**Revelador**

No se utilizó debido a que el compuesto era fuertemente coloreado.

**Solvente usado para extraer el compuesto de la silicagel:**

Se utilizó **CHCl<sub>3</sub>**: MeOH (1:1).

**Resultados**

Se aislaron unos cristales de color rojo-violeta, los cuales se lavaron con acetona helada, a estos cristales puros se les llamó P2.

**b) Ensayos característicos del compuesto P2****1. Métodos clásicos****Estado físico**

Cristales **monoclinicos**, de color rojo-violeta

**Punto de fusión**

Mayor de 215°C, a esta temperatura el compuesto empieza a descomponerse

**Estabilidad**

Es muy estable a la luz solar

### **Solubilidad**

Es insoluble en éter de petróleo, n-hexano, parcialmente soluble en Et<sub>2</sub>O, muy soluble en CHCl<sub>3</sub>, e insoluble en MeOH.

### **Comportamiento cromatográfico**

$R_f = 0.72$  n-hexano:acetona (4:1)  
 $R_f = 0.81$  n-hexano:acetona (1:1)  
 $R_f = 0.53$  n-hexano:acetona (3:1)

## **2. Métodos espectroscópicos**

Al compuesto P2 se le tomó sus espectros: Infrarrojo IR (Fig.35), y Resonancia Magnética Nuclear del protón <sup>1</sup>H-RMN (Fig.36) y Ultravioleta-visible (Fig.37a y 37b).

# IV. RESULTADOS Y DISCUSION

## 4.1 ESPECIE MACROCYSTIS PYRIFERA

### 4.1.1 METODOS DE ANALISIS DE COMPUESTOS INORGANICOS Y ORGANICOS EN MACROCYSTIS PYRIFERA.

#### A. ANALISIS DE COMPUESTOS INORGANICOS

Los contenidos determinados para los diferentes elementos y compuestos analizados en la parte experimental y descritos en 3.2.2, se ordenaron en tablas y se **graficaron** en función del tiempo de recolección de las respectivas muestras.

1. En la Tabla N°1 se presentan los resultados obtenidos en la determinación del contenido de la humedad remanente en la alga seca y molida que se utilizó para los análisis posteriores. La primera fila identifica la fecha de recolección, la segunda fila los resultados en las hojas, la tercera fila los resultados en los tallos y la cuarta fila, los resultados en los bulbos. Este conjunto de datos está **graficado** en la Fig.1. Los contenidos de humedad varían entre 4.15 y 7.84 %.
2. La determinación de las cenizas totales e insolubles, están ordenadas en la tabla N°2 y **graficadas** en la Figs. 2 a, 2 b. Los contenidos de cenizas totales varían entre 38.2% y 44.3 %, observándose una relativa constancia en las distintas estaciones. También es posible deducir contenidos mayores de cenizas totales en el período primaveral, setiembre del 1991 y el período de invierno, julio de 1992. El contenido de cenizas insolubles oscila entre 4.19% y 9.8%, se puede observar que a diferencia de los valores obtenidos en la determinación de cenizas totales, en este caso se aprecia una variación irregular en relación a la época de muestreo. La diferencia entre las cenizas totales y las insolubles da el contenido de cenizas solubles (34).
3. En la tabla N°3 están los resultados de los análisis de sodio y potasio y en la Figs. 3 a y 3 b, los gráficos correspondientes. Los contenidos de sodio varían entre 2.21 y 3.96 %, se observa que el contenido del sodio es mayor en los períodos de setiembre del 91 y julio de 1992, con relación a los períodos de verano (altas temperaturas).



En las hojas el contenido de sodio se mantiene más constante con respecto a las otras partes de la planta.

Los contenidos de potasio varían entre 11.3 y 14.7% . Existe una relación entre el porcentaje de potasio y sodio de 4.0 , que confirma la información general de concentración de potasio en las algas a pesar que en su medio natural, el sodio es su elemento principal (35). El contenido de potasio del mismo modo que el sodio, es mayor en los períodos primaverales e invernales.

4. Los análisis de calcio y magnesio están informados en la tabla N°4 y **graficados** en función del tiempo en las **Figs.4 a y 4 b**. El calcio varía entre 0.99 y 1.99 %, la variación estacional del porcentaje de calcio es irregular, siendo más abundante en los meses de Abril. Los contenidos de magnesio son más constantes, varían entre 0.56 y 0.80 %, la relación entre calcio y magnesio es aproximadamente 1.5.
5. En la tabla N°5 figuran los resultados de los análisis de los cloruros y sulfatos y los gráficos corresponden a las Figs. 5 a y 5 b respectivamente. Para los cloruros, los valores obtenidos varían entre 1.71 y 11.71 %, se observa que los mayores contenidos de cloruros se presentan en los períodos de primavera y el invierno. Los contenidos de sulfatos presentan un rango de variación constante entre 3.11 y 7.10 %. Este contenido aumenta regularmente desde setiembre de 1991 hasta Julio de 1992.
6. En la tabla N°6 figuran los resultados de los análisis de hierro y cobre y los gráficos correspondientes son las Figs. 6 a y 6 b respectivamente. Los valores de cobre varían entre 11 y 110 ppm, estas bajas concentraciones y su variación sin patrón de referencia no guarda relación con los elementos mencionados anteriormente. Los contenidos de hierro son levemente superiores a los de cobre, variando entre 31 y 99 ppm, en este caso se puede apreciar un mayor contenido de hierro en los períodos primaverales e invernales.
7. Los resultados de los análisis de N, y fósforo figuran en la tabla N°7 y están **graficados** en las Figs 7 a y 7 b respectivamente. En el caso del N, su contenido es constante a través del tiempo, aunque se aprecia una disminución gradual en el curso del año.

Esta disminución se relaciona con la poca cantidad de **nutrientes** en el medio. El contenido de N, varía entre 1.40 y 2.70 %. Todo este N, convertido en proteínas es equivalente a un contenido proteínico equivalente a 9.62 % (5).

Con respecto al fósforo, éste varía en una forma muy irregular. En la Fig. 7 b se observa la variación del fósforo entre 0.32 y 0.72.

## B. ANALISIS DE COMPUESTOS ORGANICOS

1. En la tabla N°8 están ordenados los análisis del contenido de ácido **algínico** y en la fig. 8 a están los gráficos correspondientes. Los porcentajes de ácido **algínico** varían entre 14.90 y 20.70 %, el análisis de datos muestra una disminución suave pero constante en el contenido de ácido **algínico**, de igual forma que los contenidos de **laminarina**, tanto en las hojas como en los tallos. Sin embargo el contenido de ácido **algínico** en los bulbos varía en forma irregular siendo más abundante en el período Diciembre - Abril.

2. En la tabla N°9 están ordenados los resultados de los análisis del contenido de **manitol** y **laminarina** y en las Figs. 8 b y 9 a, están los gráficos correspondientes. El contenido de **laminarina** varía entre 3.71 y 8.21 %, se aprecia que este contenido disminuye en forma regular a lo largo de todo el año.

El contenido de **manitol** varía entre 0.73 y 2.12, en este caso se observa que en los períodos de primavera e invierno el contenido de **manitol** es menor que en los períodos de verano. El contenido de **manitol** es levemente mayor en los tallos.

3. En la tabla N°10 se encuentran ordenados los datos de la suma de los contenidos de **manitol**, **laminarina** y ácido **algínico** en las diferentes fechas de muestreo, y la Fig. 9 b, contiene los porcentajes comparados de estos 3 componentes de la planta .

En la planta completa y en los tallos se observa una disminución constante del total de estos 3 componentes, mientras que en los bulbos la variación es más irregular.

Convirtiendo todo el nitrógeno a **proteína**, el contenido de materia orgánica varía aproximadamente entre 30 y 45 %, si sumamos a esta cifra el peso de las cenizas totales, completamos aproximadamente entre 70 y 85 % de la planta, el 15 a 30 % restante corresponde; a lípidos hidrocarburos, azúcares solubles y otros (principios activos, que constituyen un porcentaje mínimo).

#### 4.1.2 ESTUDIO DE COLOIDES EN MACROCYSTIS PYRIFERA

##### A. ENSAYO DE RECONOCIMIENTO DEL ACIDO ALGINICO EN LAS HOJAS DE LA MACROCYSTIS PYRIFERA (36).

El resultado del ensayo preliminar para el reconocimiento del ácido **algínico** se hizo con el Test de **Scott**, el cual consistió en utilizar HCl 0.2 N para causar la hidrólisis macerando los **polisacáridos** presentes en la planta y luego se utilizó **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**, para solubilizar al ácido **algínico**, el cual por intercambio **iónico** se transformó en **alginato** de sodio (muy soluble en agua) y se adicionó HCl 1N a fin de regenerar el ácido **algínico**, se adicionó 5 ml de 2.5% de **cetilpiridina**, formándose un complejo amarillento de **cetilpiridina** del ácido **algínico**. El ensayo de **Scott** se hizo en las diferentes partes de la planta obteniéndose resultados muy variados, resaltando la abundancia de precipitado amarillento de **cetilpiridina** del ácido **algínico** en las hojas de la *M.pyrifera*.

De acuerdo a los ensayos efectuados existe una gran variabilidad en la calidad y cantidad de **algina** (ácido **algínico** y sus derivados), las cuales dependen de la composición química en las diferentes partes de la planta (hojas, tallos y bulbos), así como la localidad de cosecha y la estación de recolección.

Para obtener mayor rendimiento, en la extracción del ácido **algínico** se escogió las hojas de la *M. pyrifera* recolectadas en el mes de invierno en Pucusana (Perú) de 1991.

##### B. RESULTADO DE EXTRACCION DEL ACIDO ALGINICO (37)

De los diferentes métodos de extracción ensayados el más óptimo fue el método de **Haug**, en donde se hicieron algunas modificaciones adecuadas a nuestro medio, obteniéndose un rendimiento del 15.8%. Este método se basó en transformar el **alginato** insoluble que se encuentra en la planta, en un **alginato** soluble (**alginato** de sodio), regenerándose el ácido **algínico** por adición de HCl 2N.

##### 1. INFLUENCIA DE PARAMETROS FISICOS EN EL RENDIMIENTO DE ACIDO ALGINICO (8)

EL efecto de la temperatura durante la extracción del ácido **algínico** tiene mucha influencia en el rendimiento, de acuerdo a los datos experimentales, descritos en: 3.2.3, se observa que a 60 °C, se obtuvo 13.5% de rendimiento, a 70 °C,

15.8% ; aparentemente, a 70 °C se obtuvo mejores resultados, sin embargo hay que tener en cuenta la influencia del efecto de la temperatura sobre la viscosidad de sus respectivas sales (**algina-tos**), debido a que a mayor temperatura, va disminuyendo la viscosidad, considerándose que por cada grado de aumento de temperatura, disminuye un 2.5 % de la viscosidad del producto, (esta disminución es reversible), motivo por el cual se escogió como temperatura óptima de extracción, a los 60 °C, también puede observarse que la viscosidad puede decrecer, debido a una parcial **depólimerización** de la molécula del ácido **algínico**.

## 2. OBSERVACIONES Y DISCUSIONES—PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACIDO ALGINICO.

- a) En la primera lixiviación se observó un líquido de color pardo verdoso, de aspecto viscoso.

La reacción que se llevó a cabo fue, la transformación del ácido **algínico** que se encuentra en forma de sales de calcio soluble e insoluble a sales de **Na** la cual es soluble en agua. Siendo la reacción química:



Mientras más estable e insoluble sea **CaX**, la reacción tenderá hacia la derecha (32), aumentando por lo tanto el porcentaje de extracción.

Como solvente de extracción se utilizó el **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** al 4 %. En relación al peso del alga de 3 a 1.

- b) En la segunda lixiviación las aguas presentaron un color pardo rojizo, más viscoso que la anterior, esto se debía a la mayor concentración de **alginato** de sodio en la solución.
- c) En cuanto a las características del producto final se pudo apreciar que a 60°C el color de la solución de extracción y del producto era pardo amarillento mientras que a mayor temperatura presentaba un color pardo oscuro.
- d) El **hipoclorito** de sodio como **blanquedor** tiene una influencia negativa en el rendimiento del producto, debido a que solubiliza al ácido **algínico**.

- e) El mejor blanqueado se obtuvo cuando a la solución caliente se le añadió carbón activado al 2 % a la temperatura de 60 °C, agitándose **homogeneamente** de 5 a 7 minutos.
- f) Para precipitar el ácido **algínico** se debe agregar cuidadosamente el HCl 2N hasta regular un pH = 3, el exceso de ácido provoca una descomposición del **ác.algínico** formado, observándose desprendimiento de CO<sub>2</sub>.
- g) Para lavar el ácido **algínico** se debe usar alcohol absoluto, debido a que se logra mejores condiciones de secado al medio ambiente.  
Cuando se lava con agua destilada y se lleva a secar en el horno se torna muy duro, semejante a una goma de consistencia vidriosa.

### 3. **CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DEL ACIDO ALGINICO (8), (32)**

- a) El ácido **algínico** es insoluble en agua fría y poco soluble en agua hirviendo, es insoluble en alcohol, éter etílico y glicerol.
- b) Cuando está moderadamente húmedo absorbe de 10 a 20 veces el agua en relación a su peso. Cuando se seca se endurece mucho, se vuelve córneo y resistente a los disolventes.
- c) No reduce la solución de **Fehling**, pero forma rápidamente sustancias reductoras si se hierve con ácido diluido a 100°C.
- d) Su actividad óptica es muy intensa, se ha hallado valores de poder rotatorio  $[\alpha]_D^{20} = 132.6$  y  $169.2$ .
- e) El ácido **algínico** es un ácido débil pero su constante de ionización es suficiente para desprender dióxido de carbono de las soluciones de carbonatos. Su equivalente teórico es 176 (32).
- f) Humedad: En condiciones normales el ácido **algínico** es muy higroscópico, presenta una relación de 10 a 25 % de humedad referida a la materia seca.

- g) Intercambio iónico: el ácido algínico forma sales hidrosolubles con cationes monovalentes (Na, K); y con los divalentes, excepto el magnesio (Mg) forma sales insolubles comportándose como resinas típicas de intercambio iónico.

#### 4. CARACTERIZACION DEL ACIDO ALGINICO

Se caracterizó al ácido algínico de acuerdo a las especificaciones técnicas (22).

##### ESPECIFICACIONES DEL ACIDO ALGINICO

- a) pH de las sol. acuosas = 3.5
- b) Viscosidad de una sol. acuosa al 1% en peso = 1 - 100 poises.
- c) Contenido de agua = 5 - 20 %
- d) Tamaño de partículas = 10-200 mallas.
- e) Color = blanco a pardo oscuro.

##### DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS

- a) pH de las soluciones ac. = 4.5
- b) Viscosidad de una sol. acuosa al 1% en peso = 99 poises.
- c) Contenido de agua = 20 %
- d) Tamaño de partículas = 125 um.
- e) Color = blanco crema

Respecto al valor de pH = 4.5, este valor es bueno porque en la Industria se emplea el ácido algínico con un intervalo de pH de 4 a 10. Cuando el pH es menor que 4, el ácido algínico tiende a precipitarse y si pasa de 10 pierde rápidamente su viscosidad y se vuelve inestable (32).

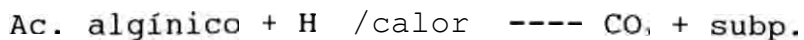
De acuerdo a los demás parámetros físicos del ácido algínico obtenido se observa que cumple con las especificaciones técnicas.

#### 5. RESULTADOS - DETERMINACION DE LA PUREZA DEL ACIDO ALGINICO (23).

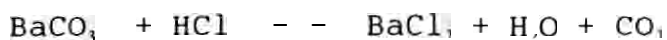
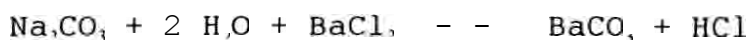
Para determinar la pureza del ácido algínico, se utilizó un método de **descarboxiliación**, tomando como referencia a una muestra patrón de ácido algínico.

Los resultados se calcularon en base a las reacciones químicas siguientes :

i) Proceso de **descarboxilación** del **ac. algínico**



ii) Reacciones posteriores



iii) El  $\text{CO}_2$  liberado del proceso de la **descarboxilación** del ácido **algínico**, reaccionó con parte del **NaOH** 0.25 N, y el residuo básico no consumido, fue titulado con **HCl** 0.1 N. Y por diferencia se obtuvo el % de  $\text{CO}_2$  exacto en cada muestra, los cálculos se hicieron con la siguiente equivalencia.

**EQUIVALENCIA** : 1 ml de 0.25 N de **NaOH** consumido es equivalente a 5.5 mg de  $\text{CO}_2$ .  
Los resultados fueron los siguientes:

**% DE  $\text{CO}_2$  EN ACIDO ALGINICO**

Muestra patrón = 4 - 5 %

Muestra problema = 4.09 %

## C. DEGRADACION DEL ACIDO ALGINICO, COMPUESTO M4

### 1. Métodos clásicos

#### a) Métodos físicos

El compuesto M4, obtenido por proceso de degradación del ácido **algínico** como consecuencia de la maceración de alga fresca con **MeOH** en medio ácido y separado con **NaOH 1N**, es un polvo blanco, escasamente soluble en agua, **EtOH** y acetona.

#### b) Métodos Espectroscópicos

Al compuesto M4 se le tomó sus espectros de IR (Fig.12) , y <sup>1</sup>H-RMN (Figs.13, 14, 15)

##### b.1 Espectro de IR

El espectro IR (pastilla de KBr) Fig. 12, muestra las siguientes absorciones:

λ máx (cm )	Características
3300	vibración de -OH (banda ancha característica de ácidos carboxílicos)
2932 2903	estiramiento de C - H, de CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> .
1634	vibración de C = O
1074	vibración de C - O - C
1036	vibración de C - O
915	vibración del anillo <b>piranososa</b>
890	vibración de C - H (ecuatorial posición a y axial posición 13 )
778	vibración de anillo <b>piranososa</b> .

De acuerdo a los resultados del espectro IR, se observa la presencia de los siguientes grupos funcionales:

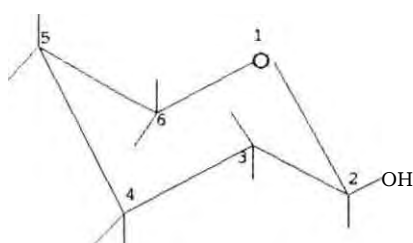


un grupo **carboxilo**  $-\text{COOH}$ , caracterizado por una banda ancha de absorción ubicado en  $3300\text{ cm}^{-1}$  (38), originado por la vibración del  $-\text{OH}$ ; un grupo funcional **ce-to**  $-\text{C}=\text{O}$  ubicado a  $1634\text{ cm}^{-1}$  (38); un grupo funcional  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  /enlace **glicosídico**) ubicado a  $1094\text{ cm}^{-1}$  (39), también se observa la presencia de un anillo **pirano** por las vibraciones que aparecen a  $915$  y  $778\text{ cm}^{-1}$  respectivamente (39).

De acuerdo a los resultados del espectro IR, el compuesto M4 es un posible carbohidrato.

Se hizo una investigación bibliográfica de espectros IR para carbohidratos, ácidos **urónicos** y compuestos afines (40), (el ácido **algínico** es una mezcla de ácidos **urónicos**); se encontró una vibración característica de un grupo  $-\text{OH}$  a  $3382\text{ cm}^{-1}$ , y vibraciones de  $\text{C}-\text{H}$  (del carbono **anomérico**), los cuales corresponden a  $1261\text{ cm}^{-1}$  y  $1116\text{ cm}^{-1}$  respectivamente (posiciones ecuatorial y axial), este dato se chequeo en el espectro, observándose una superposición con la señal del grupo  $-\text{OH}$  del ácido **carboxílico** y también se observaron las vibraciones características de  $\text{C}-\text{H}$  correspondientes a  $1261\text{ cm}^{-1}$  y  $1116\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

De acuerdo con estos datos las estructuras características serían las estructuras I y II.


 $^{1/6}$   
1'

OH

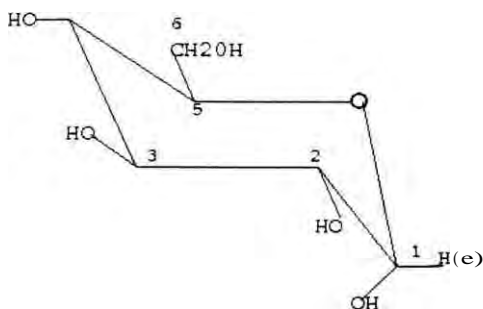
ESTRUCTURA I

ESTRUCTURA II

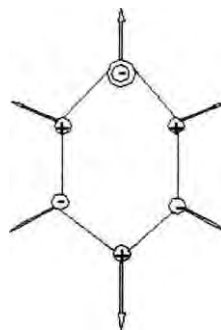
Para verificación, se determinó que la vibración a  $915\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del anillo para una a y B **piranosa**, indicando la

presencia de un carbono **anomérico** (40), las vibraciones en el rango 890 y 874  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden respectivamente a la vibraciones de  $\text{C}_1\text{-H}$  ecuatorial en azúcares a y  $\text{C}_1\text{-H}$  axial en azúcares B (**Fig.D**) y también hay una vibración en 778  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del anillo **piranosa** (**Fig.E**) (40).

De acuerdo a estos datos se propone que el compuesto M4 es una mezcla de 1:1 de los dos **anómeros** de un **monosacárido** ó un **disacárido**, lo cual indica que el ácido **algínico** (**polisacárido** de cadena lineal) se ha degradado en un **monosacárido** o **disacárido**.



**a-D-GLUCOPIRANOSA**



**VIBRACION DEL ANILLO**

**Fig. D**

**Fig. E**

### **b.2 Espectro de $^1\text{H}$ - RMN**

El compuesto M4, fue disuelto parcialmente en  $\text{CD}_3\text{OD}$  y se le tomó su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Fig. 13**), obteniéndose los siguientes resultados:

Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad
3.26	
3.28	
3.31	
3.32	
3.35	duplete
3.37	singlete
3.41	duplete
3.44	duplete
3.46	singlete
3.48	

3.63	
3.65	
4.15	duplete
4.19	
4.39	
4.40	
4.49	singulete
4.59	duplete
4.61	singulete
4.69	singulete
4.78	
4.93	duplete
4.95	

De acuerdo a los datos espectrales de  $^1\text{H-RMN}$ , el espectro es característico de un carbohidrato por las señales características de algunos grupos  $-\text{OH}$ , que aparecen en el rango de 3 a 4 ppm, muy característico en un monosacárido o disacárido, se trata de una mezcla 1:1 de los anómeros de un monosacárido o bien un disacárido con un protón  $\text{H}_\alpha$  y  $\text{H}_\beta$  (40), lo cual concuerda con los datos espectrales del estudio de IR efectuado.

Para mayor resolución, se tomó otro espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (Fig.14), utilizando como solvente  $\text{DMSO-d}_6$  + ácido trifluoroacético, obteniéndose los siguientes resultados:

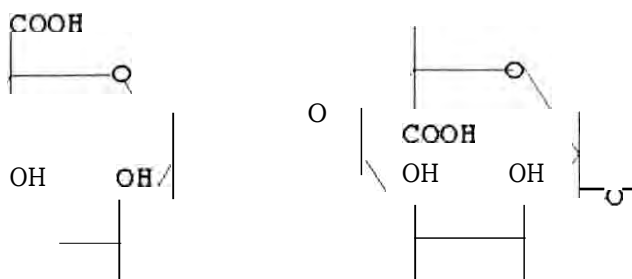
Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad
3.31	duplete
3.32	
3.35	
3.37	
3.41	singulete
3.46	triplete
3.48	
3.51	
3.60	
3.63	
3.65	
4.15	singulete
4.19	singulete
4.49	singulete

4.19	singulete
4.49	singulete
4.59	duplete
4.61	
4.69	singulete

Las señales **duplete** ubicadas a 3.31 ppm y a 4.59 ppm respectivamente, corresponden a un protón  $H_{\alpha}$  y  $H_{\beta}$  (39).

La señal a 4.15 y 4.19 corresponden a la señal del grupo -OH (39).

Intentando facilitar el estudio de esta muestra se sometió a un proceso de **acetilación** y reflujo en un medio  $Ac_2O$ /piridina, el producto resultante era soluble en  $CDCl_3$ , a este nuevo producto se le tomó su espectro de **H-RMN** ( Fig.15), obteniéndose una muestra muy compleja de productos **acetilados**, imposible de analizarlos directamente. Por lo que se propondría que el compuesto M4 es una mezcla de dos **anómeros** de los **monosacáridos** o **disacáridos** del ácido **algínico** degradado.



D - MANNURONICO

L - GULURONICO

La separación de estos **anómeros** se vio obstaculizada por su escasa solubilidad en diversos solventes resultando ser muy compleja.

## 1. ENSAYOS FISICO QUIMICOS DEL ALGINATO DE SODIO

Los ensayos son las siguientes:

- a) El **alginato** de sodio a diferencia del ácido **algínico** es bastante soluble en el agua, esta solubilidad se incrementa en agua caliente.
- b) El **pH** del **alginato** de sodio fue 6.8, normalmente el **pH** del **alginato** de sodio es 7.7 (32), esta diferencia se debe al medio acuoso con se trabajó.
- c) Se comparó el aspecto físico en solución al 2% con solución de "gelatina", al 2%, observándose mucha semejanza, distinguiéndose ambos mediante una reacción química con **taninos** (32) (la gelatina dio el ensayo positivo).
- d) El **alginato** de sodio se asemeja a la goma arábica en forma laminar, es muy higroscópica.
- e) En solución tiene un gran parecido con la albúmina, el almidón, la dextrina y goma arábica, se distingue de la albúmina, por no coagular por calentamiento, del almidón por no dar coloración con el Iodo, y de la dextrina y goma arábica por ser solubles en ácidos diluidos (32).

## 2. CARACTERIZACION DEL ALGINATO DE SODIO

- a) Color ligeramente crema, textura quebradiza y apariencia brillante.
- b) Su poder rotatorio  $[\alpha]$ , = - 132.
- c) Punto de fusión: se descompone a 110°C, y se carboniza a 190°C.
- d) Determinación de ácidos **urónicos**, el método **espectrofotométrico** con el reactivo "**antrona - ácido sulfúrico**", dio el resultado de absorción máxima a 543  $\mu$ , el cual concuerda con los datos teóricos de absorción en el rango de 540 - 545  $\mu$  (41).

#### 4.1.3 DETERMINACION DE HIDROCARBUROS TOTALES EN MACROCYSTIS PYRIFERA

El extracto de hidrocarburos totales (no saponificables) (2.56 g) se sometieron al proceso de fraccionamiento a fin de separarlos en forma cuantitativa; las fracciones obtenidas fueron: F1, F2 y F3.

La fracción F1 (peso = 65.8 mg), era de naturaleza aceitosa, soluble en *n*-hexano, éter de petróleo, y parcialmente soluble en  $\text{CDCl}_3$ .

Respecto a la fracción F2, se obtuvo 77 mg de cristales de color blanco con apariencia aceitosa solubles en *n*-hexano.

En la fracción N°3, se obtuvo 98 mg de cristales monoclinicos brillosos y de aspecto aceitoso, solubles en *n*-hexano.

La concentración de los hidrocarburos totales fue 240.8 mg (suma de las fracciones F1, F2 y F3), que corresponde a un 16.4 % de hidrocarburos totales en una muestra de 40 g de alga seca pulverizada.

El estudio de hidrocarburos en *M. piryfera* demuestra que contiene hidrocarburos lineales de aspecto aceitoso, de acuerdo a la información bibliográfica (42), los hidrocarburos más comunes son:  $\text{C}_{23}$ ,  $\text{C}_{24}$ ,  $\text{C}_{29}$ ,  $\text{C}_{31}$ ,  $\text{C}_{17}$ ,  $\text{C}_{31}$ .

Entre los alcanos presentes predominan compuestos de número impar de carbonos  $\text{C}_{27}$  a  $\text{C}_{31}$  (42), no se determinó las estructuras por falta de compuestos de referencia, para determinar las estructuras se haría un estudio de cromatografía de gases, con muestras patrones.

#### 4.1.4 DISCUSIONES O ANALISIS DE RESULTADOS, COMPUESTO M6

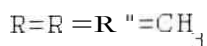
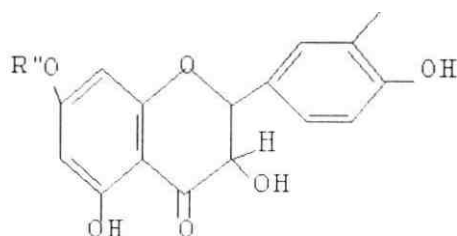
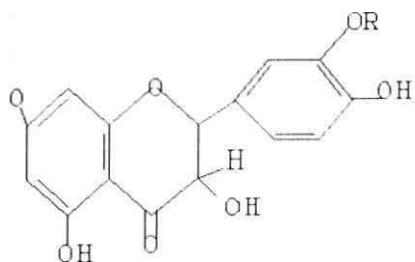
##### A. Métodos Clásicos

##### 1. Métodos Físicos

El compuesto M6, es un polvo amarillo, levemente soluble en EtOH e insoluble en otros solventes, es un ácido débil (pH = 5), da resultado positivo con el test de Shinoda (característico para flavonoides).

Para saber si se trataba de un flavonoide, se hizo la prueba de solubilidades en diferentes solventes (43), cuyos resultados experimentales se muestran en la tabla N°12.

De acuerdo a estos datos, las posibles estructuras del flavonoide serían (44):



Estructura (a)

Estructura(b)

Observándose que los **sustituyentes** de los anillos A y B del **flavonoide** serían:

-OH

3, 5, 3', 4'  
3, 5, 4'

-OCH<sub>3</sub>

7  
7, 3'

### Reacciones Químicas características (45).

De acuerdo a las reacciones químicas las más características fueron: reacción de **Shinoda** (color rojo), reacción con **FeCl<sub>3</sub>** (color marrón negruzco) y exposición a los vapores de **NH<sub>3</sub>** (color amarillo)

## 2. Análisis por métodos espectroscópicos

### a) Espectroscopía Ultravioleta-Visible

Al compuesto M6 se le tomó su espectro **UV-Visible** en **MeOH** (Figs. 19a, 19b).

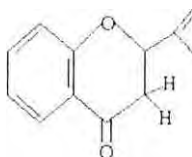
El espectro **UV-Vis.** Presenta las siguientes absorciones : en **MeOH** : 330h, 288, 238, 204 **nm**, de acuerdo a estos datos se hicieron los siguientes análisis:

- i Las **flavonas** y **dihidroflavonas**, tienen una absorción en el **UV - visible** en el siguiente rango (46):

Banda II	Banda I	Compuesto
275-290	300-330	flavanonas y dihydroflavonoles
288	330 h	compuesto M6

Por lo tanto las bandas de absorción del compuesto M6 están dentro del rango de absorción de las flavanonas y dihydroflavonoles.

ii Los esqueletos básicos de las flavonas y dihydroflavonoles son los siguientes:



OH

**FLAVANONA****DIHYDROFLAVONOL**

El espectro UV - Visible de estos compuestos se caracteriza por la intensidad relativa de la Banda I, que es mucho mas baja que la Banda II. Comparando el espectro UV - Visible del compuesto M6 se observa similitud con el espectro de estos compuestos. Por lo que se deduce que el compuesto M6 podría ser una flavanona ó dihydroflavonol. Para resolver esta disyuntiva se hizo un análisis de reacciones de color (46), tal como se observa en la tabla N°13. De acuerdo a dichos resultados, el compuesto M6 tiene un comportamiento semejante a los dihydroflavonoles.

### b) Espectroscopía Infrarroja

Al compuesto M6 se le tomó su espectro IR (pastilla de KBr) (Fig. 20), el espectro muestra las siguientes absorciones :

y máx (cm <sup>-1</sup> )	Características
3387	estiramiento de -OH (ancha)



2934	vibración de C - H de <b>CH<sub>2</sub></b> y <b>CH<sub>3</sub></b> ,
2364	vibración de <b>Ar - H</b>
1637	estiramiento de C = O
1500	vibración de C = C conjugado
1466	deformación de -OH en el plano
1365	vibración de <b>CH<sub>2</sub></b> ,
1277	vibración de C - O
1166	
1123	flexión <b>asim.C - O - C</b>
1083	vibración de un anillo pira-
1019	<b>nosa.</b>

De acuerdo al análisis del espectro IR, se encuentran presentes: un grupo -OH ubicado a  $3400\text{ cm}^{-1}$ , esta banda ancha corresponde a una vibración del -OH en un anillo **fenólico**, esta señal es característica de un enlace **intermolecular** (puente de hidrógeno) (47). Un grupo **ceto** C=O ubicado a  $1637\text{ cm}^{-1}$ , un anillo aromático caracterizado por la absorción ubicada a  $1508\text{ cm}^{-1}$ .

También se encuentra presente un grupo funcional -C - O - C - (enlace **glicosídico**) ubicado a  $1123\text{ cm}^{-1}$  (48), se observa la presencia de un anillo **pirano** de un carbohidrato ubicado a  $1083$  y  $1019\text{ cm}^{-1}$  (49).

También se observa la presencia de grupos -OH de carbono terciario, por la vibración a  $1466\text{ cm}^{-1}$ , (50) de acuerdo a estos datos, se deduce que el compuesto M6 tiene una impureza (carbohidrato) posiblemente el ácido **algínico**, componente principal en esta planta.

Se trató de separar la impureza (ácido **algínico**), pero no se logró debido a la insolubilidad en los solventes, y estado de **polimerización**, (con el tiempo se torna insoluble y con apariencia cornea).

Es difícil aislar principios activos (compuestos **hidroxilados**) de la **M.piryfera** debido a la presencia del ácido **algínico**, el cual por sus propiedades de solubilidad, interfiere en la separación y purificación de principios activos.

## 2 ESTUDIO DE COMPUESTOS ORGANICOS EN GIGARTINA CHAMISSOI

### 4.2.1 FICOCOLOIDES: CARRAGENO O CARRAGENINA DE GIGARTINA CHAMISSOI

Antes de la extracción se hizo un análisis cualitativo determinándose la naturaleza y cantidad de **carrageno**.

El producto obtenido era blanquecino; con 12 % de humedad, las especificaciones de la humedad para este producto son de 15 a 18%, si la humedad excede al 28%, se deteriora con inmediata proliferación de hongos.

En el mercado internacional el **carrageno** se vende puro o en forma de **carragenatos** de potasio, sodio, amonio o mezclado con otras sustancias, por lo general adopta diversos nombres comerciales siendo los más conocidos (32):

* Carragar	* Gelloid	* Glutinal
* Gelcarin	* Viscarin	* Estamere
* Kingel	* Vacarin	* Genulacta
* Krimkogel	* Seakem	* Genuvisco
* Carragenin	* Damager	* Krimkoten dergel

#### A. VARIEDADES DEL CARRAGENO (51)

Para identificar las variedades del **carrageno** se hizo una investigación bibliográfica encontrándose varias estructuras básicas de **carrageno**, así como: kappa, lambda, iota, p ; en general en una misma planta hay diversas variedades de **carrageno**, predominando una de ellas respecto a las otras, por ejemplo en las fracciones del extracto de **Chondrus crispus**, se han obtenido las variedades: Kappa (mayor proporción), lambda y iota.

Por las características físicas del coloide obtenido de **Gigartina c.**, este corresponde al tipo "Kappa", casi en su totalidad, cuyas propiedades físicas, se discuten a continuación.

##### 1. Kappa-carragenina (51)

La **Kappa-carragenina** contiene más del 34% de 3,6 anhidro-D galactosa, y 25% de sulfato de éster, cuando se coloca en agua fría, se esponja formando una dispersión gruesa, que requiere de calentamiento a 70°C, para lograr la solubilidad completa; la solución resultante exhibe baja viscosidad, por ejemplo para una concentración de 1.5% a 75°C es 50 cps.

Esta variedad puede ser precipitada en una solución acuosa de KCl.

Las soluciones de Kappa - **carrageno** forman un gel firme entre 45°C y 65°C licuándose al elevarse la temperatura. La temperatura de **gelificación** y calidad del gel depende de la concentración del coloide, así como la cantidad y tipo de iones metálicos (por ejemplo,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Sr^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ) en solución .

Los productos del tipo Kappa c. se usan cuando se requieren geles rígidos, **firmes**, los cuales se caracterizan generalmente por su elevada sinéresis, el cual puede eliminarse, mezclando con materiales no **sinerizantes**, como el **carrageno** iota.

## 2. **Lambda-carrageno (51)**

EL **Lambda-carrageno** contiene aproximadamente 35 % de sulfato de éster en peso, sin ningún 3,6-AG., forma soluciones en agua fría se caracteriza por producir las más elevadas **viscosidades** con el agua, por ejemplo una solución típica al 1% puede producir una viscosidad de 600 **cps**.

Los productos de lambda .c , son efectivos como estabilizadores de espuma, emulsiones y suspensiones, el carácter no **gelificante** contribuye a la estabilidad del producto en un amplio rango de temperatura, incluyendo el proceso de congelación y descongelación.

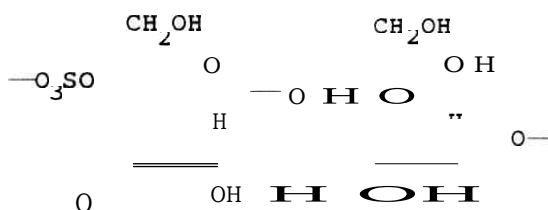
## 3. **Iota-carrageno (51)**

El **carrageno-iota** contiene aproximadamente 30% de 3,6-AG y 32 % de sulfato de éster por peso, es soluble en agua fría; en presencia de cationes:  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  y  $Na^+$ , forma geles de gran elasticidad, libres de sinéresis; exhibe gran tolerancia a elevadas concentraciones de sales, presentando gran estabilidad a ciclos repetidos de congelación y descongelación.

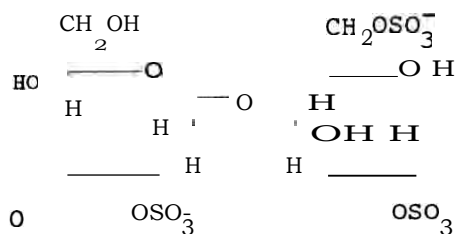
A continuación, se muestran las estructuras de las variedades de **carragenos**, el **mu-carrageno** es un componente menor y viene a ser el precursor biológico de Kappa - **carrageno**.

## ESTRUCTURA DE LAS VARIEDADES DE CARRAGENO

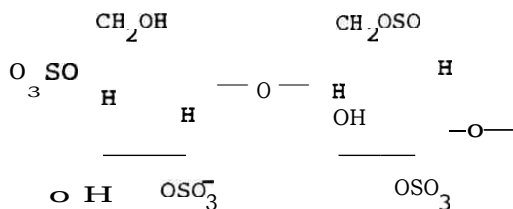
**KAPPA-CARRAGENO :** PRECIPITA CON CLORURO DE POTASIO, ES COMPONENTE GELIFICANTE



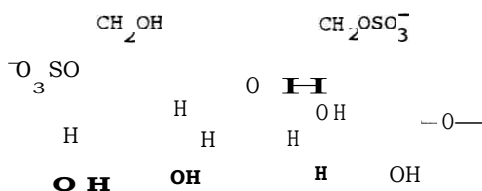
**LAMBDA CARRAGENO:** PRECIPITA CON ALCOHOL, ES COMPONENTE VISCOSANTE



**IOTA-CARRAGENO:** PROPIEDADES GELIFICANTES; POSEE UN SULFATO EN COMPARACION CON FRACCION KAPPA



**BETA-CARRAGENO:** PRECURSOR BIOLOGICO DE LA FRACCION KAPPA



## B. PROPIEDADES FISICAS DEL CARRAGENO

Las propiedades de los **carragenos** se resumen en la tabla N°18 (51), las cuales se tomaron como referencia para hacer las siguientes **determinaciones**:

### 1. SOLUBILIDAD

Con respecto a la solubilidad del **carrageno** en agua fría, leche fría, leche fría con **pirofosfato tetrasódico**, soluciones concentradas de azúcar y sal, se observa que coinciden con las solubilidades del "**kappa carrageno**", también es importante conocer que los **carragenatos** de potasio de la variedad kappa no son completamente solubles en agua fría por lo que se requiere un calentamiento (32), este tipo de **carragenos** son **dispersables** en glicerina siendo favorecida la solubilidad en agua.

### 2. VALOR DEL pH

Los valores del **pH** de la solución al 1.5 % y 0.1 % a 20 °C están en el rango de 7 a 8 (lo cual concuerda con el kappa) (32), esta variedad de **carrageno** es estable en medio neutro y altas temperaturas, lo cual se verificó al mantenerse estable hirviendo durante horas.

En caliente y a **pH** < 6, se degrada rápidamente bajando la viscosidad de la solución, en el caso del **carrageno** lambda este sufre hidrólisis (32), motivo por el cual se pudo diferenciar del kappa, el cual en medio alcalino no sufre modificación hasta **pH** = 11, y a **pH** > 11 y en caliente se produce una disminución lenta de la viscosidad.

### 3. FUERZA DE GEL O GELIFICACION (32)

La formación de geles de los diversos **carragenos** requieren la presencia de cationes específicos, sales de potasio, **amonio**, cesio, las cuales poseen las mismas características en cuanto a la formación del gel.

Los **solutos** provocan el aumento de la fuerza del gel, entre estos **solutos** en orden de actividad decreciente se tiene: potasio, calcio, magnesio y sodio, compuestos orgánicos tales como: azúcares, alcoholes, glicerina, acetato de potasio y **lactato** de calcio.

De los diversos ensayos que se hizo para medir la fuerza de **gelificación** se observó que

**gelifica** con mayor fuerza con los iones  $le$ , lo cual concuerda con la variedad kappa, no se observó **gelificación** con los iones  $Na^+$  y  $Ca^{++}$ , lo cual diferencia del Iota (este **gelifica** con  $ca^{++}$ ), y se diferenció del lambda debido a que esta variedad no **gelifica**.

#### 4. VISCOSIDAD

La viscosidad en cada tipo de **carrageno** es variable, en nuestro caso se observó el valor de una baja viscosidad, por ejemplo para la concentración de 1.5% a  $75^{\circ}C$  la viscosidad fue de 50 **cps**, lo cual sirvió para identificarlo como Kappa - **carrageno** (32).

Las dispersiones del **carrageno** forma sistemas viscosos dependientes del tiempo y esfuerzo de corte, por lo que se puede denominar sistemas plásticos, **tixotropical**, la característica importante de estos sistemas es el decrecimiento de la viscosidad con el tiempo y agitación (32).

#### 4.2.2 COMPUESTOS ORGANICOS EXTRAIDOS DE LA ESPECIE GIGARTINA CHAMISSOI (alga roja, natural de Ancón-Perú)

De esta especie se lograron aislar y purificar 03 compuestos: G1, G2, y G3, cuyos resultados se discuten a continuación:

##### A. ANALISIS DE RESULTADOS DEL COMPUESTO G1

##### 1. ANÁLISIS DE RESULTADOS POR METODOS CLASICOS DEL COMPUESTO G1.

El compuesto G1, obtenido por procesos de purificación por CCD y CC del extracto de éter de petróleo, es un sólido blanquecino (en luz UV 366 nm presenta un color azul brillante), es muy soluble en éter de petróleo, n-hexano, parcialmente soluble en acetona,  $\text{CHCl}_3$ , acetato de etilo e insoluble en MeOH, tiene un punto de fusión mayor de 180 °C (se descompone a esta temperatura).

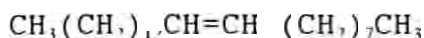
##### 2. ANALISIS ESPECTRAL DEL COMPUESTO G1

##### a) Análisis del espectro de Infrarrojo IR

El espectro IR (pastilla de KBr), muestra las siguientes absorciones (Fig. 24a)

máx (cm <sup>-1</sup> )	CARACTERISTICAS
2920, 2830	estiramiento de C -H, de $\text{CH}_2$ y $\text{CH}_3$ .
1460	def. de - $\text{CH}_2$ - y def. de $\text{CH}_3$ simétrica
1380	un gem dimetil - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
725	vibración - $(\text{CH}_2)_n$ -

Los grupos funcionales presentes en el compuesto son; el grupo -  $\text{CH}_2$  y -  $\text{CH}_3$ -, por las vibraciones características a 2920, 2830, 1460 cm<sup>-1</sup>; también se encuentra un grupo gem dimetil - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , debido a la absorción en 1380 cm<sup>-1</sup> (52). Por las características del espectro de IR se determina que es un hidrocarburo superior (53). Se revisó la bibliografía (54), y se encontró un espectro similar ( Fig.24b) el cual corresponde al **cis -9-tricosene** hidrocarburo superior, cuya formula es:



Se hace la observación de que no se observa la señal característica a  $3030\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a C=C, tanto en el espectro experimental y el espectro de referencia (Fig. 24b).

**b) Análisis del espectro de Resonancia Magnética Nuclear del protón  $^1\text{H}$  -RMN**

Su espectro de  $^1\text{H}$  - RMN, tomado en  $\text{CCl}_4$ , presenta las siguientes señales (Fig. 25).

Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	
0.70	singulete	3
0.90	singulete	3
1.30	singlete	
1.90	singlete	3
2.48	duplete	1
5.25	duplete	1

El espectro es característico de hidrocarburos superiores.

Las señales **singletes** a 0.70 y 0.90 ppm corresponden a 2 grupos **metilos**, la señal intensa a 1.30 ppm corresponde a  $-(\text{CH}_2)_n$ , las señales a 2.48 ppm y a 5.25 ppm corresponden a los dos protones de  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (53), por todas estas características, se propone como posible estructura del compuesto G1:

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ . **cis-9-tricosene hidrocarburo superior**. Este compuesto es común en algas pardas y rojas (t3).



## B. ANALISIS DE RESULTADOS DEL COMPUESTO G2

### 1. ANALISIS DE RESULTADOS POR METODOS CLASICOS

Este compuesto, purificado por métodos cromatográficos de CCD y CC del extracto de éter de petróleo, es un sólido blanquecino que cristaliza en forma de agujas brillantes, tiene un punto de fusión mayor de 140 °C ( en este punto se descompone), es parcialmente soluble en acetona, cloroformo y soluble en n-Hexano y éter de petróleo.

#### a) Análisis del espectro de Infrarrojo IR

Su espectro de IR (pastilla de KBr) (Fig. 26), muestra las siguientes absorciones :

$\nu_{\text{máx}}$ (cm <sup>-1</sup> )	Características
3400	banda ancha estiramiento de -OH
2920, 2860	estiramiento de -C-H, de -CH <sub>2</sub> y -CH <sub>3</sub> .
1460, 1435	flexiones de -CH <sub>2</sub> -
1385, 1372	estiramiento de -CH <sub>3</sub>
1055	estiramiento de H- C-OH

El espectro es característico de un hidrocarburo ó compuesto esteroideal (54).

De acuerdo a los datos del espectro de Infrarrojo IR, el compuesto tiene un grupo funcional -OH el cual por la característica de la banda ancha, a 3400 cm<sup>-1</sup> está asociado intermolecularmente (53). Con respecto a la señal correspondiente a 1055 cm<sup>-1</sup> indica que el grupo -OH está sustituido en un carbono secundario (53).

Se revisó la bibliografía de compuestos esteroideales y se observó que en la mayoría de los "esteroles", el grupo -OH, normalmente está sustituido en el carbono N°3 ó N°2 (53). Las señales existentes en 1385 y 1372 cm<sup>-1</sup> indican la presencia de un grupo metilo.

#### b) Análisis del espectro de - RMN del compuesto G2

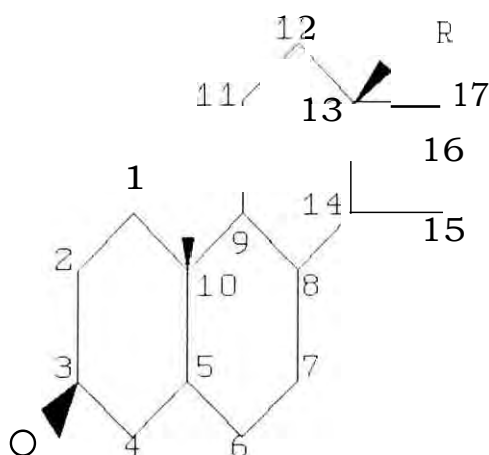
El espectros de <sup>1</sup>H - RMN, fue tomado en CHCl<sub>3</sub>, el espectro presenta las siguientes señales (Fig. 27a)

Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Integración
0.72	singulete	3

1.0	singulete	3
1.2	singulete	
1.5	singulete	
4.0	singulete	1

Por las características de las señales del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  se deduce que el espectro es característico de hidrocarburos superiores ó esteroides (**esteroles**) (55).

Para el análisis, se tomó en cuenta la estructura de un **esterol**.

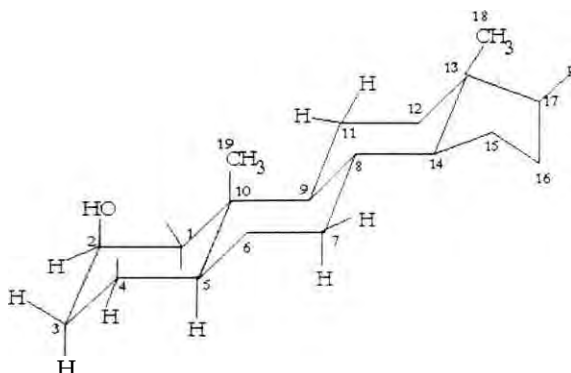


### ESTEROL

La señal **singulete** a 0.72 ppm corresponde a la señal de un metilo sustituido en el carbono N°13 (56), el **singulete** a 1.0 ppm, corresponde a un metilo sustituido en el carbono N°10, la señal **singulete** a 4.0 ppm corresponde al -OH sustituido en el carbono N°2, el cual se chequeo con el espectro de IR observándose que hay un -OH secundario característico de **esteroles**, y en cuanto a la señal **singulete** a 1.5 ppm, esta señal de gran intensidad corresponde al solvente utilizado y al agua absorbida, estas señales van acompañadas de bandas laterales y a los **silanos** e hidrocarburos mayores alrededor de 1 ppm los cuales estuvieron presentes en la **silicagel** usado como soporte de **elusión cromatográfica** y el **n-hexano** utilizado como solvente de **elusión**.

Se revisó los espectros de IR y  $^1\text{H-RMN}$  de **esteroles** (17), encontrándose que los datos espectrales de  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto **ANDROSTAN-2 $\beta$ -OL** (Fig.27b) son coincidentes con los datos espectrales del compuesto G2 (53).

Por la concordancia de estos datos espectrales, se propondría como una posible estructura el **ANDROSTAN-2B-OL** para el compuesto G2, el cual es un compuesto conocido en la mayoría de especies de algas marinas (17), (18), para verificar completamente su estructura se haría un estudio espectral con patrones de referencia.



### ANDROSTAN- 213 - OL

#### C. ANALISIS DE RESULTADOS DEL COMPUESTO G3

##### 1. ANALISIS DE RESULTADOS POR METODOS CLASICOS DEL COMPUESTO G3

El compuesto G3, obtenido por tratamiento del extracto de éter de petróleo, es un sólido de color blanco brillante en forma de pequeñas agujas, soluble en  $\text{CHCl}_3$ , acetona, *n*-Hexano, parcialmente soluble en EtOH y MeOH. Presenta un valor de  $R_f = 0.45$  en *n*-Hexano:acetona (1:10). Tiene un punto de fusión de 212 °C.

##### 2. ANALISIS POR METODOS ESPECTROSCOPICOS

###### a) Analisis del Espectro de IR

Su espectro de IR (pastilla de KBr), muestra las siguientes absorciones (Fig. 28)

$\nu$ máx (cm )	Característica
3449	ancha, estiramiento de O-H
2950, 2860	estiramiento de C-H, de CH <sub>2</sub> , y CH <sub>3</sub> ,
1640	estiramiento de C=C
1460	deformación asimétrica de CH <sub>2</sub> ,
1385	deformación simétrica de CH <sub>2</sub> ,
1050	deformación de O-H secundarios
890	deformación de = CH <sub>2</sub> , fuera del plano.

De acuerdo a las características del espectro IR del compuesto G3, este tiene dos grupos funcionales: el grupo hidroxilo -OH y un doble enlace metilénico terminal.

### b) Espectro de H-RMN

El espectro de H-RMN fue tomado en CDCl<sub>3</sub>, el cual presenta las siguientes señales características (Fig.29a):

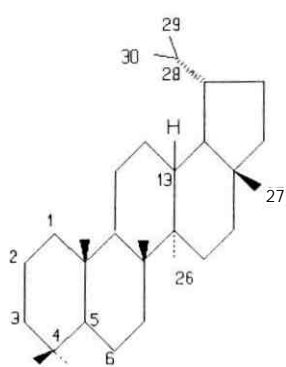
Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Integración
4.63	doble doblete	2
3.21	cuartete	1
2.20	multiplete	1
1.91	multiplete	1
1.70	singulete	3
1.1 - 1.6		24
1.02	singulete	3
0.98	singulete	3
0.96	singulete	3
0.85	singulete	3
0.80	singulete	3
0.77	singulete	3

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN es característico de compuestos triterpenoidales pentacíclicos (57).

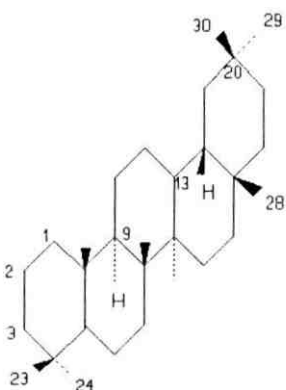
La señal **singulete** ubicado a 1.70 ppm, corresponde a 3 protones equivalentes, el cual indica la presencia de un grupo metilo, adicionalmente se observan varios **singuletes** ubicados a 0.77; 0.80; 0.85; 0.96; 0.98 ; 1.02 y ; los cuales indican que hay seis metilos cuaternarios adicionales presentes.

La señal correspondiente al doble doblete, ubicado a 4.63 ppm, corresponde a dos protones **alquénicos**, se midió la integral de **area**, indicando la presencia de 50 protones presentes.

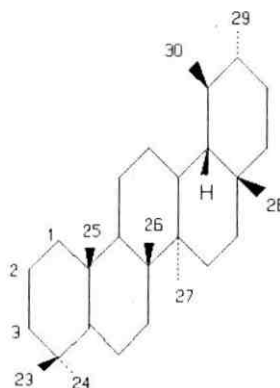
De acuerdo a las características de los espectros, se consultó la bibliografía de la serie de los **triterpenos**, teniendo en cuenta la presencia de 8 grupos **metílicos**, se seleccionaron los tres grupos siguientes: serie **lupano**, serie **oleano**, serie **ursano**.



Serie Lupano



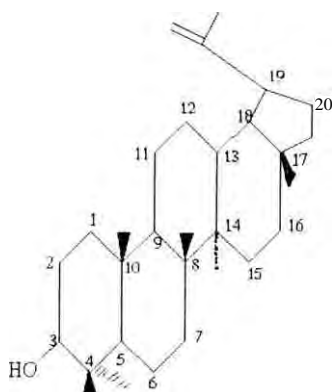
Serie Oleano



Serie Ursano

Para poder relacionar cada una de estas estructuras con el compuesto G3, se analizó el espectro de IR, en donde se observa la señal ubicada en  $890\text{ cm}^{-1}$ , el cual indica la presencia de un **metileno** terminal, fuera del anillo (58), y en consecuencia originaría el desplazamiento de un grupo metilo a campo bajo. Chequeando las tres series de estructuras **triterpénicas**, se observó que esta estructura correspondería a un derivado de la serie del **Lupano** (58).

Se hizo una investigación bibliográfica sobre el serie **lupano** (47), observándose que el grupo **oxhidrilo**, esta sustituido en un carbono secundario, tal como indica la señal, ubicado en  $1050\text{ cm}^{-1}$ , de acuerdo a estos datos se dedujo que la estructura posible podría ser el **lupeol**.



### LUPEOL

Para verificar esta estructura, se hizo una comparación con el **lupeol** (Fig. 29b) haciendo concordancia con algunas de las señales características del espectro de  $^1\text{H-RMN}$ , en donde el cuarteto ubicado a 3.21 ppm, corresponde al H-3 que se acopla en forma diferente con los protones del C-2, formando en este caso un sistema ABC y en cuanto a la señal **multiplete** ubicada a 2.20 ppm, corresponde al H-19, debido al desplazamiento a campo bajo, por la existencia del grupo doble enlace terminal (47).

Con respecto al punto de fusión del compuesto es 212 °C, el cual es muy similar al punto de fusión especificado para el **lupeol**, 215 °C (47).

Por lo tanto se propondría como posible estructura del compuesto G3, al **lupeol** (compuesto conocido).

## ESPECIE PETEROSIPHONIA DENDROIDEA

### 4.3.1 ESTUDIO DE COMPUESTOS ORGANICOS EN PETEROSIPHONIA DENDROIDEA.

#### A. COLOIDES: AGAR-AGAR

La *Peterosiphonia dendroidea* (alga marina roja) es oriunda de nuestro país, en Pucusana abunda en los meses de Julio a setiembre, el recogimiento debe hacerse en ausencia de lluvias, debido a que el coloide es muy soluble en agua dulce y fría, por lo que se recomienda usar agua helada en el proceso de lavado así como en el blanqueado natural.

La extracción puede hacerse con agua dulce a temperatura ambiente, obteniéndose una solución clara y viscosa, cuando la concentración de **solutos** es baja, la **gelificación** no se realiza, pero si se le agrega un **soluto** (KCl) se **gelifica** inmediatamente, al rededor de la sal se forma una balsa de gel.

Para disolución completa de la sal es aconsejable calentar la solución a fin de obtener la concentración necesaria que permita comportarse al coloide con sus propiedades características.

Cuando la sal se disuelve, la fuerza de gelación y otras propiedades varían de acuerdo a la concentración y naturaleza del **soluto** (59).

#### B. PROPIEDADES FISICAS DEL AGAR-AGAR

El agar difiere de otros ficocoloides por sus propiedades físicas, que son exclusivas del **agar**: su alta fuerza de gelación y su amplio rango de **histeréresis**, las otras propiedades también son importantes, pero varían con la fuente de **agar** por ejemplo los **agares** del *Gelidium cartilagineum* de California y México y la de *G. amansii* del Japón, destacan por su baja viscosidad, baja sinéresis (exudación en agua en su estado de gel), y baja temperatura de **gelificación** (34° a 30°C) (59).

La *Gracilaria confervoides* de Sudafrica se considera excepcional porque **gelifica** a 37°C. El **agar** de *Peterosiphonia* d. (Pucusana-Perú) posee una viscosidad relativamente baja (en presencia de **solutos**), pero que asemeja al **agar** de *Gracilaria* c. por su alto grado de sinéresis, y también por su **gelificación** a 37.8 °C.

En la tabla N°19 se comparan los datos de las temperaturas de **gelificación** y concentración de gel de una variedad de **agares** y el **agar** de *Peterosiphonia dendroidea* (Perú).

## 1. PODER O FUERZA GELIFICANTE DEL AGAR-AGAR

El poder o fuerza gelificante se determinó por el número de gramos soportado por 1 cm de superficie del gel, cuyo dato resultó ser de 100 y 187 g, para unas concentraciones de 1.0 y 1.5 % respectivamente. Lo cual demuestra el gran poder de gelificación del agar de *Peterosiphonia* d.

## 2. EFECTO DEL pH

El exceso de acidez, afecta a la fuerza de gelificación del agar de *Peterosiphonia* d., a mayor acidez disminuye la fuerza gelificante, pero la extracción es más fácil y rápida, (el agar de algunas especies de algas son más afectadas con el valor de pH ácido que otras) (59).

## 3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE KCl:

### a) SOBRE LA VISCOSIDAD

La influencia del efecto de los solutos, sobre la viscosidad de los extractos de *Peterosiphonia* se observan en el gráfico "A", donde se hizo la comparación con diferentes concentraciones de agar: curva A (agar de referencia, *Gelidium* j.al 1%); curva B (agar al 1% +KCl 0.2%); curva C (agar al 1%+KCl 0.6%); curva D (agar al 1%); curva E (agua destilada); de acuerdo a estos resultados se observa la variación de la curva A (muestra de referencia) con la curva D (agar de *Peterosiphonia* d.), también se demuestra que las soluciones de extracto de *Peterosiphonia* d., son más fáciles de filtrar si se agrega KCl, debido a la gran influencia en la viscosidad del agar.

Las unidades de viscosidad son números arbitrarios.

### b) SOBRE LA TEMPERATURA DE GELIFICACION Y FUSION

La temperatura de gelificación, y de fusión así como la medida de la histéresis, de una solución de agar de *Peterosiphonia* al 1% y sus cambios de comportamiento por la presencia de KCl a varias concentraciones están representadas en el gráfico "e", en donde se observa el efecto del KCl, el cual produce diferentes grados de histéresis, existiendo una correlación positiva con la elevación de la fuerza gelificante.



Para realizar comparaciones, se hizo una investigación bibliográfica y se encontró una relación de temperatura de **gelificación** y fuerza **gelificante** de **agares** de varias fuentes de procedencia, las cuales se observan en la tabla N°19, de donde podemos observar que la temperatura de **gelificación** del **agar** de **P.dendroidea** (37.8 °C), es casi semejante al de **Gelidium j.** (38 °C), y con respecto a la fuerza de **gelificación** se semeja al **agar** de **Gracilaria confervoides**.

#### **c) HINCHAMIENTO DEL AGAR ( SWELLING )**

Según las investigaciones bibliográficas la absorción máxima de agua ocurre si el contenido de humedad original es de 313 mg. de agua por cada gramo de **agar** (32).

De acuerdo a los datos experimentales mostrados en el gráfico "c", se concluye que los **solutos** afectan al hinchamiento o turgencia del **agar**. Soluciones diluidas del **KCl** y **NaCl** a concentraciones entre 0.001 M y 0.01M, causan un incremento en la cantidad de agua absorbida por el **agar**.

A concentraciones más altas de 0.1 N los electrólitos inhiben el hinchamiento del **agar**. Los no electrólitos producen el mismo efecto (32).

#### **d) FLOCULACION DEL AGAR-AGAR**

Para precipitación del **agar** se utilizó alcohol al 95%, este método se usa para purificar y deshidratar el **agar** en escala comercial (32).

El principio de la precipitación se fundamenta en que los electrólitos tienen la propiedad de quitar las cargas eléctricas a las partículas del **agar**, y en alta concentración (1e, Cl) eliminan la carga eléctrica y el agua de hidratación.

#### 4.3.2 ESTUDIO DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN PETEROSIPHONIA DENDROIDEA COMPUESTOS : P1 Y P2

##### A. ANALISIS DE RESULTADOS DEL COMPUESTO P1

##### 1. ANALISIS DE RESULTADOS POR METODOS CLASICOS DEL COMPUESTO P1.

Este compuesto fue obtenido a partir del extracto de cloroformo, purificado por cromatografía CCD y cromatografía de columna.

Las características del compuesto son: color blanco cristalino, forma de cristales monoclínicos, olor penetrante, fácilmente sublimable, soluble en EtO., CHCl., éter de petróleo, tiene un punto de fusión de 176 - 178 °C.

##### 2. ANALISIS ESPECTRAL DEL COMPUESTO P1

##### a) Análisis del espectro de Infrarrojo IR

Su espectro IR (pastilla de KBr) (Fig. 33a), muestra las siguientes absorciones

$\nu$ máx (cm <sup>-1</sup> )	CARACTERISTICAS
2960,2860	deformación de C-H, de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub> .
1740	estiramiento de C = O
1470,1450	deformaciones de -CH <sub>2</sub> -
1420,1080	
1390,1370	deformaciones de -CH <sub>3</sub>
1325,1300	deformaciones de C-C
1050	deformación de C-O
955	deformación de tC

Por las características del espectro de IR se determina que los grupos funcionales presentes en el compuesto son: un grupo carbonilo C=O, el cual absorbe en el rango: 1740, 1765 cm<sup>-1</sup> (40), por su intensidad es característico de una cetona, adicionalmente se observan las señales características de la deformación de un grupo gem dimetilo -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, el cual absorbe en el rango 1390 -1370 cm<sup>-1</sup> (40). Hay ausencia de grupos aromáticos e insaturaciones tales como C = C los cuales comúnmente absorben en rangos 3040-3010 cm<sup>-1</sup> (para =C-H) y 1680 -1620 cm<sup>-1</sup> (para C=C) (40).

Se revisó la bibliografía de compuestos **monoterpénicos**, encontrándose un espectro de IR similar al compuesto **P1**, correspondiente al "alcanfor" (fig. 33b) (54).

**b) Análisis del espectro de Resonancia Magnética Nuclear del protón  $^1\text{H}$  -RMN**

El espectro de  $^1\text{H}$  - RMN, tomado en  $\text{CDCl}_3$ , presenta las siguientes señales (fig. 34).

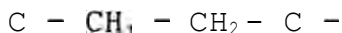
Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Integración
0.52	singulete	3
0.60	singulete	3
0.70	singulete	3
1.05	triplete	2
1.20	triplete	2
1.75	singulete	2
2.30	multiplete	1

El espectro tiene las características de una sustancia **monoterpénica** (53), lo que se verifica por su extrema **volatilidad**.

En campo bajo, se observa ausencia de señales características de compuestos aromáticos y compuestos **insaturados**.

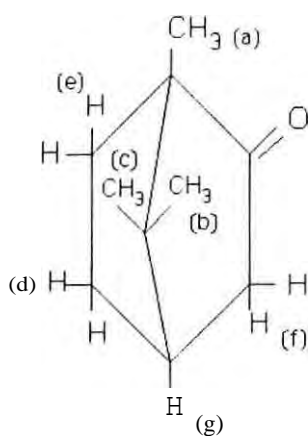
La señal **singulete** a 0.52 ppm corresponde a un metilo cuaternario (53), los dos **singuletes**, ubicados respectivamente a 0.68 y 0.70 ppm corresponden a la presencia de un grupo **gem-dimetilo**, el cual se chequeo con los datos del espectro de IR, en donde efectivamente se observan las señales características de la deformación de un metilo  $-\text{CH}_3$  perteneciente a un grupo **gem-dimetilo** (1390 y 1370  $\text{cm}^{-1}$ ) (52).

Las dos grupos de señales **tripletes** que aparecen a 1.05 y 1.2 ppm corresponden a dos **metilenos** vecinos, tal como se indica en la siguiente estructura:



La señal **singulete** que aparece a 1.75 ppm corresponde a un grupo  $-\text{CH}_3-$ , sin protones vecinos (53).

La integral de área indica un total de 16 protones, de acuerdo a estos resultados se propone como estructura del compuesto P1 al "**alcanfor**"; para verificar se chequeo el punto de fusión del compuesto P1 (176°C), con el punto de fusión del alcanfor (174-180 °C ) (60), habiendo concordancia de datos se verificó la estructura del compuesto P1 como el "alcanfor".



**Alcanfor**

## B. ANALISIS DE RESULTADOS DEL COMPUESTO P2

### 1. ANALISIS DE RESULTADOS POR METODOS CLASICOS

Este compuesto, fue purificado por métodos **cro-**  
**matográficos** del extracto de cloroformo, en don-  
de presenta un color rojo-vino.

El compuesto secado tiene un color rojo violeta  
que cristaliza en forma de agujas, su punto de  
fusión es mayor de 180 °C, es soluble en cloro-  
formo e insoluble en **n-hexano** y éter de petró-  
leo, es muy estable a la luz solar, tiene un va-  
lor de  $R_f=0.73$  en **n-hexano:acetona** (4:1);  $R_f=0.5$   
en **n-Hexano:acetona** (4:1);  $R_f=0.8$  en **n-hexano-  
:acetona** (1:1).

### 2. ANALISIS ESPECTRAL DEL COMPUESTO P2

#### a) Análisis del espectro de Infrarrojo

Su espectro de IR (pastilla de KBr) (Fig.35)  
muestra las siguientes absorciones :

( $\text{cm}^{-1}$ )	Características
3112	banda <b>vibracional</b> de -OH
3060	deformación de -CH aromático
2925, 2860	deformación de C-H, de -CH <sub>1</sub> , y -CH <sub>2</sub> .
1730	estiramiento de CO-CO(s-cis (anillo de 6 miembros)
1645	estiramiento de O=C-C=C
1605	estiramiento de C = C
1370, 1350	deformación de - CH <sub>2</sub>
1075	vibración de =C-O-C
1070	vibración de C-O-C
840	vibración de (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -C=C-

De acuerdo a los datos espectrales, el com-  
puesto tiene los siguientes grupos funciona-  
les: un grupo -OH, a 3112  $\text{cm}^{-1}$ , una señal a  
3060  $\text{cm}^{-1}$ , y a 1605  $\text{cm}^{-1}$ , característico de un  
anillo aromático (40).

La señal ubicada en 1730  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a  
una **dicetona** vecinal presente en un anillo de  
6 miembros, característico en **quinonas** y la  
señal a 1645  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a un **carbonilo**

conjugado con un doble enlace  $O=C-C=C$ , característico en **quinonas** (61), la señal que aparece a 3060  $cm^{-1}$ , pertenece a la deformación de un hidrógeno vinílico (62).

Las señales que aparecen a 1370 y 1075  $cm^{-1}$ , presentados como una señal doble, corresponden a la deformación de un metilo de un **gem-dimetilo** (62).

Las señales que aparecen a 1075  $cm^{-1}$  y 1070  $cm^{-1}$  corresponden a la deformación de grupos, tales como  $=C-O-C$  y  $C-O-C$ , característico de un éter en un anillo cíclico, la señal ubicada a 840  $cm^{-1}$  corresponde a la vibración de un grupo  $(CH_2)_2-C=C-$  (39).

#### b) Análisis del espectro de Resonancia Magnética Nuclear del protón $^1H$ -RMN

Su espectro de  $^1H$  - RMN, tomado en  $CDCl_3$ , presenta las siguientes señales (Fig. 36)

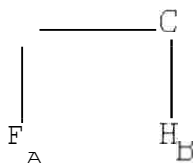
Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Integración
0.70	singulete	3
0.75	singulete	3
1.25	singulete	6
1.5	singulete	9
4.25	multiplete	1
5.9 - 6.25	cuadruplete	2
	sistema AB	
6.8	singulete	1
6.85 - 7.75	multiplete	
8.6	multiplete	1

El espectro de  $^1H$  -RMN es característico de una **quinona** (39).

En campo alto, se observa la presencia de 04 **singuletes**, ubicados respectivamente en: 0.70, 0.75, 1.25, 1.5, lo que indica la presencia de 4 grupos **metilos**, de los cuales las señales a 1.25 y 1.5, corresponden a dos metilos **geminales** sustituidos en carbono con un doble enlace terminal (39).

La señal **multiplete** a 4.25 ppm corresponde a un protón que se acopla con varios protones vecinos (39).

Las cuatro señales que aparecen en el rango de 5.9 - 6.25 ppm, corresponden a un sistema AB en donde se observan dos señales centrales juntas, y dos señales laterales, por lo que se deduce que una parte de la estructura del compuesto presenta la siguiente forma:



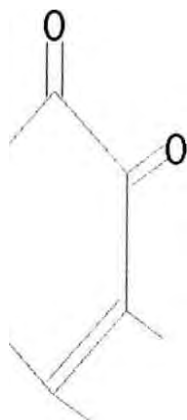
Las señales a 6.8-7.75 ppm corresponden a los protones **sustituídos** al anillo aromático, los cuales se acoplan con los protones inmediatos de un grupo alquilo unidos al carbón contiguo, la señal a 8.6, corresponde a un protón aromático, cuyo desplazamiento a campo bajo se debe a la vecindad de un elemento electro-negativo tal como el oxígeno, característico en las orto **benzoquinonas** (39).

### c) Espectroscopía Ultravioleta Visible

El espectro **UV-visible** del compuesto se tomó en **EtOH** (Figs. 37a, 37b).

En el espectro, se observan tres señales, una de gran intensidad ubicada en 270 nm, la segunda de menor intensidad ubicada a 382 nm, y la tercera a 531 nm.

Por las características espectrales, la estructura del compuesto P2 corresponde a una **benzoquinona** (colorante orgánico), debido a que estas absorben intensamente entre 240-290 nm, y tienen una absorción débil en 380-400 nm, y cuando presentan mayor **insaturaciones** hay otra banda de absorción a longitudes de onda mayores 400-530 nm (45). Se revisó la bibliografía de **quinonas** y se encontró que los compuestos que absorben en los rangos indicados anteriormente, son las orto **benzoquinonas** (de color rojo) los cuales presentan la siguiente estructura parcial característica:



Se chequeo en el espectro de IR, la presencia de **dicetonas** vecinales presentes en **benzoquinonas**, cuya señal aparece en el rango:  $1760 - 1730 \text{ cm}^{-1}$  (47), observándose que efectivamente hay una señal característica en  $1730 \text{ cm}^{-1}$  el cual corresponde al estiramiento de **CO-CO(s -cis)**(anillo de 6 miembros) y la señal a  $1645 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a un **carbonilo** conjugado con un doble enlace  $\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$ , muy característico en **quinonas** (47).

Se revisó la bibliografía de **ortoquinonas** y se encontró que el compuesto llamado "**Biflorina**", tiene las **características** espectrales del compuesto P2 (63), así como también **características** físicas como: sustancia de color rojo violeta, con actividad antibiótica frente a microorganismos **gram-positivos** y ácido resistentes (63). Este compuesto, es muy común en la mayoría de algas rojas que presentan actividad antibiótica (16).

Por todos estos análisis, se propondría la siguiente estructura para el compuesto P2.



## VI. CONCLUSIONES

- .1 **ESPECIE MACROCYSTIS PIRYFERA (ALGA MARINA PARDA)**
- .1.1 **U** El trabajo realizado constituye un primer aporte al estudio químico de compuestos inorgánicos en esta especie de alga marina parda (Pucusana-Perú).
- .1.2 **U** Los residuos de esta especie (después de haber hecho la extracción del ácido **algínico**) se pueden utilizar en la preparación de abonos y fertilizantes, por su alto contenido de minerales y compuestos químicos inorgánicos.
- .1.3 **U** El **ficocoloide** de esta especie es el ácido **algínico**. Se ha determinado un método de extracción óptimo para éste ácido bajo la forma de **alginato** de sodio.
- .1.4 En la estación de verano presentan un mayor contenido de **Laminarina** y **Manitol**, y en el período de invierno presenta menor contenido. La mejor época para la extracción del ácido **algínico** en esta especie, es el período invernal de Lima.
- .1.5 Se ha comprobado que con el transcurso del tiempo, en medio ácido, se logra causar la hidrólisis del ácido **algínico** (polímero) en **dímero** y/o **monómeros** de difícil separación (mezcla de isómeros).
- .1.6 La determinación de la pureza del ácido **algínico**, resulta óptimo por el método de **descarboxilación** (cuantificando el **CO<sub>2</sub>** liberado).
- .1.7 **U** Los resultados obtenidos muestran que esta alga es una excelente fuente de ácido **algínico**, **manitol** y **laminarina**.
- 1.8 También se ha hecho el estudio de hidrocarburos. Estos pueden actuar como indicadores de la contaminación del medio marino por petróleo.
- 1.9 El estudio de principios activos en esta planta resulta muy difícil por la interferencia del ácido **algínico**, ya que se **polimeriza** con todos estos, (se torna insoluble en casi todos los solventes) e imposibilita la purificación de los **metabolitos** secundarios.
- .1.10 Del extracto de éter de petróleo se logró aislar un compuesto amarillento con todas las características de un **flavonoide**, cuya estructura no se ha elucidado, por la presencia del ácido **algínico**, según se pudo comprobar con los datos espectrales de <sup>1</sup>H-RMN.
- 1.11 Se determinó que esta planta contiene otros compuestos **terpénicos** y/o esteroides y ésteres de ácidos grasos (esto se verificó por la formación de una gran cantidad de compuestos saponificados).

- .1.12 No se detectó presencia de alcaloides, ni saponinas.
- .1.13 Se verificó la existencia de un compuesto inorgánico, muy soluble en agua, que interfiere en el estudio de ésta planta.

**ESPECIE GIGARTINA CHAMISSOI (ALGA MARINA ROJA)**

- .1 El trabajo realizado constituye un aporte a un trabajo inconcluso que fue iniciado por una institución peruana.
- 2.2 El **ficocoloide** en esta especie lo constituye el **Carrage-  
no**. El método de extracción que se ha determinado corresponde a la extracción ideal de la fracción **Kappa-  
Carrageno**.
- 2.3 El **carrageno** en su calidad de **polielectrolito aniónico**, forma estructuras mas complejas con otras macromoléculas cargadas positivamente.
- 2.4 A diluciones muy bajas (mezclado con leche), el **ca-  
rrageno** tiene la propiedad de modificar los sabores nivelando tonos ásperos o muy marcados para que resalten otras sensaciones.
- 2.5 La formación de geles es uno de los atributos im-  
portantes de los soles de **carrageno**; para esta función es esencial la presencia de determinados cationes. Los que se han estudiado, anotados en orden decreciente de eficacia, son: potasio, **amonio**, calcio, magnesio y sodio.
- .2.6 Los geles de **carrageno** se vuelven mas fluidos cuando se les calienta y ofrecen mas resistencia al flujo cuando se **enfrian**.
- 2.7 La efectividad del **carrageno** para estabilizar emulsiones de aceite se debe a su capacidad para formar una estructura mecánicamente resistente en la **interfase** aceite-agua.
- .2.8 En presencia del ácido **ascórbico** puede aprovecharse el sistema **redox** del **carrageno** para proporcionar protección contra la oxidación.
- 2.9 El **Kappa-Carrageno** (excepto en forma de sodio), no es soluble en agua fría, presenta baja viscosidad.
- 2.10 Las soluciones de **Kappa-Carrageno** forman un gel entre 45-65°C.
- 2.11 El **Kappa-Carrageno** se usa cuando se requiere geles rígidos.
- 2.12 Del extracto de éter de petróleo, saponificado con **KOH** al 15%, separado del material **insaponificable** se han aislado:
  - Un sólido de color blanquecino identificado como un esteroide.
  - Un sólido de color blanco, cuya estructura no ha podido elucidarse totalmente

- Un sólido de color blanco en forma de agujas de punto de fusión de 212°C. Identificado como un **triterperno pentacíclico** llamado "LUPEOL"

.2.13 Se determinó que la planta tiene gran cantidad de sustancias **triterpénicas** y/o esteroides, así como también ésteres de ácidos grasos (gran cantidad de material **saponificable**)

.2.14 No se detectó presencia de alcaloides, ni de **saponinas**.

## VII. RECOMENDACIONES

### .1 ESPECIE MACROCYSTIS PIRYFERA (ALGA MARINA PARDA)

- .1.1 ⤷ Continuar con el estudio de coloides (ácido algínico) en esta planta. La extracción debe realizarse en los períodos de invierno y primavera, en esta temporada contienen un mayor porcentaje de ácido algínico.
- .1.2 ⤷ Se recomienda hacer un estudio del contenido de Manitol y Laminarina, ya que esta especie es una gran fuente de estos compuestos orgánicos.
- .1.3 Obtener compuestos monoterpénicos e hidrocarburos en mayor cantidad de la fracción volátil de los aceites esenciales y hacer el estudio de separación, purificación e identificación con cromatografía de gases.
- .1.4 Hacer un estudio comparativo de compuestos químicos inorgánicos en otras especies ubicadas en diferentes lugares del país.
- .1.5 ⤷ Elucidar la estructura del compuesto inorgánico (sal soluble en agua), debido a la gran cantidad que interfiere en el estudio de esta planta.

## .2 ESPECIE GIGARTINA CHAMISSOI (ALGA MARINA ROJA)

- .2.1  $\ominus$  Continuar con el estudio de **carrageno** como compuesto de importancia económica industrial, investigar otros métodos de extracción óptimas de las otras fracciones **lambda-carrageno** y **iota-carrageno**.
- .2.2 Hacer un estudio de principios activos (compuestos **triterpenoidales** y **esteroidales**) utilizando **n-hexano** como solvente de extracción
- .2.3 Empezar el estudio de la actividad biológica de este compuesto, estableciendo la relación de los componentes con la función que se le atribuye.
- .2.4  $\ominus$  Hacer un estudio de extracción de aceites esenciales por arrastre con vapor de agua debido a la presencia de un compuesto volátil y aromático.
- .2.5  $\ominus$  Hacer un estudio de compuestos orgánicos en el extracto **metanólico**. Cristales de naturaleza desconocida que se extraen con mucha facilidad pero tienen alta volatilidad.

### .3 ESPECIE PETEROSIPHONIA DENDROIDEA (ALGA MARINA ROJA)

- .3.1 ⤵ Continuar con el estudio químico de *Peterosiphonia dendroidea*, especialmente en el extracto clorofórmico, el cual contiene una mezcla de colorantes rojizos que son muy estables a la luz solar.
- .3.2 ⤵ Obtener los colorantes orgánicos en mayor cantidad y empezar el estudio de su actividad biológica estableciendo la relación de los componentes con la función que se le atribuye.
- .3.3 Hacer un estudio de extracción, separación y purificación de sustancias *monoterpénicas*, ya que se ha comprobado que existe una mezcla de sustancias muy volátiles de olor agradable.
- .3.4 Hacer un estudio de la actividad biológica de las sustancias *terpénicas*.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Cesar **Acleto** O. "Algas Marinas del Perú de importancia económica", Seg. Ed. Museo de Historia Natural "Javier Prado", Departamento de Botánica de la **UNMSM**, 1986.
- (2) Jaramillo María O. "Las algas en Chile": servicio agrícola ganadero subdivisión de pesca y caza, Biología pesquera N°7 1984.
- (3) Zoila Pizarro Balta. "Estudio de actividad biológica de algas marinas". Conferencia Dr. Cesar **Acleto**, II congreso Latinoamericano de **ficologia** marina, Lima-Perú 1991.
- (4) **Kirk Othmer** (eds). "Enciclopedia de Tecnología Química" vol.5. Unión tipográfica Editorial Hispanoamericana, México, (1961).
- (5) **Hector Etcheverry** P. Luis **Lopez**. "Estudios químicos en **Macrocystis pyrifera**. Revista de biología marina, **Valparaiso** Chile, 18(1): p 73-79. 1987.
- (6) **Gordillo G.F.** Estudio comparativo de los diferentes métodos de extracción de **agar-agar** de **Gracilaria Lemanaeformis** Lima-Perú, 1979.
- (7) **Tellez Mejilla Esteban**. "Estudio de **prefactibilidad** para la industrialización de las algas marinas en el Perú 1974".
- (8) **Morales Cruz Raúl Alfredo**. "Variación de las propiedades físicas y químicas de los **ficocoloides** de importancia económica del Perú, Tesis UNA 1988.
- (9) **Frei, E .and R.D.Preston**. "Configuración of **alginic acid** in marine brown **algae**". **Nature** 196: 130-134, 1982.
- (10) **Haug, A.and B.Larsen**. "Estudies on the **composition and properties of alginates**". Proc. **Seaweed. Sym.** 4: 331 **Pergamon press**, N.Y. 1984.
- (11) **Kohler ,B.** "Chemistry of **alginic acid**". Chem. Ind. 73:283-289, 1983.
- (12) **D.J. Faulkner**. Marine Natural Products, " **Natural Products Reports**", 7, 100 - 108; 1990.
- (13) **E. Premuzic**. "Chemistry of **Natural Products derived** from marine **sources**". Edit. Copyright, pp 435-447, USA 1970.



- (14) **Octavio Lecaros P. Jaime Caro P.** "Identificación de hidrocarburos en huiro ( *Macrocystis pyrifera* ) del Estrecho de Magallanes". *Rev. biología marina, Valparaiso*, 3 (2) : 215-229, Diciembre de 1987.
- (15) **D.J. Faulkner.** Marine Natural Products, "Natural Products Reports", 8, 270 - 277, 1991.
- (16) **Dr. Cesar Acleto Osorio,** (Director del Museo De Historia Natural UNMSM ), comunicación oral, 1994.
- (17) **R.G. Kerr and B.J. Baker .**Marine Sterols, "Natural Products reports", Vol. 8, p.270 - 277, 1991.
- (18) **Salam Abdou Kabore, Georges Combaut, Jean Pierre.** "Sterols of the red alga". *Phytochemistry*, vol. 22, N°5, pp 1230-1240. (1983).
- (19) **Dawson, E.Y., C. Acleto and Nija Foldvik.** "The seaweed of Perú Nova Hedwigia". 1964.
- (20) **Vogel's.** "Textbook of macro and semimicro Q. Inorganic Analyses." 5<sup>a</sup> Edición. Editorial Longman, New York, 1982.
- (21) **Tressler Donald.** "Marine products of comerce", Reinhold Publishing Corporation New York, pag 94-105, 1980.
- (22) **Etrickland, D. and T. R. Parsons.** "A practical Handbook of seawater analysis". Fish. Res. Board on Canada, Bull. 167. 1968.
- (23) **Pharmaceutical Products División Standard control procedure** pag. 13 - 14; 1982.
- (24) **Calberg, G.E., Percival, E. and Rahman, M.A.** *Phytochemistry* 17, 1289. (1978)
- (25) **Camacho Chocano Alfredo.** "Extracción y Análisis del Alginato de Sodio". Tesis UNA. Lima-Perú 1978.
- (26) **Chirife, J.y R.Garner.** "Características del secado y estudio químico de algas-especie *Macrocystis pyrifera*". Proc. Int. seaweed. Symp. 6: 671 - 684, 1969.
- (27) **Rondine, R.V. y cousio, J.D.** *Rev de Investigación Agropecuaria INTA*, Buenos Aires. Rep. Argentina. Serie 2. Biología y productos vegetales. VI, 351 (1969).
- (28) **Dominguez, X.A.** "Métodos de investigación Fitoquímica". Editorial Limusa Wiley, pag.88, México (1973).
- (29) **Gibaja Ovideo S.** "Guía para el análisis de los compuestos del carbono". U.N.M.S.M., Lima - Perú (1977).

- (30) Olga Lock de Ugaz "Investigación Fitoquímica", Métodos de estudios de productos naturales, F.E. 1988.
- (31) Ministerio de pesquería. EPSEP. "Estudio de prefactibilidad de industrialización de una planta piloto de carrageno", Lima- Perú ,1978.
- (32) Erazo Tipacti Raúl, "Informe General sobre algas marinas", Dirección de Investigación Científica y Tecnológica de la Sociedad Nacional de Pesquería, Lima-Perú, 1971.
- (33) Peter D. Nichols, Jhon K. Volkman , and R.B. Johns. "Sterols and Fatty acids of the Marine unicelular alga", Phytochemistry, vol. 22, N°6, pp 1447-1452, 1983.
- (34) Ucan Ortuño. "Algas, Curso de Introducción a la Química Industrial", Editorial Barcelona, 1973.
- (35) Serafin Valverde, copias no publicadas en el "Curso de Algas Marinas", dictado en la UNI- 1977.
- (36) Mc.Neely, W.Algín Industrial Gusus, Whistler R. y B. Meller J. Academic Press, INC ,USA . p 55 - 58 - 1981.
- (37) Elizabet Percival, MD. Anisur Rahman and Helmut Weigel "Chemistry of the polysaccharides of the brown seaweed". Phytochemistry, vol 20 N°7 pp 1579 -1582, 1981.
- 38) Stankley K. Freeman. "Interpretative Spectroscopy", USA 1965.
- (39) K. Yamaguchi. "Spectral data of Natural Products". Vol I, Elsevier publising company, Amsterdam London New York, 1970.
- (40) Nakanishi, K.Infrared. "Absortion Spectroscopy". Holden Day. San Francisco (1977)
- (41) Selvy .H.H. and Wynne, W.H. Industrial Gums. "Polysaccharides and their derivatives" (Whistler.R.L.ed) Academic Press, New York,(1973).
- (42) López, A.L., & R.E. Ugarte. "Perfil de distribución de hidrocarburos en: genero PSEUDOCYPHELARIA". Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 27 (2: 286-288.) 1982.
- (43) Harbone, J.B.Mabry, T, J. and Mabry, H. "The flavonoids ". Chapman and Hall, London.1975.
- (44) Mabry ,T.J. Markham,K.R.. and Tomas ,M.B. (1970). "The sistematic identification of flavonoids". Springer verlag Berlín 1975.

- (45) Geissman, T.A., (ed) "The Chemistry of Flavonoid Compounds" (1962).
- (46) Markham, K.R. "Techniques of Flavonoid Identification". Academic Press, London (1982).
- (47) Nakanishi, K. GOTO, T.; Ito, S.; Notori, S., Nozoe, S. "Natural products chemistry". Vol.1. Academic Press. Inc. New York and London. Hodansha LTD, Tokio, (1974).
- (48) Oliver & Boyd, Schwarz. I.C.P. (ed): "Physical Methods in Organic Chemistry", Edimburgo, Londres 1964.
- (49) Boverly, F. A. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy". Bell Telephone Laboratories, Murray Hill. New York, 1984.
- (50) Ahmed A. Ahmed, Tom J. Mabry and Stephen A. Matlin "Flavonoids of the flowers of Silybum Marianum". Phytochemistry vol.28, pp 1751-1753, 1989.
- (51) Moller, H.G. "Algas, Nutrición y Ciencia de los Alimentos", Tesis UNA, 1983.
- (52) W. Simón Clerc. "Elucidación estructural de compuestos orgánicos ". Tomo I, Ediciones Castilla Madrid, 1980.
- (53) F. Scheinmann "An Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds" Edit. Pergamon Press, 1976.
- (54) Manual Espectres IR "ALDRICH". 1981.
- (55) "H-NMR Spectra Catalog". Varian Associates USA. (1963)
- (56) S.C.Sharma, O.P.Sati and R.Chand. "Steroidal saponins of Asparagus Curillus". Phytochemistry, vol.21, N° 7, pp 1711-1714 (1982).
- (57) Halsall, T.C. y Apfen, R.T. "Chemistry of pentacyclic triterpenes". Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe 22. Ed by L. Zechmeister, Springer-Verlag. Viena, (1964).
- (58) Brand, J. C. D. y G. Eglinton. "Applications of Spectroscopy to Organic Chemistry". Oldbourne, Press. Londres, (1965).
- (59) John N.C. Whyte and John R. Englar. "The Agar component of the red seaweed Gelidium Purpurascens". Phytochemistry, vol. 20 pp 237-240, (1981).
- (60) SIGMA, Chemical company, "Biochemicals Organic Compounds". 1992.

- 51) **Dudley H. Williams, M.A., Ph. D., Sc. D. "Spectroscopic methods in organic chemistry". Mc. Graw Hill. Great Britain, 1973.**
- 62) **Phillips, J. P. "Spectra-Structure correlation". Academic Press. Londres, 1964.**
- 63) **Fieser, L. F and Fieser, M. "Química orgánica avanzada" Reinhold Publishing Corporation. New York (1982).**