

Universidad Autónoma
de
Baja California



Facultad de Ciencias Marinas

Aislamiento y Caracterización del Esteroide **Sargasterol** presente en el alga *Sargassum muticum* (Yendo & Fensholt) y su determinación como agente hipocolesterolemico en conejos.



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA :
Ignacio Alberto Gonzalez Trejo

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA JUNIO DE 1990.

RESUMEN

Se obtuvieron extractos etéreos y acetónicos del alga Sargassum muticum según los métodos de Tsuda et. al. (1958) y Reiner et. al. (1962). Se aisló y caracterizó química y espectroscópicamente el contenido de las fracciones insaponificables (fitoesteroles) presentes.

La metodología aplicada constó de tres secciones: en la primera se evaluó el rendimiento de los métodos y se determinó químicamente la presencia de los fitoesteroles presentes. En la segunda se llevó a cabo la caracterización de los esteroles aislados; lo cual consistió principalmente en cromatografías de capa delgada (en cromatofolios y en placas de gel de sílica 60F-254), espectroscopias al infrarojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM). Y por último, se determinó la actividad hipocolesterolemica en conejos de este constituyente químico.

El método de Reiner et. al. (1962) presentó mayor rendimiento, por el cual se aislaron e identificaron, los siguientes compuestos: Sargasterol (*21-alfa-24-etilcolestano-5,24,(28)-dien-3beta-ol*, siendo esta la primera vez que se reporta dicho esteroide en el alga Sargassum muticum), el Fucosterol (*21-beta-24-etilcolestano-5,24,(28)-dien-3beta-ol*), una mezcla de ellos y tentativamente el Δ^7 -Colesteno (Lathosterol), el desmosteroide (colestano-5,24dien-3beta-ol o' 24-Deshidrocolesteroide), y 24-Metilencolesteno (*24-Metilen-5alfa-colestano-3beta-ol*).

El fucosterol como agente hipocolesterolemico presentó una actividad depresiva sobre los niveles de colesterol total en el plasma sanguíneo del 73 %.

SUMMARY

Ethereal and acetonetic extracts were obtained from the algae *Sargassum muticum*, following the methods described by Tsuda et. al. (1958) & Reiner et. al. (1962). The contents of the non saponifiable fractions (phytosteroids) were isolated and characterized chemically and spectrometrically.

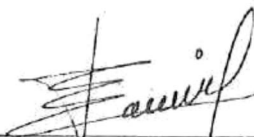
The procedure used was divided in three parts, the first included the evaluation in effectiveness between the two methods and the chemical determination of steroids present in the algae. The second one was done in order to characterize the steroids isolated, which mainly consisted in the application of chromatographic techniques (chromatograms on TLC Silica-Gel 60F-254), IR spectra, NMR & EM data. And the third and last part was done to determine the hypocholesterolemic activity of this chemical compound on rabbits.

The Reiner method et. al (1962) was more efficient by which it was isolated and identified the following sterols: Sargasterol (21-alpha-24 ethylcholesta-5,24(28)-dien-3 beta ol, Fucosterol (21-beta-24 ethylcholesta-5,24(28)-dien-3 beta ol, a mixture of both and also tentatively the Lathosterol, Δ^7 - Cholestenol (Cholest-7en-3beta-ol), Desmosterol, 24 Dehydrocholesterol (Cholest-5-24-dien-3beta-ol), and 24-Methylenecholesterol (24 Methylcholesta-5,24(28)-dien-3-beta-ol.

The Fucosterol as an hypocholesterolemic agent caused a depressive action in plasma cholesterol level of 73 % .

AI SLAM I EN TO Y CA RA C TE RI ZAC I ON DE L E S TE RO I DE
SARGASTEROL PRESENTE EN EL ALGA *Sargassum muticum*
(YENDO & FENSHOLT) Y SU ACTIVIDAD COMO AGENTE
HIPOCOLESTEROLEMICO EN CONEJOS

TESIS
QUE PRESENTA
IGNACIO ALBERTO GONZALEZ TREJO
APROBADA POR



Presidente del Jurado
Química Irma Esthela Soria Mercado



Sinodal Propietario
Dr. José Zertuche G.



Sinodal Propietario
Q.F.B. Eduardo Durazo B



Sinodal Suplente
M.C. Ramón Cajal Medrano



Sinodal Suplente
Uc. Juan A. Fernández A.

*EN EL MAR DEL TIEMPO;
ME MUEVO A TRAVES DEL VIENTO
ETERNO A CADA MOMENTO
GENTIL Y MISTERIOSAMENTE.*

*Y TAN SOLO RECUERDO QUE
NO SOY UNA GRAN ISLA.
SOY UNA PEQUENA OLA MARAVILLOSA
QUE NECESITA DE OTRAS MUCHAS MAS,
PARA FORMAR UN INMENSO OCEANO.*

La parte espectroscópica del presente trabajo se realizó en el Departamento de Química de la Universidad Estatal de San Diego (U.S.A.) bajo la colaboración de los Dres. Lars Hollenberg y Somanatan (S.D.S.U.), la intervención del Dr. Leovigildo Quijano del Instituto de Química de la U.N.A.M. y la colaboración del Dr. Faulkner del Departamento de Oceanografía Química, Scripps (U.C.S.D.).

A G R A D E C I M I E N T O S

A la química Irma Esthela Soria Mercado por su estímulo, y paciencia en la realización de este trabajo, muchas gracias por su apoyo.

A los Dres. Lars, Sománata y Faulkner que sin su colaboración, este trabajo no hubiese contado con toda la información espectroscópicamente con que cuenta. Con todo respeto les brindo mi aprecio. (With all my respect, I appreciate all your attentions, Thank you).

A los oceanólogos Raúl Aguilar, José Zértuche y Juan Fernandez Apango agradezco todas sus atenciones, por su colaboración en la clasificación del material marino, uso de laboratorios e instalaciones del I.I.D. y a sus valiosas asesorías.

A el médico veterinario Zootecnista Joel Nuñez, agradezco sus opiniones, asesorías y su valioso tiempo que dedicó para colaborar en los bioensayos que se realizaron en este trabajo de tesis. Gracias por tu apoyo, amistad y constancia cada vez que la ocupé.

A el Dr. Lorenzo Mosqueda, muchas gracias por su ayuda y colaboración en el planteamiento técnico de los bioensayos y a sus valiosos consejos.

A los Ings. Miguel Gámiz y Regulo López por sus atenciones para llevar a cabo los análisis correspondientes a los bioensayos en las instalaciones del Plantel Conalep y a su apoyo incondicional.

A mis amigos: que siempre compartieron mis alegrías y mis remordimientos, que con su amistad me permitieron seguir adelante conociendo y madurando. Gracias a cada uno de una manera especial:

Eduardo Guerrero Mondoño

Sergio Cordero Blanco

Juan Manuel Lobo Niembro

Roberto Marcos Ramírez

Marco Murillo Betancourt

Octavio Tellez Hirsch

Alejandro Rulz Quintanar

y a todos aquellos que sus nombres se me escapan de la memoria.

Y finalmente a todas aquellas familias Ensenadenses que me brindaron su casa, haciendome sentir como en la mía. Con respeto y con el corazón en la mano se los agradezco:

FAMILIA PINEDA

FAMILIA MONTOYA

FAMILIA BAUTISTA

FAMILIA SALAZAR

FAMILIA AGUIRRE

*A DIOS PADRE, TODO PODEROSO POR DARME LA INTELIGENCIA Y
LA CREATIVIDAD QUE IMPLICITIA LLEVA CONSIGO ESTA TESIS*

A mis padres: Ignacio González Morphy y Aida Trejo de González. Les agradezco a ambos el apoyo, la confianza y todos esos años que dedicaron en forjar mi educación y preparación como hombre de bien. Les ofrezco en cambio esta tesis como símbolo de Superación y respeto del amor que les tengo.

A mis hermanos: Bernardo González Trejo te agradezco tu admiración. Gracias por enseñarme a ver las cosas con la paciencia y con la inteligencia que tu posees.

A ti: Edmundo González Trejo, gracias por tu apoyo durante mis estudios, por tus palabras alentadoras y por demostrarme que la audacia y la perseverancia de los Trejo siempre nos lleva a donde querramos. Te quiero mucho.

Y a ti: Ana Regina González Trejo, querida hermana, tu que siempre estuviste de mi lado, gracias por tus consejos, por tus consejos, por tu cariño y comprensión. Siempre te llevo en mí.

A ti Niny: como dar las gracias en tan pocas palabras con tantos pensamientos y sentimientos de por medio. Admiro y agradezco tu apoyo, paciencia, perseverancia, tenacidad y tu amor que me has venido expresando en estos años.

TE AMO

A mis primos: Leonard Trejo Ryan, Nidia Rodríguez Trejo, y Gerardo Almada Trejo. Mil gracias por su apoyo incondicional, durante mis estudios, por esos consejos, amistad y ayuda que me brindaron. Que les puedo decir ... los aprecio en el alma.

A mis amigos: que siempre compartieron mis alegrías y mis remordimientos, que con su amistad me permitieron seguir

INDICE

1	INTRODUCCION.....	1
1.1	GENERALIDADES	1
1.2	ANTECEDENTES.....	4
2	OBJETIVOS	7
3	DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.....	8
3.1	DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO.....	8
3.2	LOCALIZACION DEL AREA DE MUESTREO.....	8
4	METODOLOGIA	10
4.1	METODO DE COLECTA.....	11
4.2	ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	11
4.3	METODO DE AISLAMIENTO... 11	
4.3.1	EXTRACCION.....	13
4.3.2	CRISTALIZACION.....	15
4.3.3	PURIFICACION.....	15
4.4	METODO DE CUALIFICACION.16	
4.5	CARACTERIZACION.....	16
4.6	DETERMINACION DE ACTIVIDAD HIPOCOLESTEROLEMICA.18	

	4.6.1 PRE - EXPERIMENTO.....	18
	4.6.2 EXPERIMENTO ACTIVIDAD....	19
5	DESARROLLO Y RESULTADOS....	21
	5.1 PRIMERA FASE	21
	5.2 SEGUNDA FASE	35
	5.3 BIOENSAYO.....	50
6	DISCUSIONES	59
	6.1 PRIMERA FASE	59
	6.1.1 FRACCION F1.....	60
	6.1.2 FRACCION F2.....	61
	6.1.3 FRACCION F3.....	63
	6.1.4 FRACCION F4.....	65
	6.1.5 FRACCION F5.....	67
	6.2 SEGUNDA FASE.....	68
	6.2.1 FRACCION A1.....	68
	6.2.2 FRACCION A2.....	69
	6.2.3 HIPOTESIS SOBRE SARGAS- TEROL EN SARGASSUM SP... 71	
	6.3 PRE - EXPERIMENTO Y EXPERIMENTO ACTIVIDAD....	74
	6.3.1 PRIMERA FASE.....	74
	6.3.2 SEGUNDA FASE.....	75
	6.3.3 TERCER FASE.....	76
7	CONCLUSIONES	79
8	RECOMENDACIONES	80

9	ANEXOS.....	82
10	BIBLIOGRAFIA.....	103

LISTA DE TABLAS

TABLA I	PUNTOS DE FUSION DE LAS FRACCIONES F1, F2, F3, F4 Y F5 ..	22
TABLA II	PRUEBA DE LIEBERMANN-BURCHARD	24
TABLA III	PRUEBA DE SALKOWSKI	25
TABLA IV	PUNTOS DE FUSION DE LAS FRACCIONES C1, C2, C3, C4 Y C5 ..	36
TABLA V	CONCENTRADO DE NIVELES DE COLESTEROL EN PLASMA SANGUINEO (PRIMER PRE-EXPERIMENTO)	51
TABLA VI	ASIMILACION DEL COLESTEROL VIA SUBCUTANEA (PRIMER PRE-EXPERIMENTO)	52
TABLA VII	EFFECTOS DEL ACEITE DE ALMENDRAS EN LOS NIVELES DE COLESTEROL EN PLASMA SANGUINEO (PRIMER PRE-EXPERIMENTO)	53

TABLA VIII	EFECTO HIPOCOLESTEROLEMICO EN LOS NIVELES DE COLESTEROL EN PLASMA SANGUINEO DE CONEJOS (EXPERIMENTO ACTIVIDAD).....	56
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MAPA DEL AREA DE ESTUDIO . . .	9
FIGURA 2	METODO DE EXTRACCION I	11
FIGURA 3	METODO DE EXTRACCION II	12
FIGURA 4	ESPECTRO IR DE LA FRACCION F2 . .	26
FIGURA 5	ESPECTRO IR DE LA FRACCION F3 . .	27
FIGURA 6	ESPECTRO IR DE LA FRACCION F4 . .	28
FIGURA 7	ESPECTRO IR DE LA FRACCION F1 . .	30
FIGURA 8	ESPECTRO IR DE LA FRACCION FS . .	31
FIGURA 9	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION F2 .	32
FIGURA 10	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION F3 .	33

FIGURA	11	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION F8	.34
FIGURA	12a	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION C1 (SECCION REDUCIDA)	.38
FIGURA	12b	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION C1 (SECCION AMPLIFICADA)	.39
FIGURA	13a	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION C2 (SECCION REDUCIDA)	.40
FIGURA	13b	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION C2 (SECCION AMPLIFICADA)	.41
FIGURA	14a	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION C3 (SECCION REDUCIDA)	.42
FIGURA	14b	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION C3 (SECCION AMPLIFICADA)	.43
FIGURA	15	ESPECTRO IR DE LA FRACCION A2	.45
FIGURA	16	ESPECTRO RMN DE LA FRACCION A2	.47
FIGURA	17a	ESPECTRO EM DE LA FRACCION A2	.48
FIGURA	17b	ESPECTRO EM DE LA FRACCION A2	.49

FIGURA 18 EFECTO HIPOCOLESTEROLEMICO EN
PLASMA SANGUINEO DE CONEJOS 57

1. INTRODUCCION.-

1.1. Generalidades

La presencia del alga parda Sargassum muticum (Yendo) Fensholt en la costa noreste del Océano Pacífico se debe a la introducción accidental de ésta, pues no es un alga nativa de esta costa (Scagel, 1956). Se encuentra distribuida sobre la costa pacífica de Norteamérica (Canadá) hasta Punta Abreojos Baja California Sur, México (Aguilar-Rosas, 1985).

Los esteroides o fracciones esteroidales en las algas pueden ser uno de estos constituyentes químicos aprovechables. Estos esteroides presentan una gran diversidad en sus actividades, como anestésicos, tóxicos, antibacteriales, antifungales y agentes hipocolesterolémicos entre otros (Hoppe, 1979; Baslow, 1979 y Scheuer, 1987).

Al igual que todos los esteroides de origen animal y vegetal, esta clase de sustancias contiene un grupo químico llamado ciclopentano-perhidro-fenantreno, además de una cadena hidrocarbonada y un grupo alcohol. Por lo general los esteroides algales contienen de 27-31 átomos de Carbono incluyendo su cadena hidrocarbonada donde se encuentran grupos metilo, etilo, etc, (Domínguez 1979). Con respecto a la función que desempeñan éstos en los vegetales, ha sido demostrado que la biosíntesis y metabolismo de esteroides

presentan el mismo propósito que en los demás organismos vivientes, (Heftmann 1971). A su vez la existencia de una relación biosintética entre los esteroides, y su similitud estructural, permite la formación de isómeros, epímeros y rotámeros. Aun así el tipo de fitoesteroides presentes en algas cafés (Phaeophytas) son representativos de estos vegetales marinos, (Patterson 1967 y 1971).

Se ha determinado que una serie de esteroides presentan lo que se conoce como actividad hipocolesterolémica. La cual se refiere a la disminución del nivel de colesterol (mg/dl) en el plasma sanguíneo. Esto probablemente debido a la inhibición de la absorción, y/o el metabolismo del colesterol (Reiner et. al., 1962).

Este tipo de actividad ha sido detectada por el consumo de ciertos alimentos como la avena entre otros o bien inducida a través de sustancias (posibles fármacos), siendo para este caso algunos derivados esteroidales como el colestanol, la vitamina A, y aceites de pescado, o bien también algunos fitoesteroides como el beta-sitosterol, ergosterol, stigmasterol etc. Los cuales han sido probados con ratas, pollos y otros animales inferiores (Beveridge et. al., 1958; Reiner et. al., 1962; Wood 1960 y Reiner et. al., 1960).

Estos esteroides pueden ser el sustituto de los fármacos que hoy en día se utilizan como agentes hipocolesterolémicos. Ya que estos fármacos, hipolipemiantes, al disminuir los niveles elevados de lípidos sanguíneos (colesterol entre otros) conocidos como lipoproteínas de baja densidad (LDL's), presentan efectos colaterales en potencia, Mientras que la utilización de fitoesteroides (de origen natural) pueden reducir dichos efectos colaterales (Monmaney 1988)..

1.2. ANTECEDENTES

Ha sido reportado que los agentes hipocolesterolémicos provienen de algas marinas, como *Fucus evanescens*, *Fucus gardneri*, *Pelvetia wrightii*, *Sargassum muticum* y algunas otras las cuales presentan esta actividad, cuyo origen radica en sus esteroides característicos, (Reiner et. al., 1962).

Los principales agentes hipocolesterolémicos en las algas cafés son el fucosterol que a su vez es el principal esteroide en las algas cafés (Tsuda et. al., 1958-a; Miller, 1962 e Ikekawa, et. al., 1966) y también el sargasterol, stigmasterol y el *B*-sitosterol. Los cuales a su vez presentan una estrecha relación estructural con el fucosterol y el 24-metilen-colesterol, (Patterson, 1967). Dicha relación tan estrecha sugiere una interacción biosintética (precursor) de dichos esteroides.

El sargasterol fue aislado por primera vez por Tsuda et. al., (1957, 1958) del alga *Sargassum ringgoldianum*. A su vez se estableció que era el principal esteroide constituyente de esta alga Phaeophyta. Posteriormente Gupta, (1967) aisló nuevamente el sargasterol de la especie mencionada anteriormente. Sin embargo en otros estudios, Ikekawa et. al., (1966) y Reiner et. al., (1962) no pudieron aislar el sargasterol de la especie mencionada y para la especie *S. muticum* tentativamente se aisló una mezcla de sargasterol

y fucosterol. Estos hechos han dado la pauta a buscar la presencia de este esteroles en S. ringgoldianum y en otras especies del mismo género, como S. muticum. En este trabajo se pretende aislar el sargasterol mediante las metodologías de Reiner et. al., (1962) y la de Tsuda et. al., (1958). Sin perder la oportunidad de poder calificar desde un punto de vista cualitativo ambos métodos. Teniendo en cuenta a Goodwin (1974), quien plantea que el sargasterol es el principal esteroles en S. ringgoldianum, lo cual no ha sido confirmado, por lo que sugiere que el sargasterol no existe en forma natural.

Se tiene que el fenómeno de ciclización del escualeno, muestra que es posible la existencia de otros esteroides de origen marino cuya configuración también es *alfa* como 20 isoeuphol (tirucallol) y el haliclonaesteroles. Lo cual plantea la posibilidad de considerar al sargasterol como una forma precursora de su rotámero (el fucosterol). Sin dejar de atender a la consideración que el fucosterol es el más estable; la factibilidad de continuar la biosíntesis hacia otros esteroides es consecuente. Dado que como lo menciona Patterson (1967), a partir de este esteroles se derivan otros esteroides cuya configuración es *beta* en el Carbono C-20.

Reiner, et. al., (1962) detectó una acción depresiva del 83% con el uso de fucosterol y del 54% con los esteroides de Sargassum muticum en la reducción del colesterol en el plasma sanguíneo de pollos. De lo anterior se infiere que las algas marinas puedan ser una fuente potencial de compuestos esteroideos que poseen la habilidad de reducir los niveles de colesterol en la sangre. Por lo que es de interés determinar si efectivamente el sargasterol presenta una actividad hipocolesterolemica.

2. OBJETIVOS.-

Aislar el esteroi Sargasterol a partir de el alga Sargassum muticum (Yendo) Fensholt.

Comparar el rendimiento en el aislamiento de esteroides mediante la utilización de las metodologías de Tsuda et. al., (1958) y Reiner et. al. (1962).

Caracterizar al esteroi mediante técnicas químicas y espectroscópicas.

Determinar su actividad como agente hipocolesterolemico en el plasma sanguíneo de conejos.

3. DESCRIPCION Y LOCALIZACION DEL AREA DE ESTUDIO

3.1 Descripción Del Area De Estudio

La Bahía de Todos Santos Baja California, se localiza en el extremo NW de la Península de Baja California (México), entre los $31^{\circ} 43'$ y $31^{\circ} 54'$ Latitud Norte y entre los $116^{\circ} 36'$ y $116^{\circ} 49'$ Longitud Oeste (Fig. 1). Se trata de una bahía abierta, limitada al Norte por Punta San Miguel, al sur por Punta Banda, al este por la playa que va desde la rada portuaria hasta la boca del Estero de Punta Banda y al oeste por las islas de Todos Santos (Secretaría de Marina, 1974).

3.2 Localización Del Area De Muestreo

El Área de muestreo se localizó en la costa norte de la Bahía de Todos Santos, aproximadamente a unos 3 km de la rada portuaria, frente al Hotel Carioca, está formada por roca ígnea, principalmente basalto y andesita (Secretaría de Marina, 1974), con pendiente regular, semiexpuesta a la acción del oleaje y recibiendo descargas domésticas locales. Se escogió esta Área atendiendo principalmente a que se trata de una localidad donde todo el año se encuentra el alga.

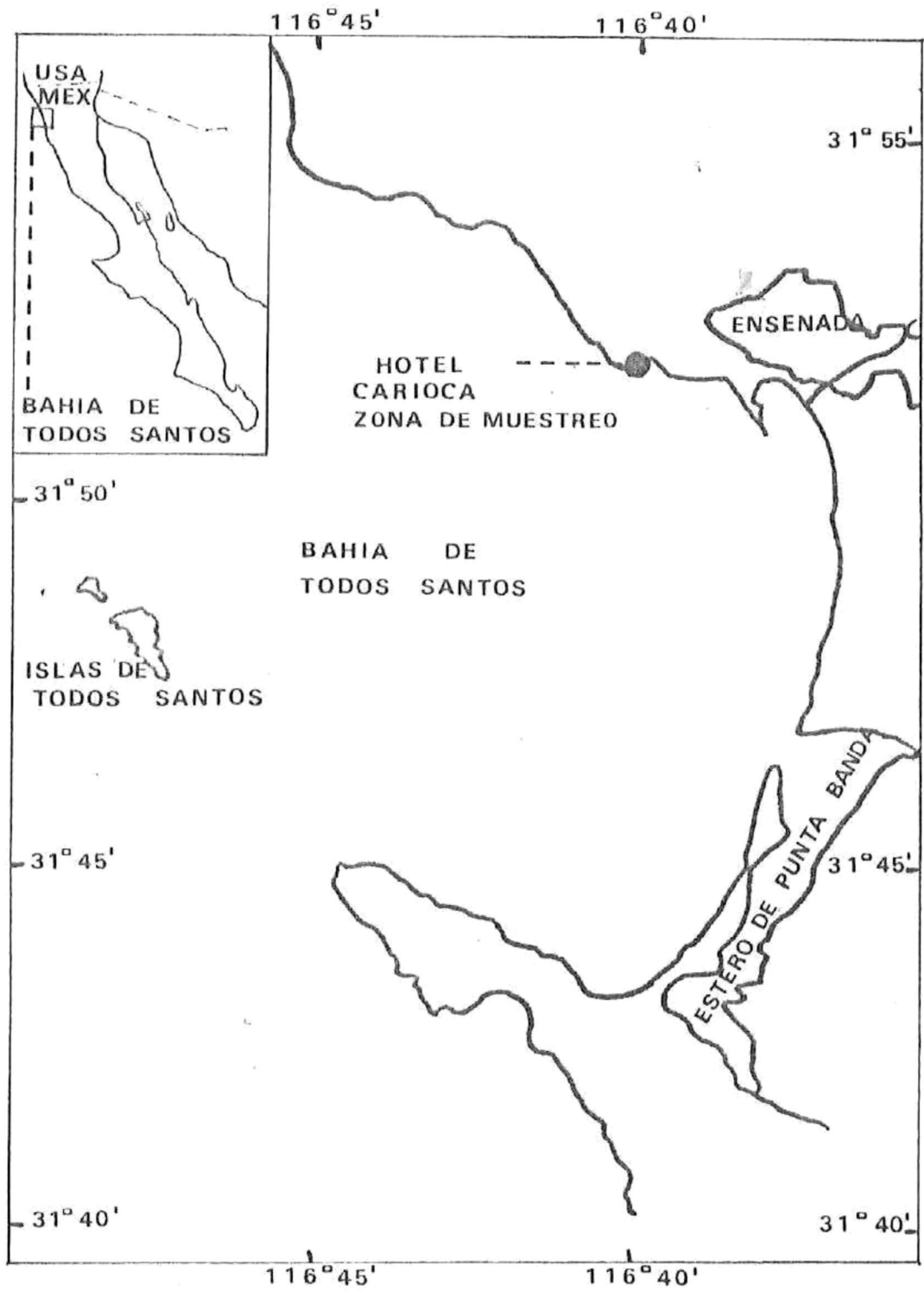


FIGURA 1 Mapa del area de estudio

4. METODOLOGIA

4.1. Método De Colecta

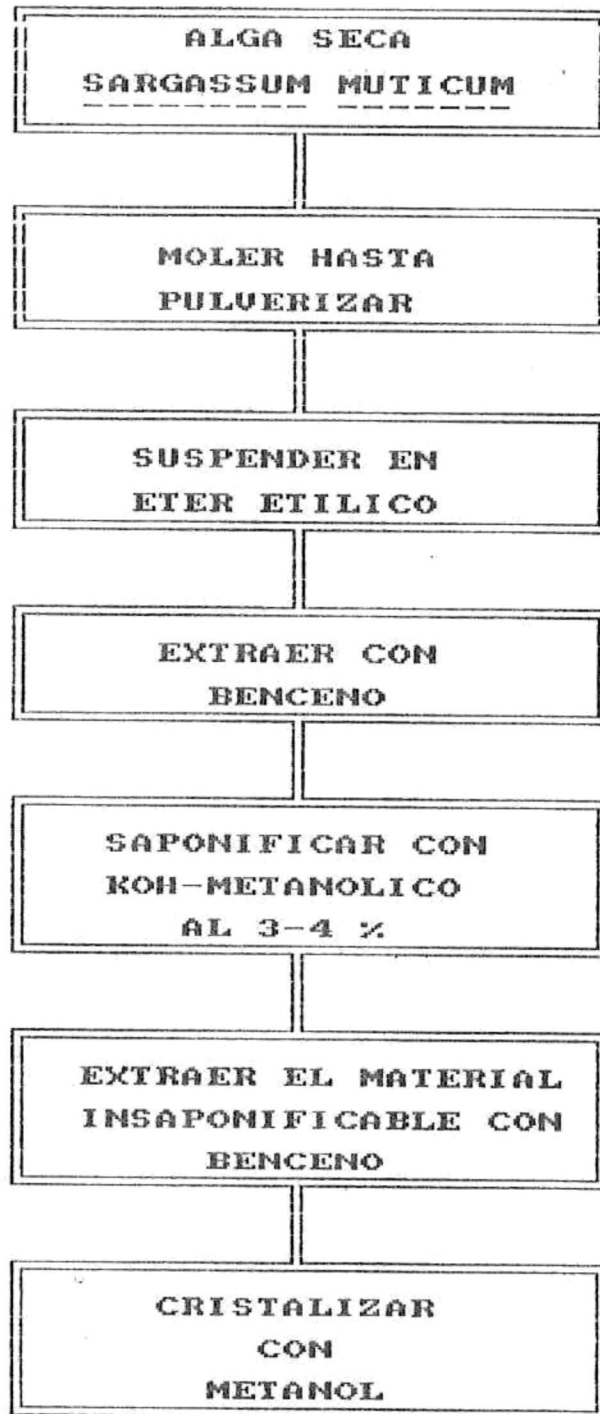
El método de colecta utilizado fué muestreo al azar, sin ningún tipo de discriminante. Las muestras de Sargassum muticum fueron colectadas manualmente durante las mareas mas bajas de los meses de Octubre (1986), Abril y Mayo (1987). Los ejemplares fueron cortados desde la base inferior, y se les caracterizó como M1, M2 y M3.

4.2. Acondicionamiento De Las Muestras

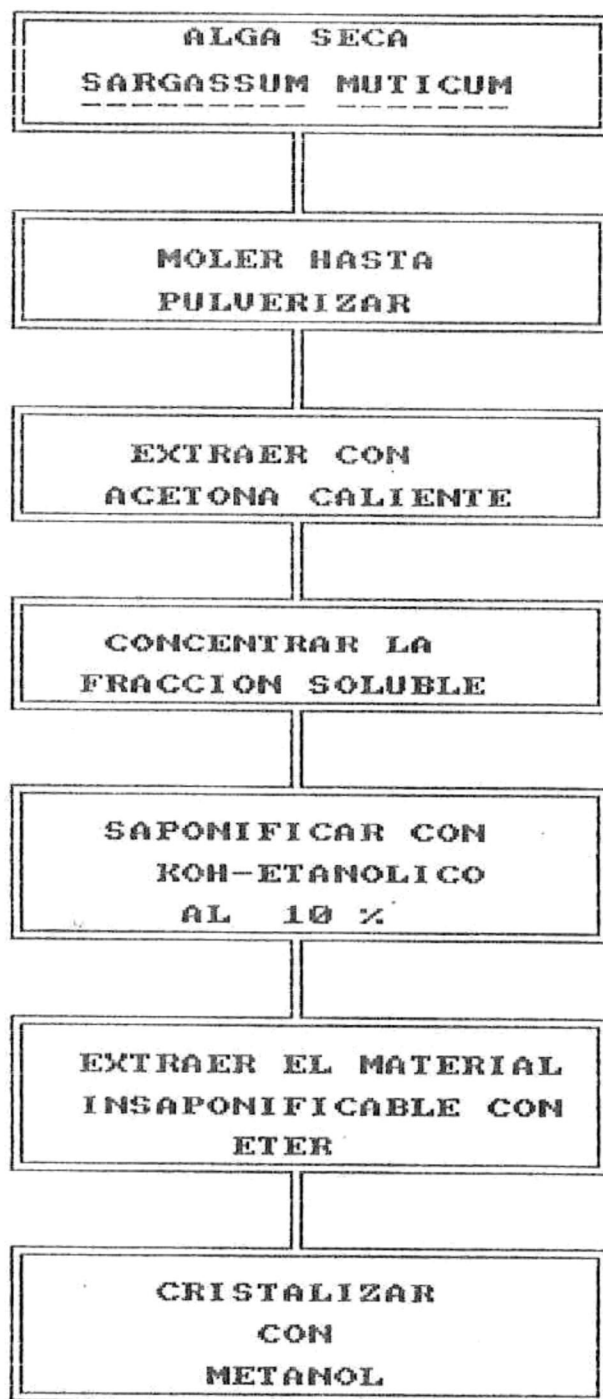
Las muestras fueron trasladadas a la Facultad de Ciencias Marinas y secadas al sol de 3 a 7 días hasta obtener una consistencia quebradiza en ellas. Después se procedió a limpiar las algas secas, donde se retiraron de ellas en cuanto fué posible todas las algas epifitas, así como pedazos de pastos marinos, enseguida se molieron y se guardaron en bolsas de plástico (de cierre hermético) a temperatura ambiente para su posterior análisis.

4.3. Metodo De Aislamiento

Para el aislamiento del Sargasterol se utilizaron dos métodos. El método de Tsuda et.al., (1958a), ver Fig. 2 y el método de Reiner et. al., (1962) ver Fig. 3.



F I G U R A 2 METODO DE EXTRACCION 1



F I G U R A 3 METODO DE EXTRACCION 2

Lo cual se desarrolló en dos fases; la primera para observar el rendimiento de cada uno de los métodos propuestos. Dejando así la segunda fase para el aislamiento del esterol en cantidades necesarias para llevar a cabo su prueba de actividad.

4.3.1 Extracción

Primera Fase

Para llevar a cabo esta fase se utilizaron las algas del primer muestreo (M1), del cual se obtuvieron 400 gramos de alga seca. Se trataron dos submuestras cada una de 200 gramos. Con la primera de ellas (M1-1) se realizó la extracción por el método de Tsuda (op. cit.) y la segunda submuestra (M1-2) se extrajo por el método de Reiner (op. cit.).

La submuestra M1-1 se suspendió en éter étilico por una semana, posteriormente se concentró el extracto por medio de una destilación simple de ahí se procedió a efectuar una saponificación (exhaustiva la cual fué monitoreada mediante cromatografías en cromatofolios) utilizando como solución saponificadora hidróxido de potasio metanólico al 4%. La

Lo cual se desarrolló en dos fases; la primera para observar el rendimiento de cada uno de los métodos propuestos. Dejando así la segunda fase para el aislamiento del esterol en cantidades necesarias para llevar a cabo su prueba de actividad.

4.3.1 Extracción

Primera Fase

Para llevar a cabo esta fase se utilizaron las algas del primer muestreo (M1), del cual se obtuvieron 400 gramos de alga seca. Se trataron dos submuestras cada una de 200 gramos. Con la primera de ellas (M1-1) se realizó la extracción por el método de Tsuda (op. cit.) y la segunda submuestra (M1-2) se extrajo por el método de Reiner (op. cit.).

La submuestra M1-1 se suspendió en éter étilico por una semana, posteriormente se concentró el extracto por medio de una destilación simple de ahí se procedió a efectuar una saponificación (exhaustiva la cual fue monitoreada mediante cromatografías en cromatofolios) utilizando como solución saponificadora hidróxido de potasio metanólico al 4%. La

fracción saponificable fue extraída con agua como disolvente mientras que con lavados bencénicos se extrajo la fracción insaponificable, los cuales se reunieron y se concentraron por medio de una destilación a presión reducida.

La submuestra M1-2 se puso a reflujo con acetona, posteriormente fueron concentrados los extractos y se llevó a cabo el mismo procedimiento ya descrito, diferenciándose de la muestra anterior en el uso de KOH 10% etanólico como solución saponificadora y se lavó con éter la fracción insaponificable fueron etéreos.

Segunda Fase

Esta fase se enfocó a la purificación del sargasterol en cantidades suficientes para la determinación de su actividad como agente hipocolesterolémico.

Para llevar a cabo dicha fase se utilizaron las algas correspondientes al segundo y tercer muestro (M2 y M3) de los cuales se obtuvo un kilogramo de alga seca. A esta nueva muestra se le nombró como M2,3-1, la cual fue tratada y extraída por el método de Reiner et. al., (1962).

4.3.2. Cristalización

La cristalización del extracto, se efectuó utilizando una mezcla de disolventes, metanol-éter etílico (2:1, 2.5:1 y 3:1). Los esteroides se purificaron a través de repetidas cristalizaciones hasta obtener los cristales de color blanco. Los criterios que se tomaron para formar las fracciones para ambas fases fue el tiempo de cristalización, la morfología de los cristales y su coloración.

4.3.3. Purificación

Las fracciones aisladas en la segunda fase se disolvieron en éter etílico y se purificaron mediante cromatografía en capa delgada, donde se utilizaron placas de gel de sílice 60-F-254 de 0.25 mm de espesor y la utilización de una mezcla de benceno-cloroformo (3:2) como eluyente. Como revelador se empleo sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N. Localizadas las manchas, se rasparon de las placas y se suspendieron en acetato de etilo para extraer el compuesto y separarlo mediante una filtración al vacío. La muestra se concentró por medio de una destilación a presión reducida. El compuesto obtenido fue cristalizado nuevamente por la metodología ya descrita y monitoreado en cromatofolios y en placa delgada, revelando con vapores de yodo.

4.4. Métodos de Cualificación

A todas las fracciones de la primera fase (F1,F2,F3,F4, y F5) se les determinó punto de fusión mediante un aparato Typical Melting Point Apparatus Modelo No.MP12615. En las fracciones de la Segunda Fase (C1,C2,C3,C4,C5,A1 y A2) se utilizó un aparato de punto de fusión Electrothermal 360 (Melting Point Apparatus). Así mismo se determinó la solubilidad de todas las fracciones en agua, metanol, éter etílico y cloroformo. La coloración de sus cristales y su morfología se evaluó cualitativamente de acuerdo a las tablas de cristalografía de Font-Altava (1972).

Posteriormente para la primera fase se realizó un análisis cualitativo para esteroides representado por las pruebas de Liebermann-Burchard y Salkowski, (Dominguez, 1979).

4.5. Caracterización

La caracterización se realizó en las fracciones aisladas, mediante espectroscopías de Infrarojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas. Cabe señalar que únicamente se obtuvo el espectro de masas para la fracción A2 y espectros de resonancia magnética nuclear para las fracciones F2,F3,F5 y fracciones C1,C2,C3 y A2.

Las espectroscopías de infrarojo (IR) fueron realizadas en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo 1330 en la Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.). Se corrieron los espectros de las fracciones en forma de pastillas con KBr y en emulsión (con fluorolube y nujol).

Las espectroscopías de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en la Universidad Estatal de San Diego (SDSU) en la Facultad de Química y en la Universidad de California (UCSD) en el Instituto de Oceanografía (SCRIPPS). Las muestras se corrieron en cloroformo deuterado (como disolvente), con escala sencilla y expandida. Utilizando como referencia el Tetrametilsilano (TMS), y con un tiempo de barrido de cinco minutos.

Las espectroscopías de infrarojo, resonancia magnética nuclear y de masas de la fracción A2 se realizaron en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El espectro infrarojo se corrió en solución de cloroformo, mientras que el espectro de resonancia se obtuvo con escala sencilla e integrada, utilizando cloroformo deuterado como disolvente (CDCl₃).

Todos los datos generados por los espectros fueron comparados y evaluados con respecto a las tablas espectrales de Pretsch et. al. (1983).

4.6 Determinación de Actividad Hipocolesterolemica

4.6.1 PRE-EXPERIMENTO

Se realizó un pre-experimento inicial con la finalidad de estructurar un diseño adecuado para el experimento de actividad. El cual constó de tres fases. La primera consistió en realizar un monitoreo de la concentración de colesterol total (mg/dl) en plasma sanguíneo de conejos por la reacción de Liebermann-Burchard de acuerdo a Beveridge et. al., (1958). Para el cual se utilizaron tres grupos de 3 conejos (adultos) cada uno, bajo condiciones normales de alimentación. En la segunda y tercer fase fueron utilizados los mismos tres grupos de conejos, cabe aclarar que estos estaban conformados por cuatro conejos machos y cinco conejos hembras. En el cual un grupo sirvió como testigo (para ambas fases), otro al que se le suministró una dosis subcutánea de 1.00 ml de aceite de almendras (para evaluar si el medio oleoso influye en la determinación de colesterol o bien si la dosis llegaba a ser letal) y al tercero al que se le suministró la misma inoculación pero con una concentración de 0.10 a 0.20 gramos/ml de colesterol (para evaluar el porcentaje de colesterol asimilado). Al final del periodo establecido para

cada una de las fases anteriormente descritas (72 horas para primer fase y 96 horas para la segunda y tercera fase), se tomaron muestras de sangre y se determinaron sus concentraciones de colesterol total. Dicha muestra fué tomada de la vena auricular utilizando una jeringa insulínica. Se extrajo aproximadamente un mililitro de sangre de cada organismo. Las muestras de sangre fueron colocadas en un baño a 37 °C por un período de 10 minutos con objeto de coagular la sangre. Una vez ocurrido esto fueron centrifugadas las muestras a 4,000 RPM por 25 minutos para obtener el suero sanguíneo, para la determinación de colesterol total. Cada muestra fué analizada por triplicado.

4.6.2 EXPERIMENTO ACTIVIDAD

Una vez realizadas las fases del pre-experimento se prosiguió a llevar a cabo el experimento para la determinación de la actividad hipocolesterolemica del compuesto aislado.

Este experimento consistió en utilizar tres grupos de tres conejos adultos cada uno (cuatro machos y 5 hembras). En el cual el primer grupo sirvió como testigo. El segundo grupo se le suministró colesterol a razón de 0.10-0.20 gramos/ml por conejo vía oleosa (volumen inoculado 1.0 ml) y el tercer grupo fué dosificado con la misma cantidad de colesterol más una dosis (0.10 mg) del compuesto aislado. Al término del

período de 72 horas, se procedió a tomar muestras de plasma sanguíneo de los conejos para poder determinar la concentración total de colesterol presente, y así poder determinar el porcentaje de actividad hipocolesterolémica. La metodología fue igual a la anteriormente mencionada, las muestras de sangre fueron tomadas al inicio y cada 24 horas hasta el período establecido.

Una vez obtenidos los resultados para cada intervalo de tiempo (inicio, 24 hrs., 48 hrs., y 72 hrs.) . Se realizó un análisis estadístico no paramétrico dadas las condiciones en las que se efectuó el pre-experimento y experimento de actividad. Dicho análisis consistió en tratar los datos de las fases experimentales con la prueba de Kruskal-Wallis, para determinar su variación significativa seguida de la prueba de Wilcoxon para cada grupo y así poder determinar a cual de ellos se le atribuye las variaciones significativas (Siegel, 1986) .

5. DESARROLLO Y RESULTADOS

5.1. PRIMERA FASE

Las extracciones de la submuestra M1-1 (método de Tsuda) presentò una coloraciòn vino; mientras que en la submuestra M1-2 (método de Reiner) se observò una coloraciòn verde, en presencia de luz ultravioleta (UV) se distinguiò un color vino. En esta fase se obtuvieron tres fracciones esteroidales las cuales se nombraron como F3, F4, y F5 respectivamente a partir de la submuestra M1-1, mientras que para la submuestra M1-2 se obtuvieron dos fracciones, las cuales se denominaron como F1 y F2.

La fracciòn F1 estuvo constituida por cristales de color blanco opaco con punto de fusiòn 127-129 °C, y la fracciòn F2 presentò cristales casi transparentes con una ligera coloraciòn amarillenta y con un punto de fusiòn de 129-131 °C. La fracciòn F3 presentò unos cristales de color amarillento con punto de fusiòn 120-122 °C, la fracciòn F4 cristales de color café con punto de fusiòn 113-115 °C y la fracciòn F5 cristales de color blanco opaco con un punto de fusiòn 110-113 °C, (Tabla I).

T A B L A I

PROPIEDADES FISICAS DE CRISTALES DE LAS
FRACCIONES DE LA MUESTRA M-1

CRISTALES	COLOR	FORMA	PUNTO DE FUSION
F1	BLANCO	AMORFO	RANGO 127-129 °C
F2	AMARI.	HOJUE.	RANGO 129-131 °C
F3	AMARI.	-----	RANGO 120-122 °C
F4	CAFES	AGUJAS	RANGO 113-115 °C
F5	BLANCO	-----	RANGO 110-113 °C

ABREVIACIONES:

AMARI. ⇒ AMARILLO

HOJUE. ⇒ HOJUELAS

Todas las fracciones F1, F2, F3, F4 y F5 se comportaron con mayor solubilidad en disolventes no polares. Las reacciones colorimétricas de dichas fracciones dieron resultados positivos para ambas pruebas (Tabla II y III).

Aunque las fracciones F1 y F2 dieron resultados positivos sus coloraciones fueron más intensas comparadas con respecto a las otras fracciones, especialmente en la prueba de Salkowski.

Las espectroscopías al infrarrojo correspondientes a las fracciones F2, F3 y F4 (Figs. 4, 5 y 6) presentaron absorciones características entre $3650-3590\text{ cm}^{-1}$ debido a grupos OH con puente de hidrógeno intermolecular, señales entre $2960-2850\text{ cm}^{-1}$ debido a grupos alcanos ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$) y señales entre $1485-1445\text{ cm}^{-1}$ debido a grupos alcanos de tijera ($-\text{CH}_2-$) o bien un grupo alcohol. Y señales particulares para la fracción F2 (Fig. 4) entre $1370-1365\text{ cm}^{-1}$ debido a grupos gem-dimetilos (isopropilo) y entre $840-790\text{ cm}^{-1}$ debido a grupos alcano (etilo). Para F3 (Fig. 5) presentó señales particulares entre $1680-1620\text{ cm}^{-1}$ debido a dobles enlaces. La fracción F4 (Fig. 6) también presentó la señal en $1370-1365\text{ cm}^{-1}$ debido a grupos gem-dimetilos (isopropilo).

T A B L A II PRUEBA DE LIEBERMANN-BURCHARD

FRACCIONES	PRUEBA DE LIBERMANN		BURCAHRD.
	Resultado	Color	Intensidad
F1	POSITIVA	Amarillo-Violeta	Intensa
F2	POSITIVA	Amarillo	Media-Intensa
F3	POSITIVA	Verde	Media-Intensa
F4	POSITIVA	Azul-Verde	Debil
F5	POSITIVA	Azul-Verde	Intensa

T A B L A III PRUEBA DE SALKOWSKI

FRACCION	PRUEBA DE SALKOWSKI.		
	Resultado	Color	Intensidad
F1	POSITIVA	Anaranjado	Media-Intensa
F2	POSITIVA	Anaranjado- Rojo	Intensa
F3	POSITIVA	Amarillo	Debil
F4	POSITIVA	Amarillo	Debil
F5	POSITIVA	Amarillo	Debil

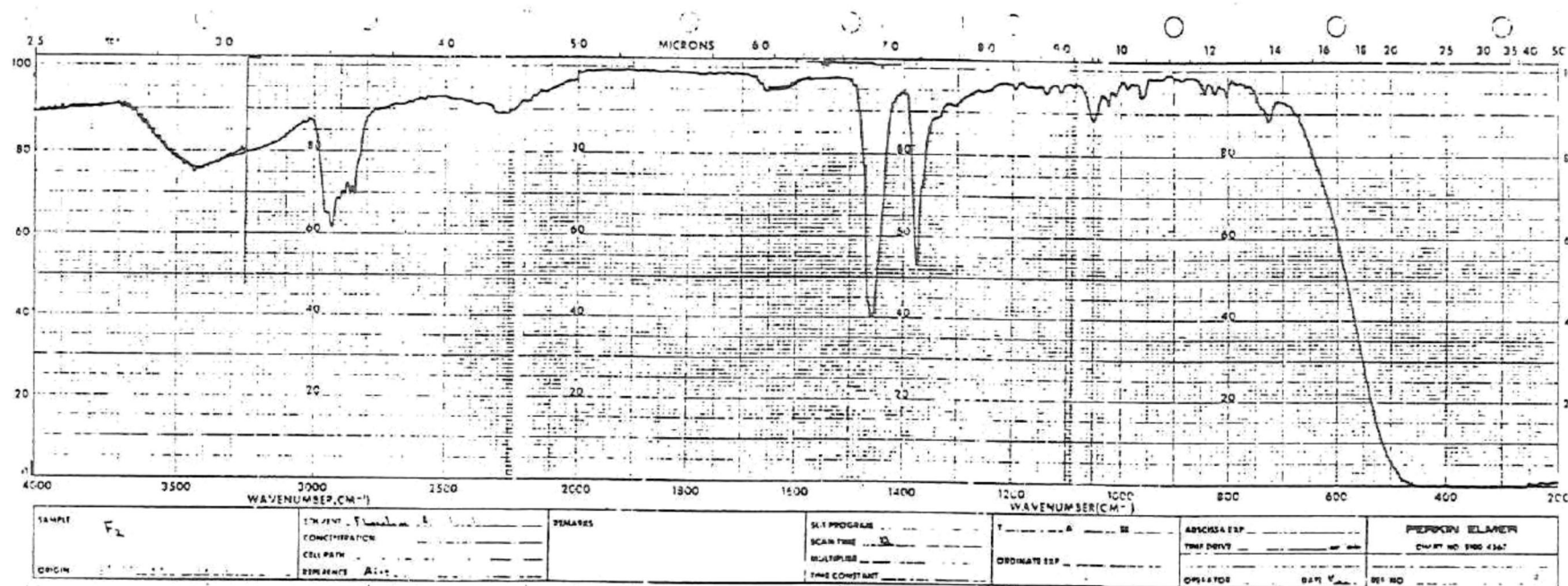


FIGURA 4 Espectro IR de la Fraccion F2

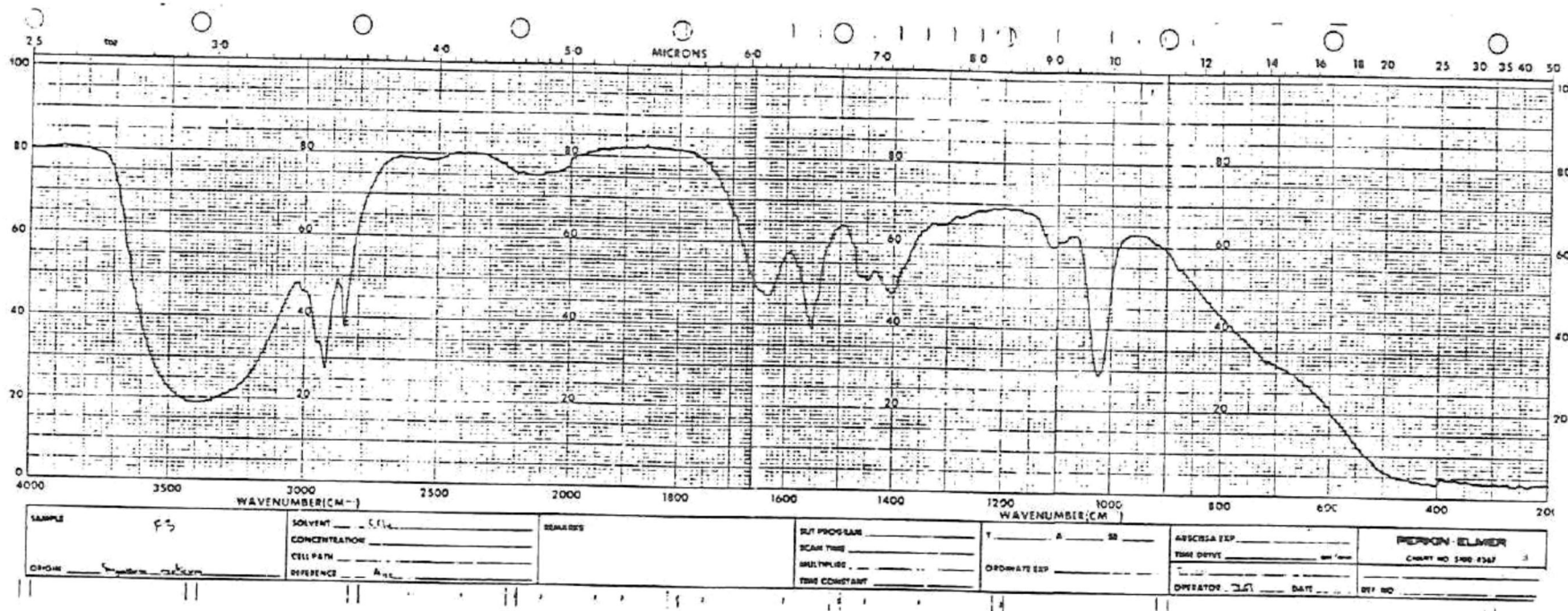


FIGURA 5 Espectro IR de la Fraccion F3

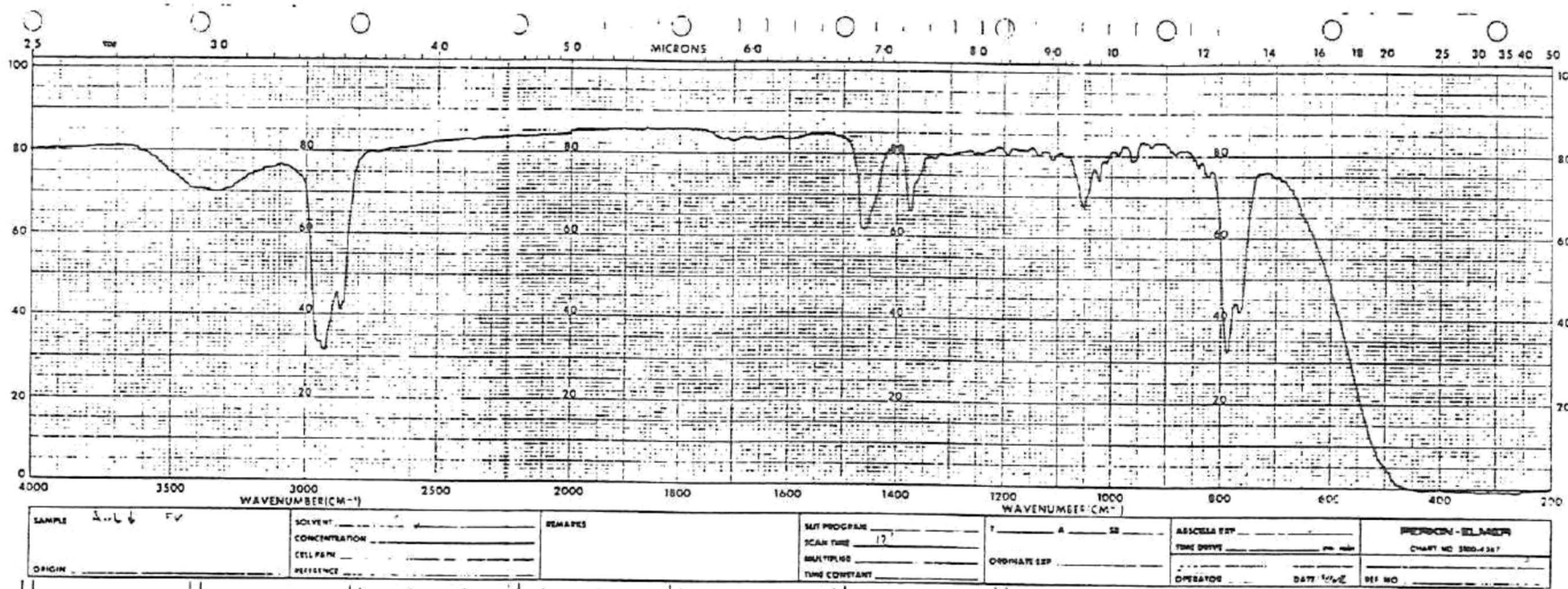


FIGURA 6 Espectro IR de la Fraccion F4

Por otra parte los espectros infrarojo de las fracciones F1 y F5 (Figs. 7 y 8) registraron señales comunes entre 2960-2850 cm^{-1} debido a grupos alcanos ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$) y 1485-1445 cm^{-1} debido a grupos alcanos de tijera ($-\text{CH}_2-$). Y señales particulares para la fracción F5 (Fig. 8) entre 1718-1704 cm^{-1} debido a grupos cetónicos (anillo de 5 miembros) o ácidos carboxílicos (alfa, beta insaturados alifáticos). Y señales entre 1385-1380 cm^{-1} debido a grupos gem-dimetilos (isopropilo).

Las espectroscopias de resonancia magnética nuclear (RMN) para las fracciones F2, F3 y F5 (Figs. 9, 10 y 11). Presentaron las siguientes señales, para la fracción F2 (Fig. 9) señales simples, dobles y multiples entre 0.56-2.08 ppm debido a protones de metilo y metileno, también se registraron dos señales simples (singuletes) entre 0.61-1.26 ppm debido a protones metilo de la forma CH_3C y $\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}$, y una señal multiple (multiplete) entre 4.8-5.1 ppm debido a los protones olefinicos de la forma $-\text{C}=\text{CH}_2-$, $-\text{C}=\text{CH}-$ Y $-\text{C}=\text{CH}-$ (cíclico).

Para las fracciones F3 y F5 (Figs. 10 y 11) se observa el mismo patrón de desplazamiento, ambos presentaron absorciones entre 0.56 - 2.31 ppm así como las absorciones para doble enlaces olefinicos registrándose como una señal múltiple a 4.96 - 5.36 ppm.

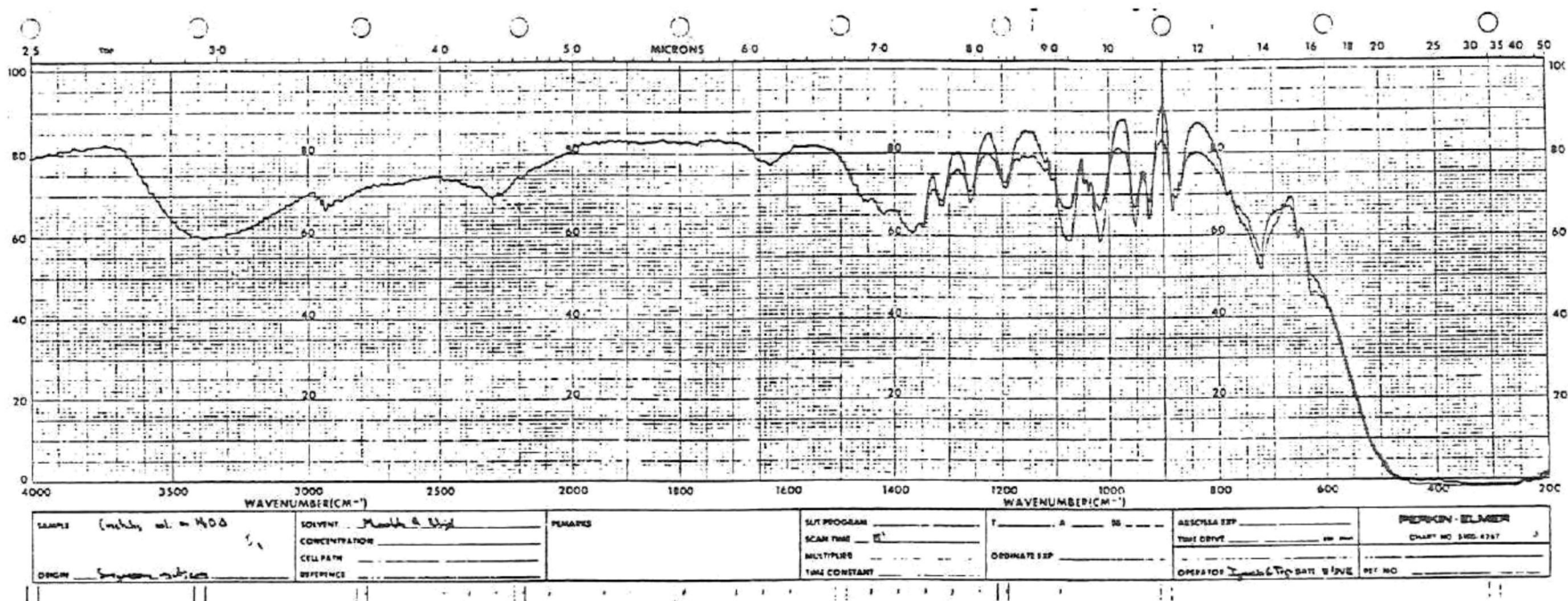


FIGURA 7 Espectro IR de la Fraccion F1

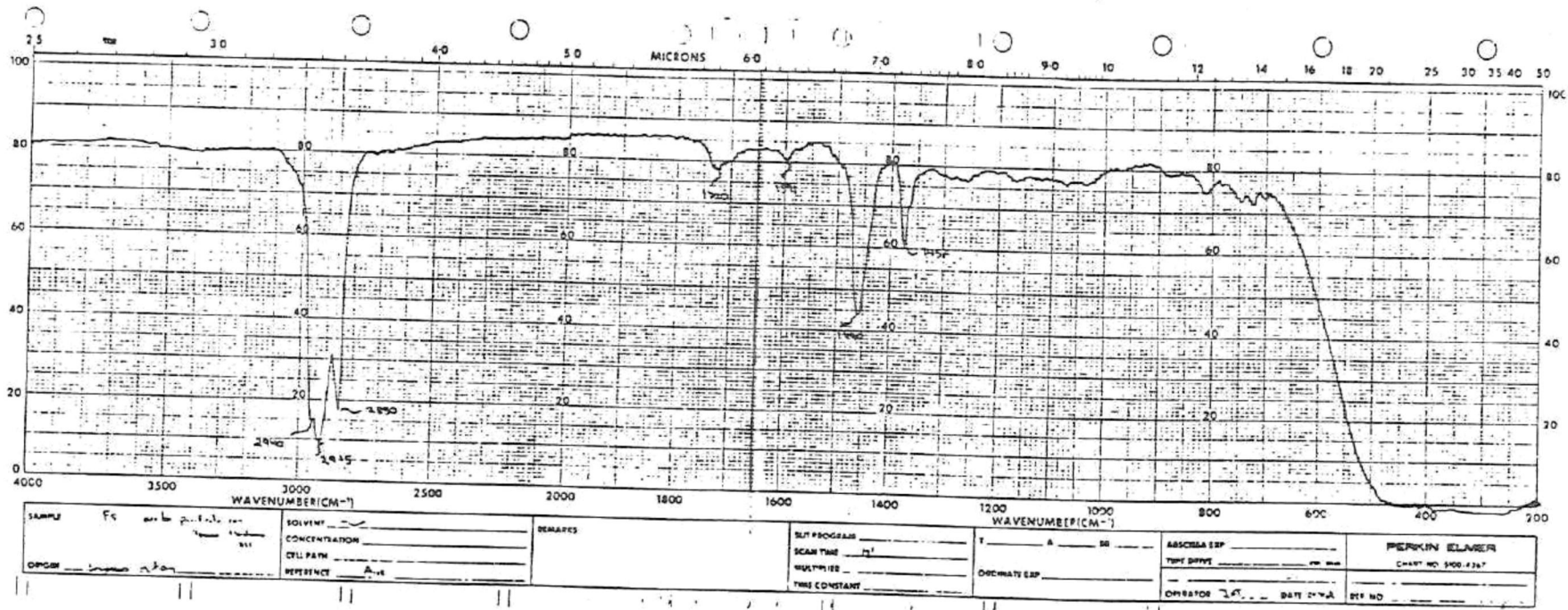


FIGURA 8 Espectro IR de la Fraccion F5

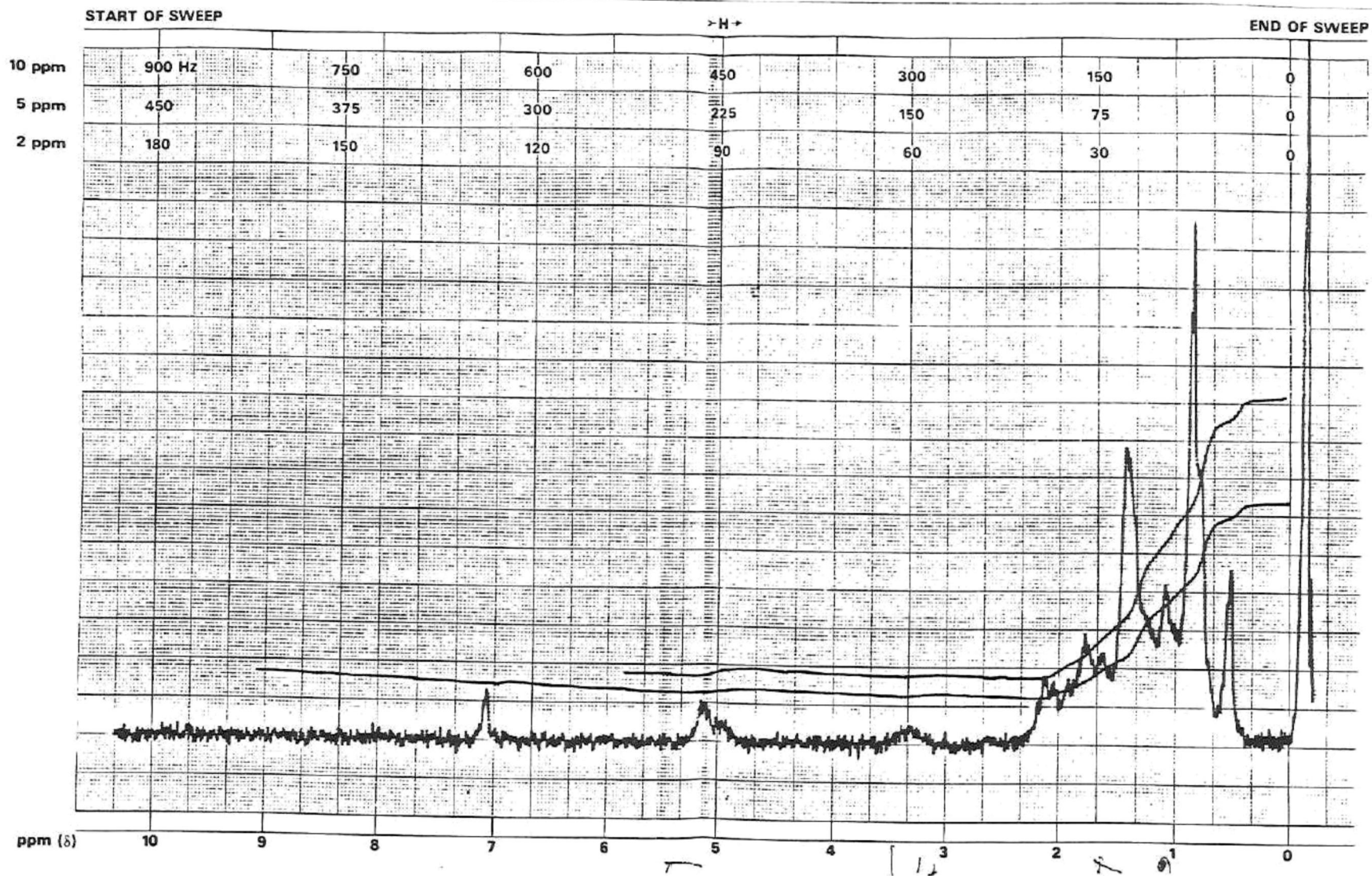


Figura 9 Espectro RMN de la Fracción F2

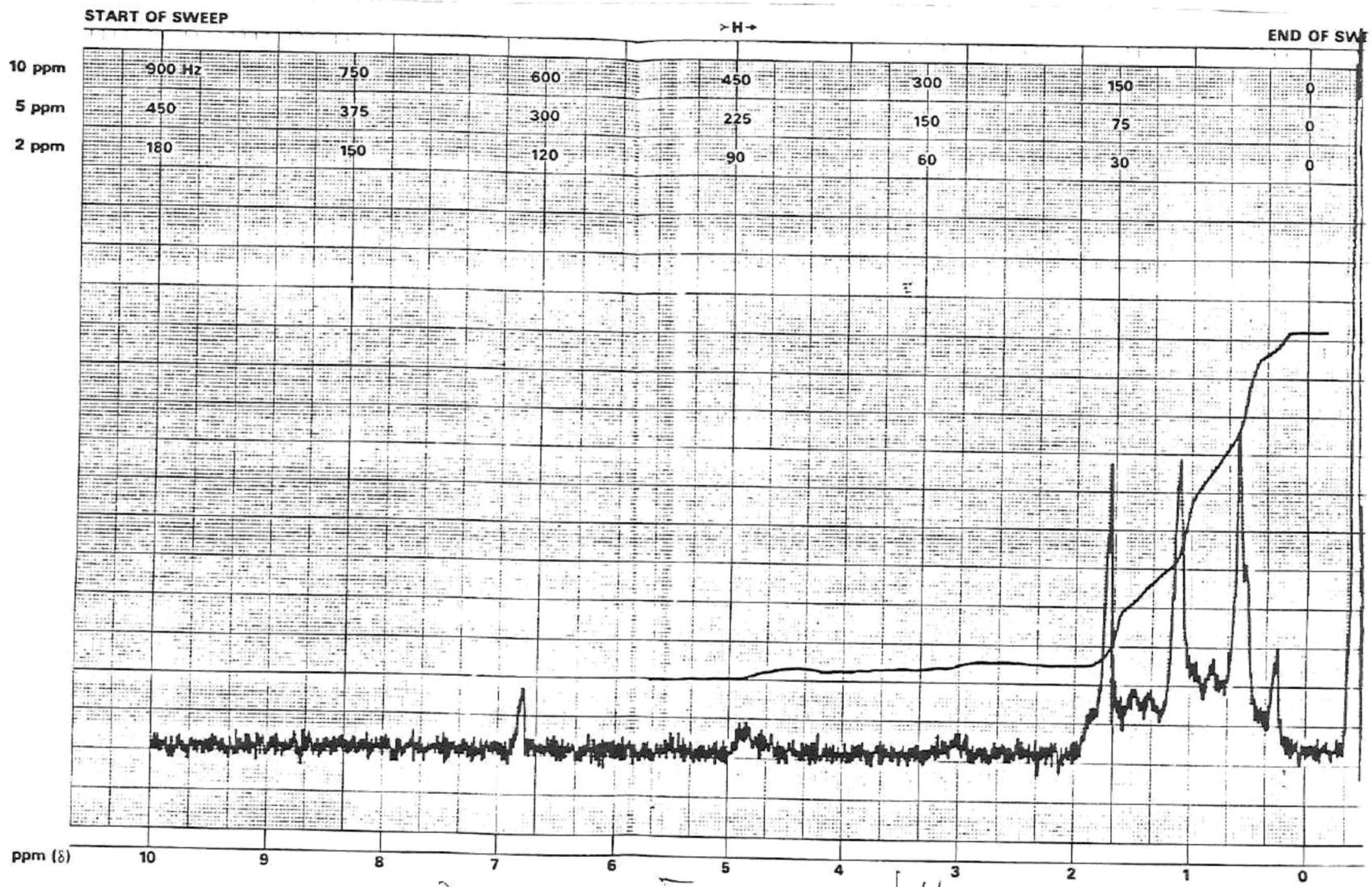


Figura 10 Espectro RMN de la Fracción F3

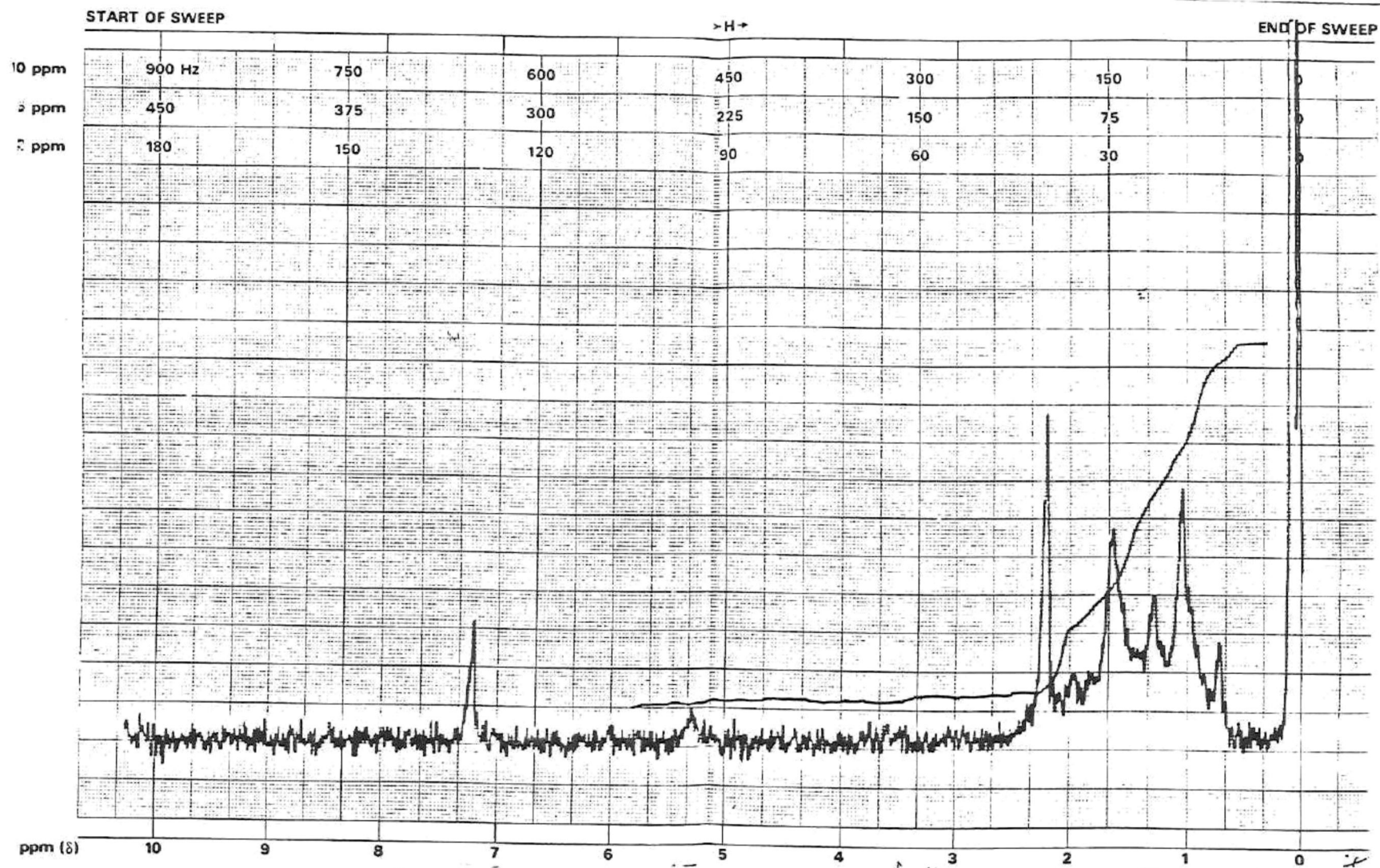


Figura 11 Espectro RMN de la Fracción F5

5.2. SEGUNDA FASE

En esta fase se efectuó la purificación del esteroide en estudio (sargasterol), así como la determinación de su actividad como agente hipocolesterolémico.

El extracto cristalizado presentó una coloración naranja muy intensa, los esteroides cristalizados se denotaron por una forma de hojuelas y un color blanco opaco con una ligera tonalidad amarillenta. Para esta fase se obtuvieron cinco fracciones esteroidales, las cuales se nombraron como C1, C2, C3, C4 y C5. Las que fueron disueltas para conformar la fracción A1 y después de su purificación mediante cromatografía de capa delgada se nombró como la fracción A2.

Las fracciones caracterizadas como C1, C2, C3, C4 y C5 se les determinó su punto de fusión (Tabla IV). Se obtuvieron unos intervalos de fusión muy similares para todas las fracciones. Por lo que se estableció recurrir a las espectroscopias (RMN) para establecer características estructurales. Las fracciones C4 y C5 aunque presentaron rangos de fusión similares, no fue posible obtener sus espectros RMN dado que no se contó con la cantidad suficiente.

T A B L A I V

CARACTERISTICAS FISICAS DE LAS FRACCIONES DE
LA MUESTRA M2

FRACCION	COLOR	FORMA	PUNTO DE FUSION
C1	BLANCO	AMORFO	RANGO 121-122 ^o C
C2	BLANCO	HOJUE.	RANGO 121-123 ^o C
C3	BLANCO	AGUJAS	RANGO 119-124 ^o C
C4	BLANCO	HOJUE.	RANGO 121-124 ^o C
C5	BLANCO	AMORFO	RANGO 119-120 ^o C

ABREVIACIONES:

HOJUE. ⇒ HOJUELAS

Los espectros de la fracción C1, (Figs. 12a, 12b), mostrarón señales simples (singuletes) entre 1.2-0.7 ppm debido a protones metílicos, también presentó una extensa banda de señales (singuletes, dobletes, y multipletes) debido a protones metilo y metileno. A su vez se detectó una señal cuádruple entre 5.2-5.0 ppm y una señal doble entre 5.4-5.3 ppm debido a protones olefínicos y una señal múltiple en 3.6 ppm debido a una posible asociación alifática originada por grupos metilo y metileno del núcleo esteroideal.

Los espectros tanto de la fracción C2 (Figs. 13a, 13b) como C3 (Figs. 14a, 14b) mostraron las mismas señales que la fracción C1 y únicamente la fracción C2 presentó una ligera diferencia, una señal simple (singulete) en 5.1 ppm debido a un alcohol en un disolvente inerte.

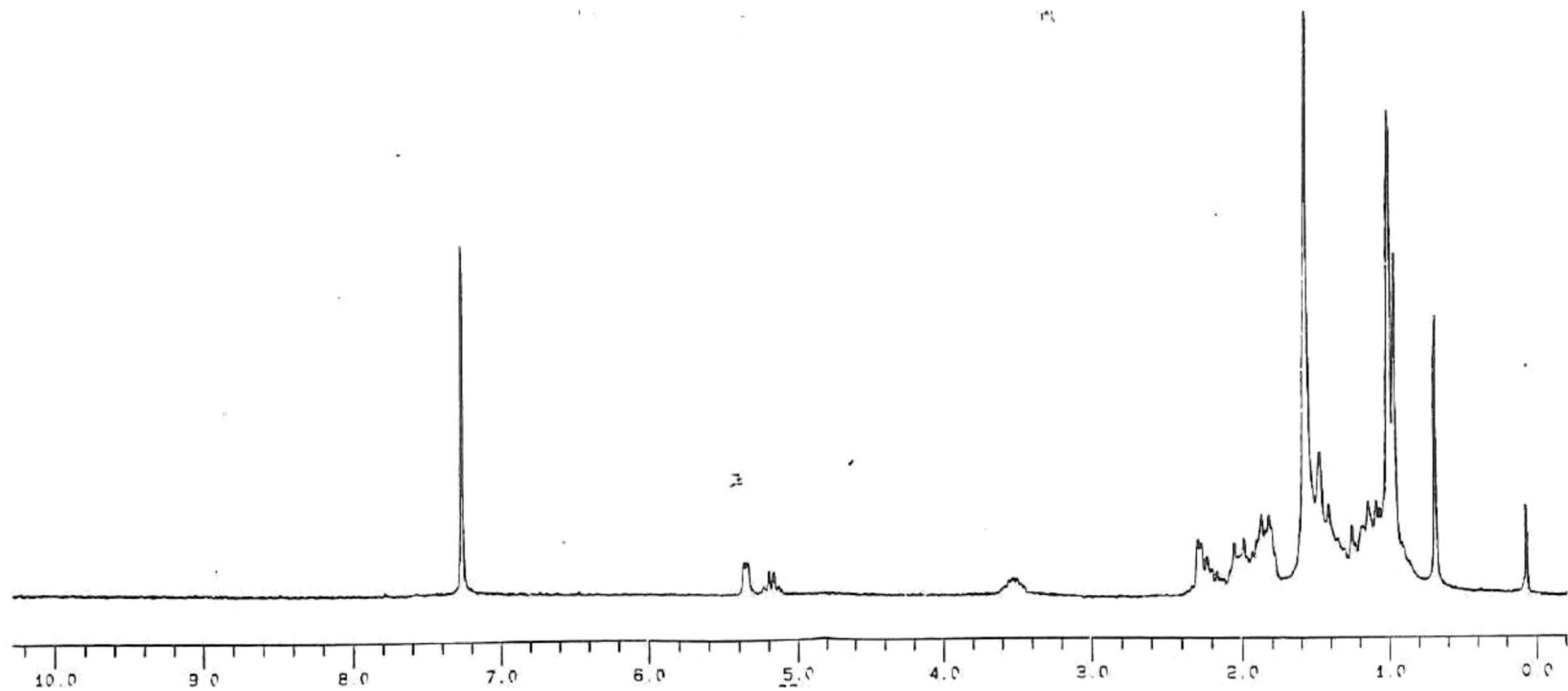


Figura 12 a. Espectro RMN de la Fracción C1

C1 CDCl3

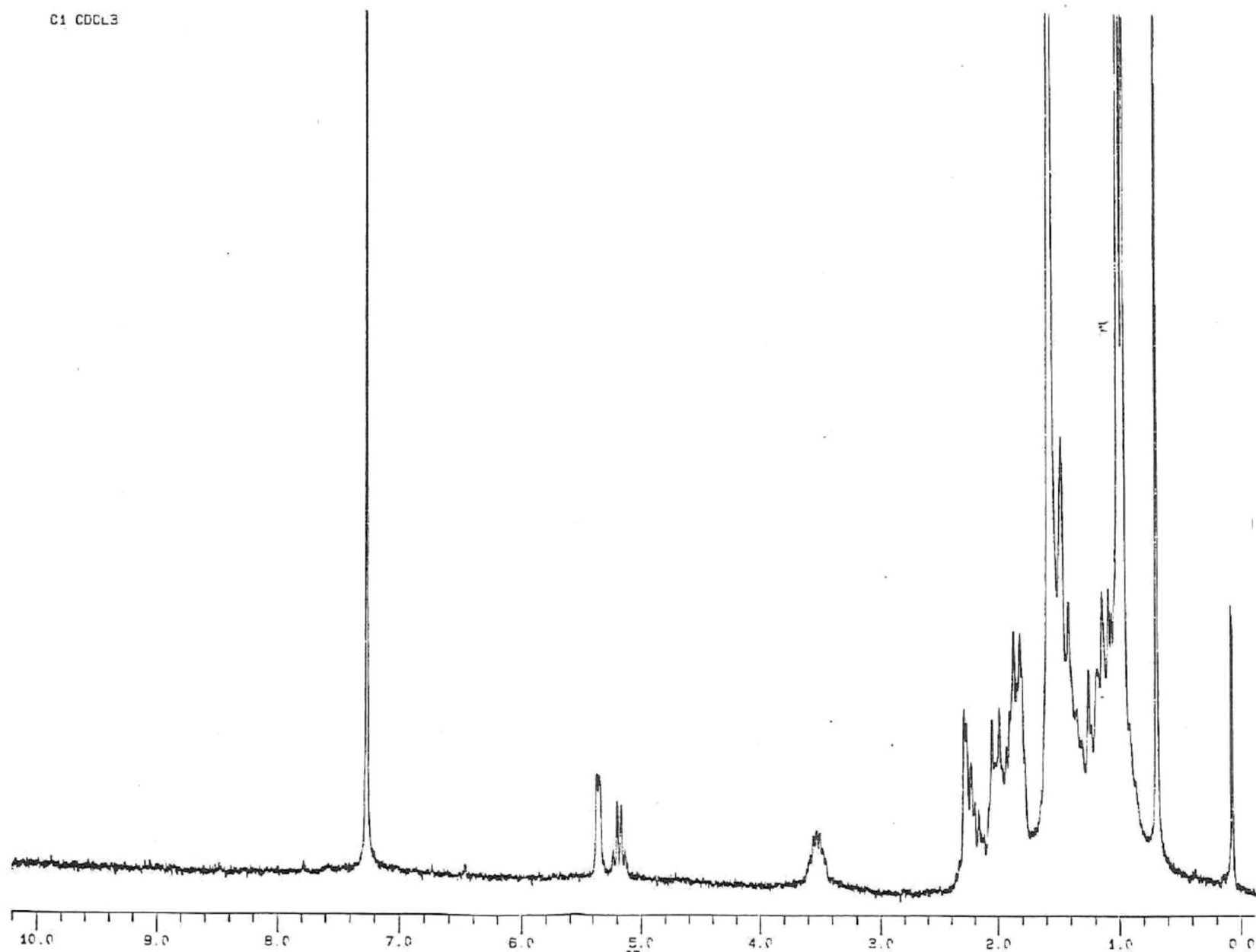


Figura 12 b Espectro RMN de la Fracción C1

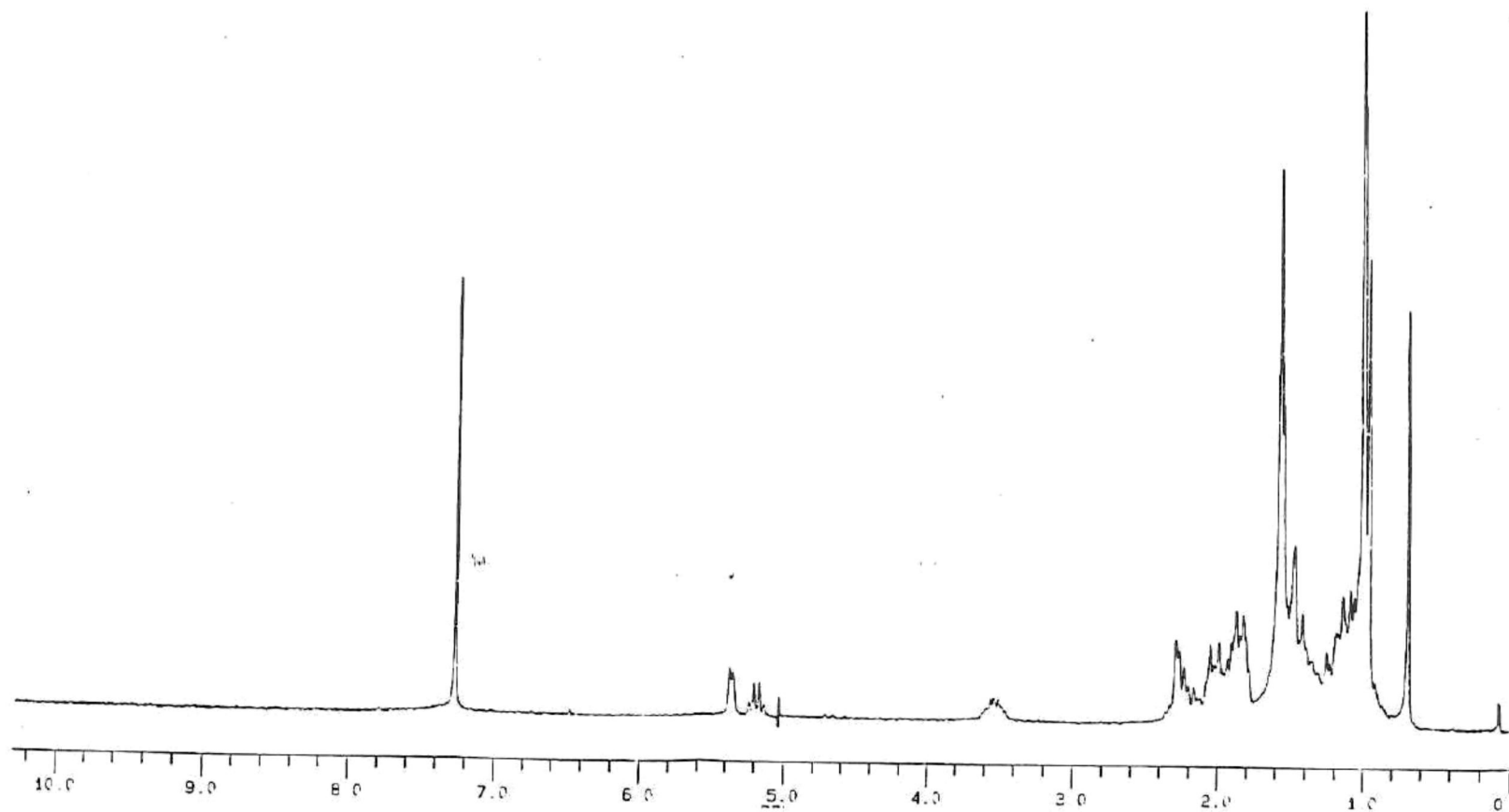


Figura 13 a Espectro RMN de la Fracción C2

C2 CDCL3

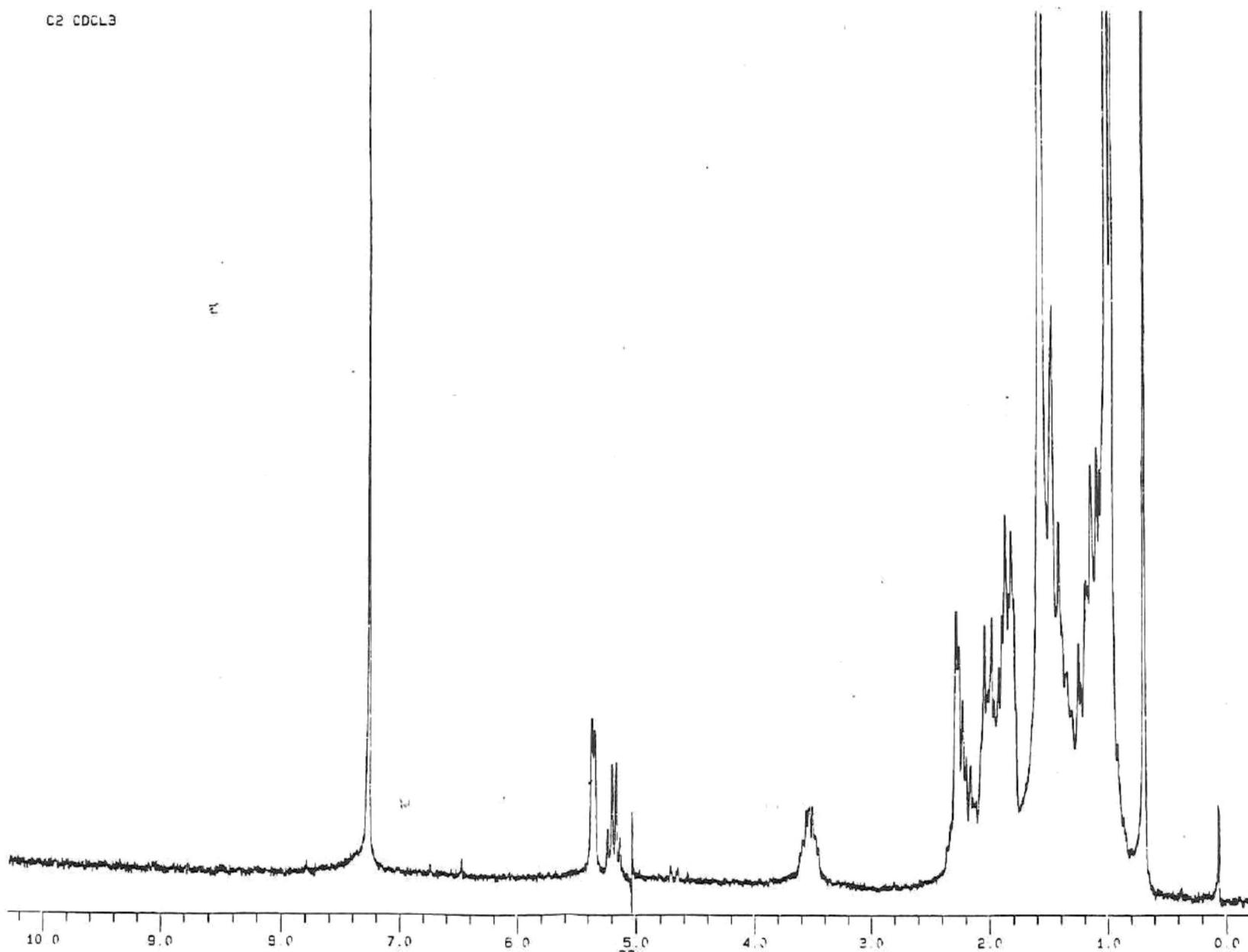


Figura 13 b Espectro RMN de la Fracción C2

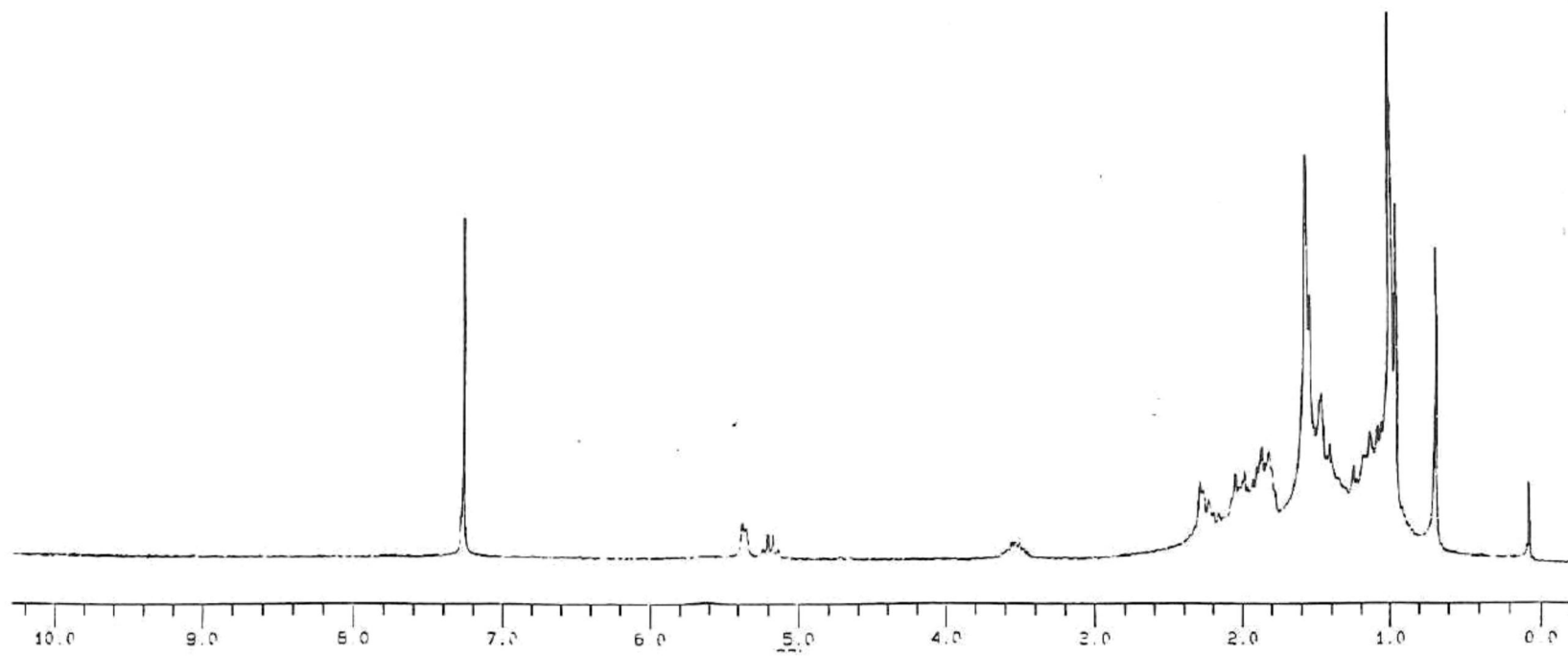


Figura 14 a Espectro RMN de la Fracción C3

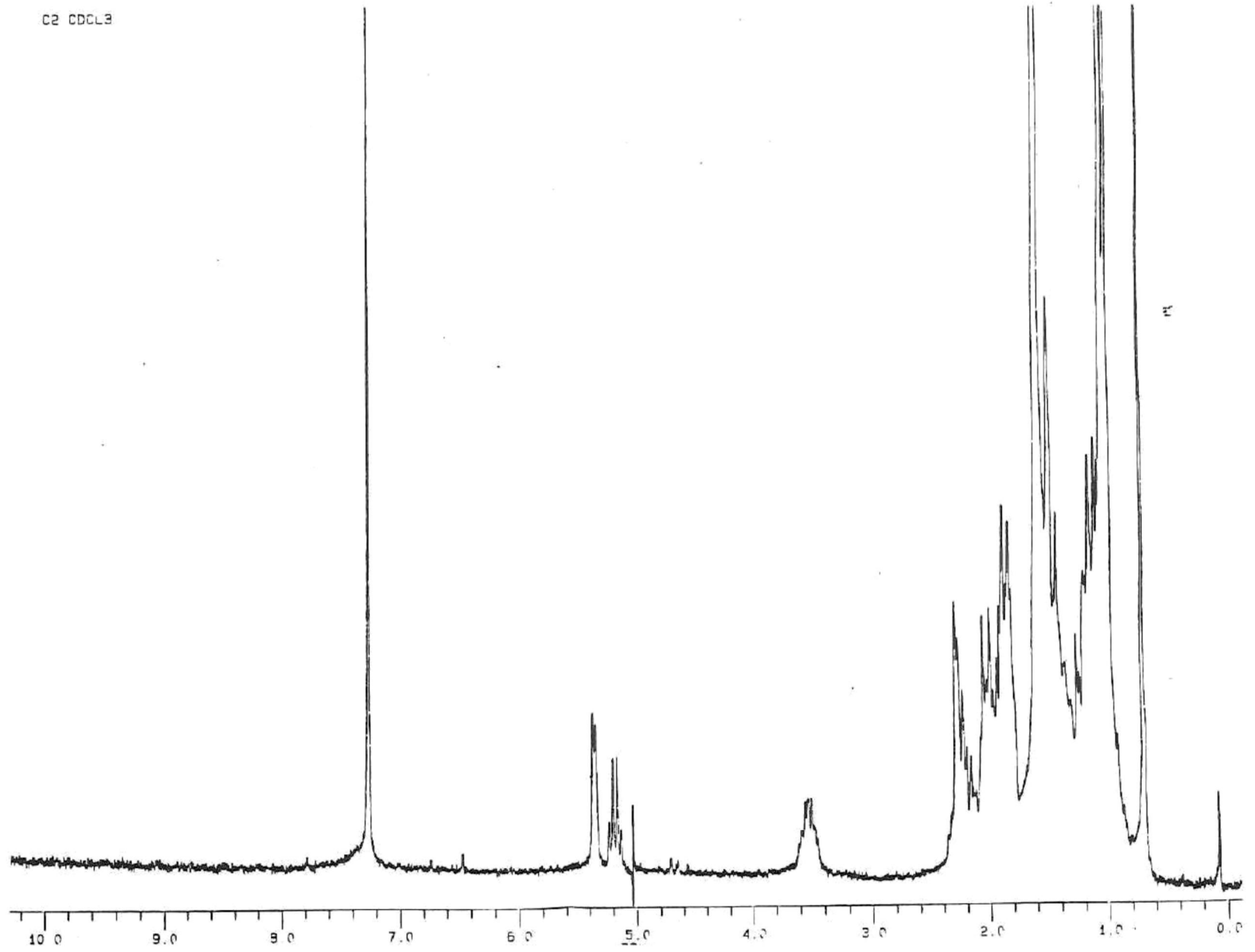


Figura 14 b Espectro RMN de la Fracción C3

La fracción A1 después de las cristalizaciones presentó cristales blancos con una ligera tonalidad amarillenta. Dicha fracción denotó una coloración violacea en la cromatografía (un revelado característico de los esteroides) y una coloración café en la presencia de sulfato cérico. A esta fracción se le caracterizó como A2 obteniendo unos cristales blancos en forma de hojuelas, de este esteroide fue aislada la cantidad de 350 mg, con un punto de fusión de 119-120 °C.

El espectro Infrarojo de la fracción A2 (Fig. 15) presentó bandas características entre 3650-3590 cm^{-1} debido a un grupo hidroxilo con puente de hidrógeno intermolecular, señales entre 2960-2850 cm^{-1} debido a grupos alcanos (-CH₃-, -CH₂-) y señales entre 1485-1445 cm^{-1} debido a grupos alcanos de tijera (-CH₂-) o bien un grupo alcohol, señales entre 1370-1365 cm^{-1} debido a grupos gem-dimetilos (isopropil) y entre 840-790 cm^{-1} debido a grupos alcanos (isopropilo y N-propil).

Por otra parte la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) mostró señales simples, dobles y múltiples entre 1.0-2.3 ppm debido a protones de metilo y a protones de metileno, también se registraron tres señales simples (singuletes) en 0.67 ppm, 0.93 ppm y 1.00 ppm debido a los protones metilo de la forma CH₃ y CH₃-C-C = C, una señal entre 3.25 y 3.75 ppm debido a un protón de un hidroxilo y

DR. QUIJANO LQ-IS(119-20) SOL./CHCL3 3/03/88 TORRES

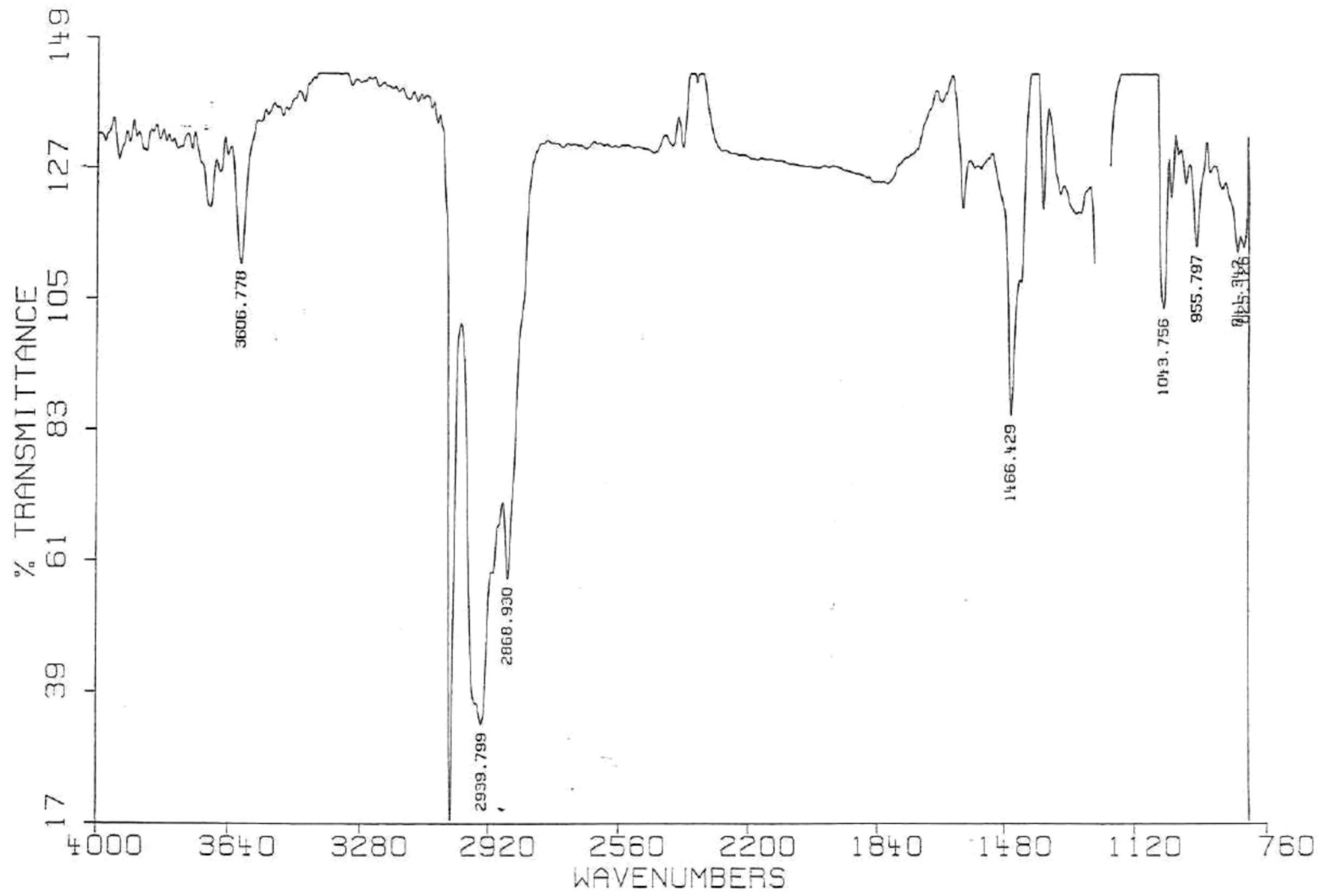


Fig-ura 15 Espectro IR de la Fracción A2

una señal múltiple (multiplete) entre 5.0-5.5 ppm debido a los protones olefinicos de un carbón trisustituido de la forma $>C = CH_2$, $>C = CH -$ y $>C = CH -$ (cíclico) (Fig. 16).

La espectroscopia de masas (Fig. 17a y 17b) mostró una señal a m/e 412 (M^+), la cual es el pico padre o ión molecular, una señal a m/e 397 ($M^+ - 15$), lo cual implica la pérdida de un metilo, una señal a m/e 379 ($M^+ - 33$) implica la pérdida de una molécula de agua (un hidroxilo) más un metilo, una señal en m/e 314 (100%) la cual es el pico fundamental y está de acuerdo a la fórmula $C_{22}H_{34}O$, una señal en m/e 145 (20%) para $C_{11}H_{13}$, una señal en m/e 105 (50%), que esta de acuerdo para la fórmula $C_6H_5(CH_2)_2$, una señal en m/e 91 (45%), para de $C_6H_5CH_2$ y una señal en m/e 55 (89.7%), implica una estructura de C_4H_7 .

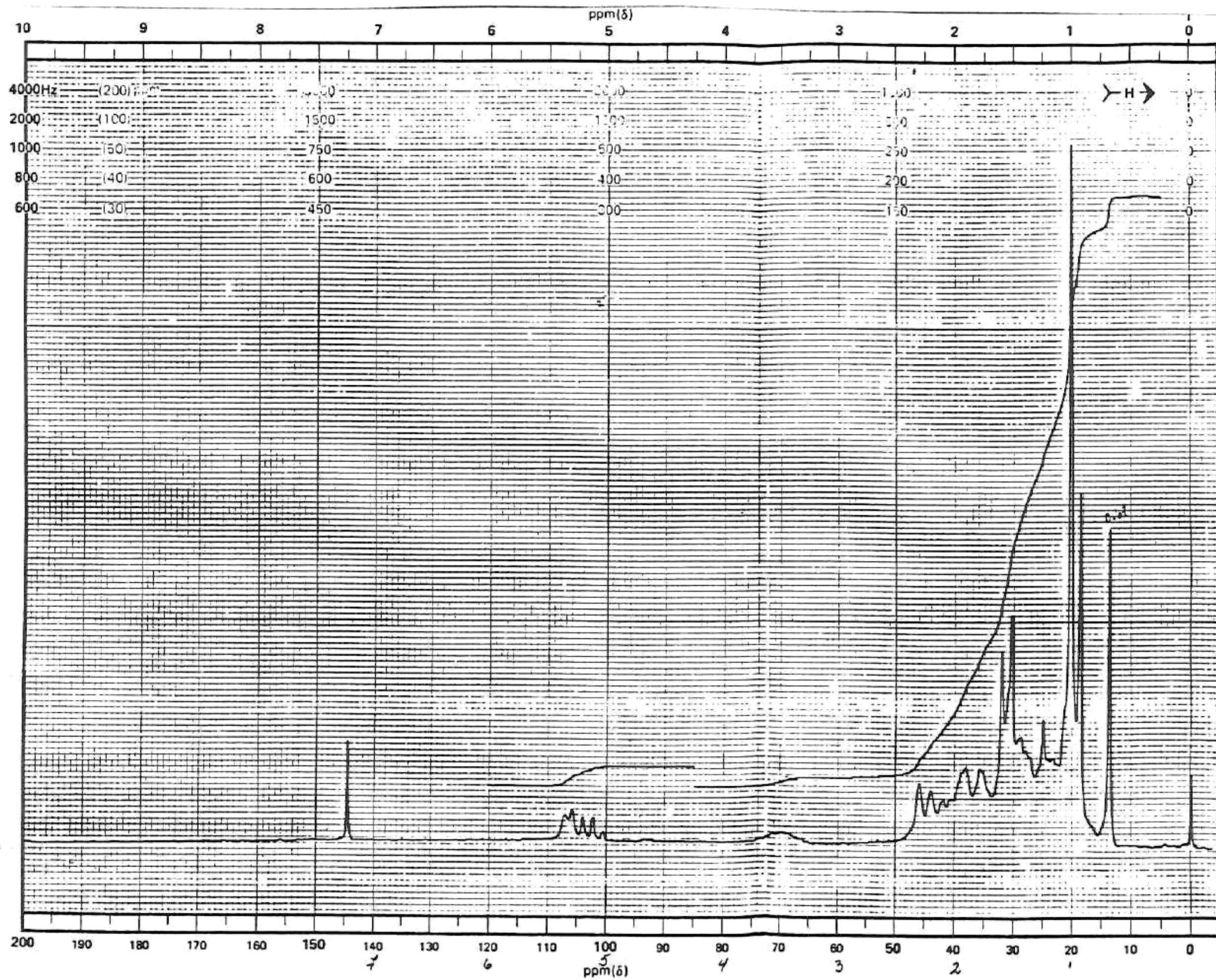


Figura 16 Espectro Rmn De la Fraccion A2

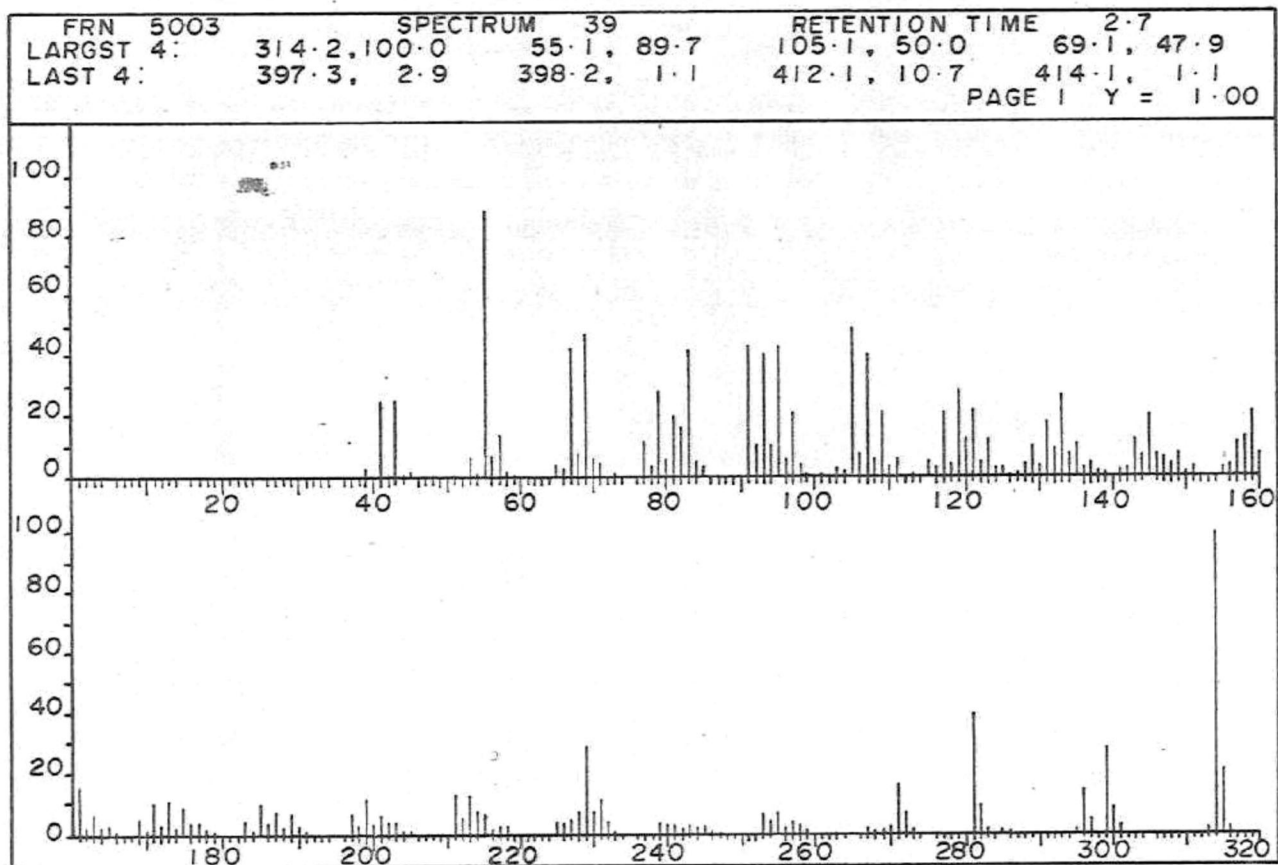


Figura 17a Espectro EM de la Fracción A2

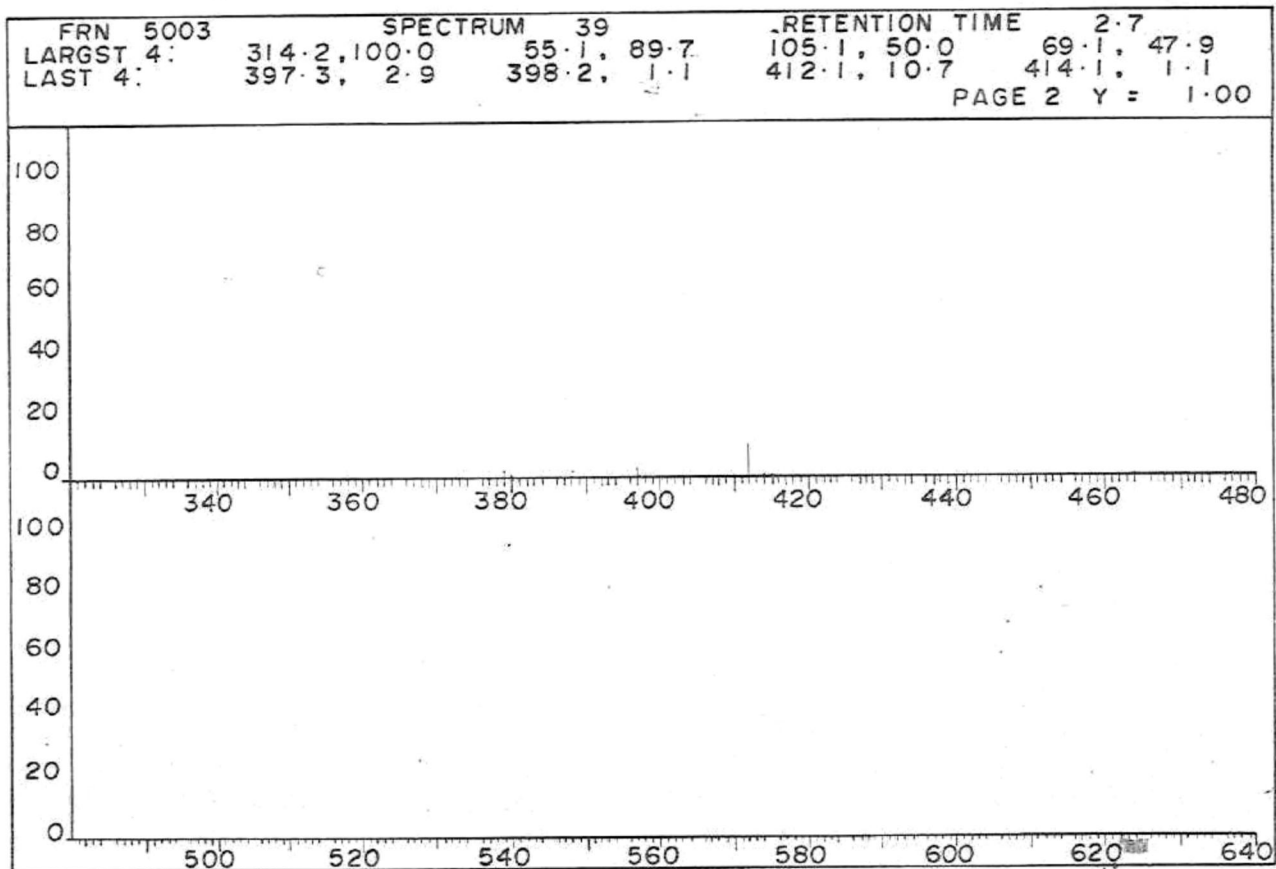


Figura 17b Espectro EM de la Fracción A2

5.3. BIOENSAYO

En la primera fase se obtuvo un valor promedio $X = 99$ mg/dl, correspondiente al nivel medio de colesterol total en suero sanguíneo de conejos, con una desviación estandar de ± 12.47 mg/dl (Tabla V).

La segunda y tercera fases fueron llevadas a cabo simultaneamente. En estas, los conejos toleraron las dosis suministradas tanto de aceite de almendras como la mezcla del mismo con colesterol. La segunda fase mostró un valor promedio $X = 121.52$ mg/dl correspondiente al nivel medio de colesterol total del primer grupo, con una desviación estandar de ± 18.7 mg/dl. En el segundo grupo se obtuvo un valor promedio $X = 122$ mg/dl correspondiente al nivel medio de colesterol, con una desviación estandar de ± 15.5 mg/dl (Tabla VI).

La tercera fase del pre-experimento presentó para el tercer grupo un valor promedio $X = 225.5$ mg/dl, correspondiente a el nivel medio de colesterol total con una desviación estandar de ± 40.7 mg/dl. Y un valor promedio $X = 90.5$ % correspondiente a el porcentaje asimilado del colesterol con una desviación estandar de ± 10 mg/dl (Tabla VII).

T A B L A U

NIVELES DE COLESTEROL TOTAL EN SUERO SANGUINEO DE CONEJOS
(PRE-EXPERIMENTO FASE 1)

GRUPO	#	PESO INICIAL (kgs.)	SEXO	TRANSMITANCIA PORCENTAJE	DENSIDAD OPTICA	COLESTEROL INICIAL mg % +-D.S.
Grupo I	1	2.300	M	8 0 %	0.097	91 + 5
	2	2.440	M	7 8 %	0.110	103 - 7
	3	2.500	M	8 2 %	0.087	82 + 3
Grupo II	1	2.800	H	7 8 %	0.110	103 + 4
	2	2.750	H	7 4 %	0.130	122 - 2
	3	3.200	H	8 0 %	0.096	90 + 6
Grupo III	1	2.500	H	7 6 %	0.119	112 + 5
	2	2.700	H	8 0 %	0.096	90 - 7
	3	2.500	H	7 9 %	0.104	98 + 4

T A B L A VI

ASIMILACION DE COLESTEROL VIA SUBCUTANEA EN CONEJOS

(PRE-EXPERIMENTO FASE 2)

GRUPO	#	MILIGRAMOS COLESTEROL APLICADOS	NIVEL DE COLESTEROL TOTAL mg %				
			INICIAL	24	36	72	96 horas
Grupo I Dieta basica (blanco)	1	----- mg/ml	91	124	133	127	- - -
	2	----- mg/ml	103	133	138	131	- - -
	3	----- mg/ml	82	130	137	129	- - -
Grupo III Dieta basica + Dosis de Colesterol via oleosa	1	100-200 mg/ml	112	199	234	272	280
	2	100-200 mg/ml	90	197	229	265	282
	3	100-200 mg/ml	98	180	224	261	284

T A B L A VII
 EFECTOS DEL ACEITE DE ALMENDRAS EN LOS NIVELES DE
 COLESTEROL EN SUERO SANGUINEO DE CONEJOS.
 (PRE-EXPERIMENTO FASE 3)

GRUPO	#	ml DE ACEITE DE ALMENDRAS APLICADOS	NIVEL DE COLESTEROL TOTAL mg %				
			INICIAL	24	36	72	96 horas
Grupo I Dieta basica (blanco)	1	----- ml	91	124	133	127	- - -
	2	----- ml	103	133	138	131	- - -
	3	----- ml	82	130	137	129	- - -
Grupo II Dieta basica + Aceite de almendras	1	1.000 ml	103	135	95	128	133
	2	1.000 ml	122	129	115	134	138
	3	1.000 ml	90	135	114	122	137

Los resultados del análisis estadístico fueron los siguientes para la primera fase; grupo I una $X = 92 \text{ mg/dl} \pm 10.5$, grupo II una $X = 105 \text{ mg/dl} \pm 16$ y grupo III una $X = 100 \pm 11.1$. Lo cual represento la homogenidad en los grupos. A su vez se vió corroborado esto con la prueba de Kruskal-Wallis, la que denotó la ausencia de diferencias significativas entre los grupos. Con respecto a la segunda y tercer fase, el grupo I mostró una $X = 121.5 \text{ mg/dl} \pm 18.7$, el grupo II una $X = 122 \text{ mg/dl} \pm 15.5$ y el grupo III una $X = 225.5 \text{ mg/dl} \pm 40.7$. Lo que denoto una concentración elevada para el tercer grupo y concentraciones similares para los dos primeros. Las pruebas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon presentaron diferencias significativas a partir de las 24 horas entre los grupos 1-3 y 2-3, mientras que para los grupos 1-2 no presentó diferencias significativas.

El procedimiento para la determinación de la actividad del esteroles aislado fue el mismo que el utilizado en la fase dos y tres, con variantes en el uso de colesterol para el segundo grupo, y de colesterol más el fucosterol aislado (fracción A2) para el tercer grupo.

En el experimento de actividad hipocolesterolemica, todos los conejos toleraron las dosis suministradas de colesterol con aceite de almendras y de dicha mezcla con el fitoesterol aislado. En el efecto hipocolesterolemico se

encontró un valor promedio $X = 123$ mg/dl para el grupo I correspondiente a el nivel medio de colesterol total en el plasma sanguíneo de conejos y con una desviación estandar de ± 7.8 mg/dl. Un valor promedio $X = 275$ mg/dl para el grupo 2 correspondiente a el nivel medio del colesterol total, con una desviación estandar de ± 37.4 mg/dl. Y por último un valor promedio $X = 164$ mg/dl para el grupo 3 correspondiente a el nivel medio de colesterol total con una desviación estandar de ± 25 mg/dl (Tabla VIII). El comportamiento de los niveles de colesterol para los tres grupos a lo largo del experimento de actividad denotó que el grupo I tuvo un comportamiento constante con respecto al tiempo en la concentración total mientras que los grupos I y II presentaron un comportamiento ascendente en sus concentraciones durante las 24 horas a partir de la cual el grupo II continuo su aumento hasta las 72 horas, el tercer grupo al cabo de las 24 horas empezó a disminuir su concentración hasta tender ser constante. Lo cual mostró claramente el efecto hipocolesterolémico en el plasma sanguíneo (figura 18).

Los resultados del análisis estadístico de los grupos I, II y III presentaron las concentraciones respectivamente de 123 mg/dl ± 7.6 , 275 mg/dl ± 78.7 y 164 mg/dl ± 32.2 . Las pruebas de Kruskal-Wallis y Wilcoxon denotaron diferencias significativas entre los grupos 1-3 y 2-3. Mientras que los

T A B L A VIII

EFFECTO HIPOCOLESTEROLEMICO EN LOS NIVELES DE COLESTEROL EN PLASMA SANGUINEO DE CONEJOS
(EXPERIMENTO ACTIVIDAD)

GRUPO	N	PESO PROMEDIO INICIAL	ALIMENTO PROMEDIO grs/conejo	NIVEL DE COLESTEROL TOTAL mg % +-D.S				
				INICIAL	24	48	72	96 horas
Grupo I Dieta basica (Blanco)	3	2,400 grs	170 grs/dia	125+-12.0	133+-6.0	129+-19	128+-30	- - - -
Grupo II Dieta basica + Colesterol (via oleosa) 0.1-0.2 grs.	3	2,900 grs	225 grs/dia	115+-5.0	225+-9.0	273+-7.0	291+-12	313+-16
Grupo III Dieta basica + Colesterol + Fucosterol 100.0 mg. (via oleosa)	3	2,500 grs	225 grs/dia	105+-4.0	190+-17	181+-12	145+-11	140+-5.0

NOTA : PORCENTAJE DE ASIMILACION DE COLESTEROL 84 % + 13.7 PARA EL GRUPO 2

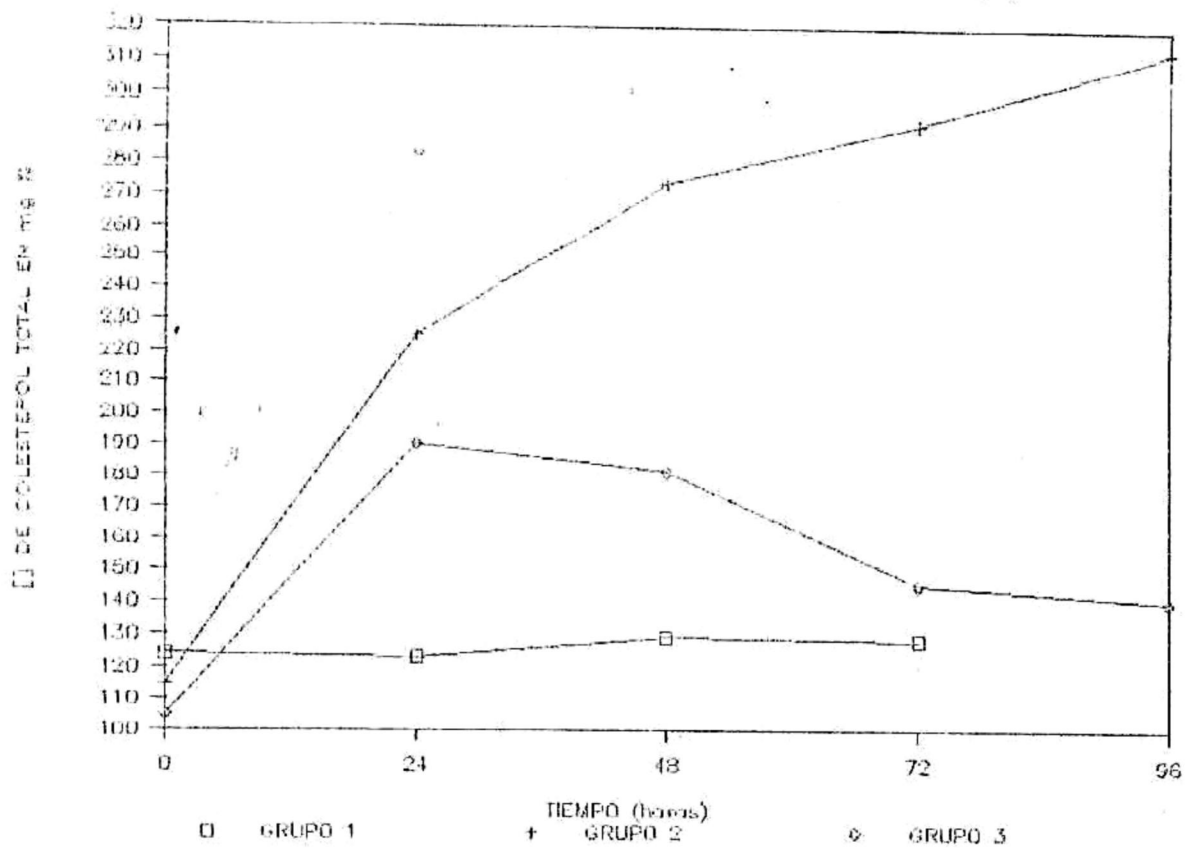


FIGURA Efecto Hipocolesterolémico en Plasma Sanguíneo de Conejos.

grupos 1-2 no presentaron diferencias significativas en los intervalos de 0 y 72 horas.

6. DISCUSIONES

6.1. PRIMERA FASE

En las extracciones el método de Tsuda tuvo un menor rendimiento de extracto insaponificable, en comparación con el método de Reiner. De igual manera al cristalizarse ambos extractos se obtuvo mayor rendimiento de esteroides crudos por el método de extracción de Reiner atribuible esto a el tiempo de extracción y a la polaridad de los solventes utilizados.

Cabe mencionar, también que dicho método es el más seguro de aplicar, ya que no emplea solventes cancerígenos como en el caso del método de Tsuda, que utiliza benceno.

Posteriormente las pruebas de Liebermann-Burchard y Salkowski, mostraron que efectivamente por ambos métodos se pudieron aislar los esteroides crudos presentes en el alga. Sin embargo la presencia de coloraciones más intensas en las fracciones extraídas por el método de Reiner, sugirió que se encontraban estos en mayor cantidad y casi sin la presencia de otros compuestos como pigmentos, diterpenos y triterpenos, lo cual se determinó de acuerdo a los resultados específicos de las pruebas (de tipo, intensidad y tiempo de reacción).

Las coloraciones amarillas y rojas de la prueba de Salkowski en las fracciones F3, F4 y F5 sugieren la presencia de esteroides. Aunque, también pudiesen presentarse otros

compuestos como carotenos principalmente y xantófilas (Lewey y Gorham, 1984) (ver Anexo 1). En las fracciones F1 y F2 las coloraciones anaranjadas y rojas intensas son indicio de alto contenido de esteroides en alta concentración y sin impurezas.

Según Domínguez (1979) las coloraciones de la prueba de Liebermann-Burchard de las fracciones F1 y F2 parece, corresponder a grupos metilo en el Carbono 10 y Carbono 13 y a una Δ^5 -insaturación, esto se infirió de acuerdo al orden y tiempo de aparición de la coloración (< a 15 min). De tal manera que las fracciones F1, F2, F3, y F5 presentaron poca probabilidad de estar contaminados por otros compuestos, mientras que la fracción F4 sugirió la presencia de un derivado esteroide como pigmentos, diterpenos y triterpenos.

6.1.1 FRACCION F1

Los cristales de la fracción F1 fundieron entre 127-129°C lo cual implicó la presencia de una mezcla de esteroides isómeros entre sí con características similares. Como podrían ser el fucosterol y el sargasterol (Anexo 3) (Heilbron, et. al., 1934; Tsuda, et. al., 1958 a). Al analizar el espectro de infrarojo, se observaron señales entre 2960-2850 y 1485-1445 cm^{-1} fueron correspondientes a los estiramientos de C-H y flexiones de $-\text{CH}_2-$ asignados a los

carbonos 25 y 28 y a los carbonos 22 y 23 respectivamente, como lo presenta un esteroles de fórmula $C_{29}H_{48}O$ (Sargasterol y Fucosterol). Las señales entre $1370-1365\text{ cm}^{-1}$ fueron correspondientes a grupos gem-dimetil de los carbonos 26 y 27 de los mismos esteroides. Por otra parte, tuvimos una discrepancia notable en las señales entre $3650-3590\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a un grupo hidroxilo, ya que se presentó una banda ancha y la señal esperada era una banda aguda media o intensa, por lo cual si se tratara de una mezcla de esteroides del tipo $C_{29}H_{48}O$ debería de estar presente. Ya que no se contó con su espectroscopia de resonancia magnética nuclear no fue posible establecer si realmente fue la mezcla propuesta o bien es alguno de los esteroides comunes en las algas pardas (fucosterol o sargasterol); se pudiese asumir una posible contaminación con otra sustancia, aunque el punto de fusión no lo reveló. De lo anterior, pudimos establecer que se trató de una fracción integrada por una mezcla de fitoesteroides.

6.1.2 FRACCION F2

Los cristales de la fracción F2 fundieron entre $129-131^{\circ}\text{C}$, lo cual en primera instancia correspondió a valores de puntos de fusión del sargasterol según Tsuda et. al. (1958b).

La espectroscopia de infrarojo (IR) mostró señales entre $3650-3590\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a un grupo hidroxilo, el cual está unido a un carbono secundario (en posición beta), que en este caso es el carbono 3 para los tres esteroides; las señales entre $2960-2850$ y $1485-1445\text{ cm}^{-1}$ correspondieron a los estiramientos de $-\text{CH}-$ de los carbonos 25 y 28. Las señales entre 1485 y 1445 cm^{-1} corresponden a las flexiones de $-\text{CH}_2-$ asignados a los carbonos 22 y 23. Por otra parte las señales entre $1370-1365\text{ cm}^{-1}$ correspondieron a grupos gem-dimetilos asignados a los carbonos 26 y 27, las señales entre $840-790\text{ cm}^{-1}$ corresponden a grupos alquenos trisubstituidos del carbono 5 y 6. Con respecto a su espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) mostró un perfil típico de esteroides donde las señales simples, dobles y múltiples entre $0.56 - 2.28\text{ ppm}$ corresponden a la extensa banda de protones de los grupos metilo y metileno del núcleo esteroideal. Dentro de esta banda se observan tres señales simples en 1.26 ppm , 0.96 ppm y 0.61 ppm , correspondientes a los protones metílicos de los carbonos 18, 10 y 21. Una señal múltiple entre $3.26 - 3.68\text{ ppm}$ correspondientes al protón del hidróxilo unido al carbono 3. La señal múltiple entre $4.6 - 5.1\text{ ppm}$ corresponden a los protones olefinicos de la cadena lateral de los carbonos 24 y 28 y a los protones olefinicos (trisubstituidos) de los carbonos 5 y 6 del anillo esteroideal.

De acuerdo a la información recabada para la fracción F2 se pudo establecer que el fitoesterol en cuestión fue el Sargasterol (Anexo 3).

6.1.3 FRACCION F3

La fracción F3 con temperatura de fusión entre 120-122 °C, sugiere la presencia de 4 compuestos esteroidales, o bien la mezcla de dos esteroides, las opciones posibles pueden ser: el Δ^7 -Colesterol (Scheuer, 1973); o la mezcla de fitoesteroides como el fucosterol (Heilbron et. al., 1934), con el 29-Metilisofucosterol o bien el 24 Dehidrocolesterol (Scheuer, 1973) y el sargasterol Tsuda et. al., (1958a) .

A partir de los resultados de la prueba de Salkowski, se sugiere la presencia de concentraciones bajas de esteroides o la posible presencia de otros compuestos que dan la reacción positiva.

El espectro infrarrojo (IR) mostró señales entre 3650-3590 cm^{-1} las cuales corresponden a un grupo hidroxilo unido a un carbono secundario asignadas al carbono 3, las señales entre 2960-2850 cm^{-1} y 1485-1445 cm^{-1} se asocian a los estiramientos de C-H y a las flexiones de -CH₂- asignadas a los carbonos 22 y 23. Y en particular las señales entre 1680-1620 cm^{-1} fueron debidas a los estiramientos de C=C de

alquenos. Por lo que se dedujo la presencia de dobles enlaces, en los carbonos 5, 6, 27 y 28. La ausencia de señales en 1370-1365 y 840-790 cm^{-1} descarta la posibilidad de combinación de esteroides, dado que son bandas características de los fitoesteroides de 29 átomos de carbono, asumiendo así la presencia de un derivado esteroideal que pudiera ser el Δ^7 Colestenol.

Ahora bien si consideramos la presencia de este esteroideal, tenemos que las señales en 3650-3590 cm^{-1} corresponde al grupo hidroxilo asignado al carbono 3, las señales entre 2960-2850 y 1485-1445 cm^{-1} se deben a los carbonos 26, 27, y a los carbonos 22 y 23 (Dominguez, 1979). Las señales entre 1680-1620 cm^{-1} fueron debido al carbono 7. Sin embargo, no están presentes las señales entre 1370-1365 de los grupos gem-dimetil, lo cual sugiere que esta elucidación no es la opción más apoyada.

El espectro RMN presentó características de esteroides. Un conjunto de señales entre 2.1-0.6 ppm lo cual correspondió a los protones metilo y metileno del núcleo esteroideal. Las señales simples entre 1.18-0.61 ppm correspondieron a los protones metílicos de los carbonos 18 y 19 que no se detectaron en el espectro IR (posiblemente por la cercanía de las señales entre 1400 cm^{-1}) y la señal múltiple entre 4.96-5.36 ppm correspondió a los protones

olefínicos del anillo de los Carbonos 5 y 6, (Dominguez 1979). La diferencia con respecto a la fracción F2 en el espectro RMN es una señal simple entre 2.09-2.1 ppm, debido a unos protones metileno de un sistema de anillos; de un compuesto derivado del perhidrociclopentanofenantreno. Lo que pudiese asociarse a una insaturación (doble enlace) en el Carbono 5.

La falta del espectro EM no nos permitió precisar la elucidación del esteroide Δ^7 -Colectenol, aun cuando el espectro de resonancia haya denotado información para las otras opciones. Sin embargo, si consideramos que el fucosterol y sargasterol son esteroides presentes en algas pardas, es muy posible que el Δ^7 colectenol no pueda estar presente, dado que se infiere que es un derivado del colesterol y que debe de estar relacionado en su proceso de biosíntesis.

6.1.4 FRACCIÓN F4

El punto de fusión de la fracción F4 y las pruebas cualitativas sugieren la presencia de un derivado esteroide o algún terpenoide lineal, en baja concentración (Dominguez, 1979).

Analizando los puntos de fusión encontramos que pudiese tratarse del 24-Metilencolestanol (Scheuer, 1978) y 24 -

Dehidrocolesterol (Scheuer, 1973), o bien algun triterpenoide (Domínguez, 1979) .

El espectro IR mostró señales en 3650-3590 cm^{-1} correspondientes a un grupo hidróxilo en un carbono secundario del Carbono 3. Las señales entre 2960-2850 y 1485-1445 cm^{-1} se deben a los estiramientos de C-H de los carbonos 8, 9, 14, 17, 20 y a las flexiones de $-\text{CH}_2-$ de los carbonos 22 y 23. Las señales entre 1370-1365 cm^{-1} corresponden a los grupos gem-dimetil de los carbonos 26 y 27. Como el 24-metilencolestanol es un derivado del 24-metilencolesterol, y surge como un producto de la oxidación del fucosterol (Patterson, 1971; Goodwin, 1974), podemos pensar en la factibilidad de la presencia de este esterol. A su vez el 24-dehidrocolesterol (desmosterol), también aislado de algas pardas pudiese estar presente.

La ausencia del Espectro RMN y EM no permite llegar a la elucidación más precisa de la presencia del 24-metilencolestanol o del 24-dehidrocolesterol.

6.1.5 FRACCION F5

La fracción F5 presentó un punto de fusión de 110-113 $^{\circ}\text{C}$ y sus pruebas cualitativas dieron resultados similares a los de la fracción F3; más por su punto de fusión no parece

tratarse del mismo compuesto. Se podría plantear la presencia de un derivado acetilado. Ya que el espectro IR mostró que las señales entre 2960-2850 y 1485-1445 cm^{-1} se asocian a los estiramientos de los C-H y a las flexiones de $-\text{CH}_2-$. Las señales en 1718-1704 cm^{-1} corresponde a grupos carbonilo y las señales entre 1385-1380 cm^{-1} a los grupos gem-dimetil y las señales en 690 cm^{-1} a flexiones de C-H de cis-alquenos disustituídos.

El espectro RMN mostró las mismas señales que la fracción F3 con pequeñas diferencias en 1.26 y en 1.96 ppm las cuales corresponden a los grupos metilo y metileno del anillo esteroidal.

Debido a la similitud entre las espectroscopias IR y RMN entre las fracciones F3 y F5, se sugiere la posibilidad de la presencia del acetato del 7 - Colestenol. Esto se confirma debido a que los acetatos de los esteroides del tipo 3-beta-ol tienen punto de fusión más bajos que sus esteroides, así como la señal en infrarojo a los 1733-1739 cm^{-1} y la ausencia de las señales para OH tanto en infrarojo como en resonancia magnética nuclear.

6.2 SEGUNDA FASE

6.2.1 Fracción A2

Los esteroides aislados en las fracciones C1, C2, y C3 presentaron puntos de fusión muy similares dentro del rango de los 119-124 °C.

Al analizar los espectros RMN (Figs. 15, 16 y 17) podemos considerar que las fracciones C1, C2 y C3 son el mismo esteroide, diferenciándose únicamente en la intensidad de las bandas, de lo cual se puede interpretar como diferencia en su grado de pureza o bien su concentración al correr el espectro. Analizando las principales bandas podemos establecer lo siguiente: Las tres señales simples (singuletes) en 1.0 ppm, 0.9 ppm y 0.7 ppm corresponden a los protones metílicos de los carbonos C-19, C-18 y C-21 respectivamente, las bandas entre 1.2 - 2.2 ppm se asocian a los grupos metilo y metileno pertenecientes al núcleo esteroide. Por otra parte la señal entre 3.4 - 3.6 ppm corresponden al grupo hidroxilo unido al C-3 en posición beta y las señales entre 5.2 - 5.0 ppm corresponden a los protones olefínicos de los carbonos C-5 y C-22. De lo anterior se infiere la presencia de un Δ^5 - Esteroide, que podría ser el fucosterol.

El punto de fusión de la fracción A1 y las

espectroscopías RMN de sus fracciones precursoras mostraron tratarse aparentemente del Fucosterol.

6.2.2 Fracción A2

En el espectro IR se obtuvieron bandas a 3606 cm^{-1} y 1466 cm^{-1} , que mostraron la presencia de un grupo hidroxilo unido al núcleo esteroidal en el carbono C-3 en posición beta; la banda a 3180 cm^{-1} correspondió a la vibración de carbonos trigonales (alquenos y al grupo hidroxilo), en el núcleo esteroidal este alargamiento C-H del sistema de anillos corresponde a los carbonos C-3, C-8, C-9, C-14, y en la cadena lateral este alargamiento C-H de los alquenos corresponden a los carbonos C-17, C-20 y C-25. Las bandas a 2939 cm^{-1} y 2868 cm^{-1} pertenecen a los grupos alcanos de la forma $-\text{CH}_3-$ y $-\text{CH}_2-$ en donde los grupos metilos corresponden a los carbonos C-18, C-19, C-21, C-26, C-27, C-29 y los grupos metilenos corresponden a los carbonos C-1, C-2, C-4, C-7, C-11, C-12, C-15, C-16, C-22 y C-23. La banda a 1466 cm^{-1} debido a grupos alcano de la forma $-\text{CH}_2-$ de tijera corrobora nuevamente la presencia de los grupos metileno tanto en la cadena lateral como en el núcleo esteroidal.

En el espectro RMN se presentaron tres señales simples (singuletes) en 0.67 ppm , 0.93 ppm y en 1.0 ppm correspondientes a los protones metílicos de los carbonos C-21, C-18 y C-19 respectivamente, una señal amplia en 3.5 ppm

reveló la presencia de un protón unido al carbono C-3 donde se encuentra el grupo hidroxilo. Una señal entre 5.35-5.30 ppm reveló la presencia de un protón olefínico de un doble enlace trisustituido, el cual corresponde al carbono C-6 de igual manera las banda entre 5.30-5.00 ppm revelaron la presencia de un protón olefínico correspondiente al carbono C-28. Si consideramos el espectro de masas, se observó una señal a m/e 412 (10%) que nos indica el peso molecular del esteroles, el cual está de acuerdo para la fórmula $C_{29}H_{48}O$; la señal a m/e 397 (2.5%) nos representa la pérdida de un grupo metilo que posiblemente fue el perteneciente al carbono C-29, ya que por su cercanía a la insaturación en 24 (28) es el más labil a reaccionar. El pico fundamental representado por la señal m/e 314 (100%), fue asociado a una estructura con la fórmula $C_{23}H_{38}$ y marca el ión mas estable. La presencia de picos en m/e 256 (2.5%), m/e 229 (30%), m/e 213 (12.5%) y m/e 119 (27.5%) son característicos en los Δ^5 -Esteroles, lo cual indica que el esteroles en cuestión tiene el mismo sistema de anillos que el colesterol (núcleo esteroidal). La presencia de picos de fuerte intensidad en m/e 314 (100%) y m/e 271 (7.5%) indica la presencia de un doble enlace o la formación secundaria de un doble enlace correspondientes a los carbonos C-22(24) o C-24 respectivamente.

De acuerdo a la evidencia espectroscópica es factible plantear la presencia de fucosterol en la fracción A2

6.2.3 Hipótesis sobre Sargasterol en Sargassum muticum

Con base en la evidencia expuesta con anterioridad, se pueden plantear dos hipótesis; Primera: " existe una variación estacional del sargasterol para Sargassum muticum"; y Segunda: el sargasterol forma parte del proceso biosintético del fucosterol."

El aislamiento del Sargasterol en la primera fase del trabajo experimental y no en la segunda fase, nos da la pauta para considerar la primera hipótesis, considerando que el sargasterol se había reportado aislado previamente en Sargassum ringgoldianum (Tsuda, 1958a), pero no fue detectado en los trabajos Reiner, (1962) e Ikekawa, (1966, 1968) donde fue demostrado que el aislamiento del sargasterol no siempre es reproducible, planteándose que posiblemente es debido a algún tipo de variación estacional. Podemos considerar, también que los esteroides son compuestos que están asociados con organelos celulares y el formar parte en las unidades estructurales de las membranas de partículas celulares (Goodwin, 1973). Así mismo conociendo que la tasa de recambio de células en una macroalga va a estar en

función de los factores de crecimiento (estado juvenil o adulto), reproducción (fase perene o anual) y factores ambientales estos van a incidir y propiciar cambios a nivel molecular. Lo que se puede adjuntar como cambios estacionales en la composición molecular del organismo. Existe una alta factibilidad de que estas variaciones sean la causa de la presencia o ausencia del sargasterol en el alga. Por lo tanto esta hipótesis es válida, hasta que se compruebe la variación de esteroides en S. muticum a través del tiempo.

Haciendo referencia a la segunda hipótesis, que sin duda alguna se haya relacionada con la primera, existen varios puntos a considerar.

Los esteroides o sus inmediatos precursores son la materia prima para la biosíntesis de compuestos esteroideos. O bien son transformados a compuestos biológicamente activos, como lo es que a partir del fucosterol se originen otros compuestos por efectos de oxidación como: el saringosterol, 24-metilcolesterol, desmosterol y el 24-exocolesterol, como lo sugiere Knights, (1970) (ver Anexo 3).

Estudios en estereoquímica muestran evidencia extensiva sobre la configuración del radical en el C-20 (alfa-H átomo) en el núcleo esteroideo. Dicha conformación genera la estabilidad o factibilidad de formación de ciertas estructuras durante la ciclización del óxido del escualeno

(precursor de esteroides). La cual confirma de cierta manera la hipótesis propuesta, reafirmandose con la existencia de otros esteroides con configuración alfa en el carbono C-20 en forma natural. Por otra parte tenemos que considerar que la presencia del fucosterol en todas las algas pardas, es indicio de un esteroide con una conformación más estable que la del sargasterol, pero lo cual no implica su inexistencia o ausencia en el organismo, pues en la primera fase sí se logró aislar, y esto comprueba que ambos esteroides pueden formar parte del mismo proceso biosintético.

6.3 PRE-EXPERIMENTO Y EXPERIMENTO ACTIVIDAD

6.3.1 Primera Fase

La primer fase del pre-experimento mostr6 un valor relativamente elevado en relaci6n a los valores promedio en las concentraciones de colesterol del plasma sanguineo de los organismos en estudio. Por su h6bitos alimenticios (herbívoro) del conejo, la ingesti6n del colesterol es nula, (su origen es animal). Por tanto un valor promedio (ponderado) de 99 mg/dl \pm 12.47 fu6 considerado como un valor elevado para dicha situaci6n. Sin embargo dicho valor fu6 representativo, dado que la prueba de Kruskal-Wallis, no mostr6 diferencias significativas en las concentraciones de colesterol para los tres grupos que conformaron la fase.

A partir de los datos obtenidos se plantea lo siguiente:

a) Los altos valores determinados por el m6todo de Liebermann-Burchard sugiere la presencia de ciertas sustancias que mostraron interferencias, dentro de las cuales podemos mencionar principalmente a la hemoglobina, los bromuros y las bilirubinas. Ya que en concentraciones mayores de 2.5 mg/dl ocasionan la interferencia mencionada (Chiamori et. al., 1959). Complementariamente a este criterio, se sabe que de acuerdo a la qu6mica sanguinea de los conejos estos presentan bilirubinas en concentraciones

del orden de 4.0 mg/dl (Kirk, 1984).

Las determinaciones *in vivo* fueron sobre colesterol total y no colesterol en estado libre. Por lo que fué factible la cuantificación de algún otro derivado presente, dentro de los cuales se incluyen un grupo de esteroides que son comunes a todos los organismos, como lo son las hormonas sexuales.

6.3.2 Segunda Fase

En la segunda fase del Pre-experimento la evaluación de los posibles efectos del aceite de almendras sobre la determinación del colesterol total en suero sanguíneo de conejos fué nula.

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas para los intervalos de 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs, en al menos uno de los tres grupos del pre-experimento.

También se aplicó la prueba de Wilcoxon en cada intervalo para determinar diferencias significativas entre grupos, encontrándose que para los tres últimos intervalos de tiempo existieron diferencias significativas entre los grupos 1 y 3, así como 2 y 3, lo cual implica que el grupo tres difirió significativamente en sus niveles de colesterol,

por efecto de su asimilación al ser administrado a los organismos. Para los intervalos de 24 hrs y 48 hrs se determinaron aparentemente diferencias significativas en las concentraciones de colesterol; lo cual contradice lo esperado, proponiéndose como posibles causas que originaron dichas diferencias las siguientes: a) El número de muestras para cada grupo de cada intervalo se encuentra en el límite inferior de la prueba estadística es decir se requiere de mayor número de observaciones para poder establecer dichos cambios.

b) El intervalo de confianza alfa no es el más recomendable.

6.3.3 Tercer Fase

La última fase del pre-experimento tenía como finalidad la evaluación del porcentaje de asimilación del colesterol suministrado via subcutánea en conejos. De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis los grupos 1 y 3 mostraron valores significativamente diferentes. Lo cual a su vez se vió reflejado en el valor promedio de porcentaje de asimilación este es debido al colesterol suministrado al grupo tres.

Analizando los datos del experimento de actividad se encontró que la pequeña variancia entre estos grupos asegura la uniformidad en los datos del testigo (grupo 1).

El grupo dos mostró un valor elevado de colesterol asociado al suministro que le fué dosificado, donde se encontro un porcentaje de asimilación alto (Tabla VII). El grupo 3 mostró una disminución paulatina pero continua en los niveles de colesterol con relación al tiempo, se observó una acción depresiva del orden de un 73 %. Lo cual nos permite inferir su condición activa como agente hipocolesterolémico por la comparación de los tres grupos.

La prueba de Kruskal-Wallis demostró que para los intervalos de 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs se presentaron diferencias significativas entre los grupos dos, tres y los grupos uno, tres; lo que implica que el tercer grupo a partir de las 24 hrs empezó a mostrar diferencias significativas, en los niveles de colesterol, por efecto de la dosis suministrada via oleosa. Subsecuentemente la misma prueba mostro diferencias entre los grupos dos, tres y los grupos uno, tres para los siguientes intervalos, lo que corrobora lo anteriormente expuesto.

Sin embargo las diferencias significativas de estos intervalos también se aplican a los grupos uno y dos, lo cual refleja que si existe un diferencia significativa, la cual es atribuida a la actividad hipocolesterolémica que causa el fucosterol. Entre los grupos 1 y 3 no existió una diferencia significativa, lo cual mostró la eficacia de este agente

hipocolesterolémico.

Cabe señalar que no es sencillo dar una explicación definitiva del proceso metabólico y circunstancias por las cuales se ven disminuidos los niveles de colesterol; Sin embargo, podemos considerar ciertos factores que pudiesen clarificar este punto, como la actividad del *beta-sitosterol*, el cual para disminuir la absorción del colesterol forma un complejo (*beta-sitosterol* y colesterol), el cual posee una solubilidad menor (Reiner, 1962)

7. CONCLUSIONES

A.- El procedimiento de Reiner, et. al., (1962) presentó el mayor rendimiento en el aislamiento de fitoesteroles crudos a partir de *Sargassum muticum*.

B.- En la especie en estudio se aislaron los siguientes Sargasterol, Fucosterol y tentativamente una mezcla del α -7 Colestenol y el 24-Metilencolesterol.

C.- El sargasterol fue aislado únicamente en la primer parte de la fase experimental, aislandose en la segunda fase fucosterol. Lo que indico que su aislamiento no siempre es reproducible.

D.- Fucosterol presentó una actividad hipocolesterolémica en el suero sanguíneo de conejos del orden de un 73 %.

E.- El porcentaje de asimilación de colesterol via subcutanea fue de 90.5 % de eficiencia.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio más profundo sobre el funcionamiento e la posible aplicación fisiológica del compuesto 21 *alfa*, 24-Etilcolestan-5,24, (28) - Dien- 3 *beta*-ol (Fig. 23) aislado por primera vez en el alga Sargassum muticum.
- Llevar a cabo una variación estacional con respecto a los extractos del alga S. muticum, con la finalidad de detectar el contenido de fracciones esteroidales a través del tiempo.
- Evaluar la biomasa de esta alga Phaeophyta a lo largo de la costa de Baja California, para poder determinar la factibilidad técnico-económica de este recurso renovable.
- Cuantificar el sargasterol y fucoesterol presente en el alga S. muticum por métodos cromatográficos (cromatografía de gases) o bien por diseño de un método colorimétrico especializado.
- Caracterizar química y espectrofotométricamente las especies más abundantes del género Sargassum con el objeto de detectar en ellas sargasterol.

- Ensayar el uso del extracto crudo o del alga como agente hipocolesterolémico.

- Evaluar la rentabilidad de la obtención de fitoesteroles a partir de S. muticum para su uso en farmacología.

- Efectuar estudios para comercializar el alga en seco, o sus extractos crudos con la finalidad de exportarse a países tecnificados para su purificación parcial o total.

INDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1 Principales Pigmentos
Constituyentes del Alga
Sargassum muticum. Lewey
y Gorham (1984)
- ANEXO 2 Descripción General y
Algunos Aspectos del alga
Parda Sargassum muticum
Abbott, Hollenberg (1976) y
Bold (1978)
- ANEXO 3 Estructuras Químicas de
los Esteroles Presentes en
Algas Phaeophytas (pardas)
Patterson (1971) y Goodwin
(1974)

ANEXO 1

PRINCIPALES PIGMENTOS

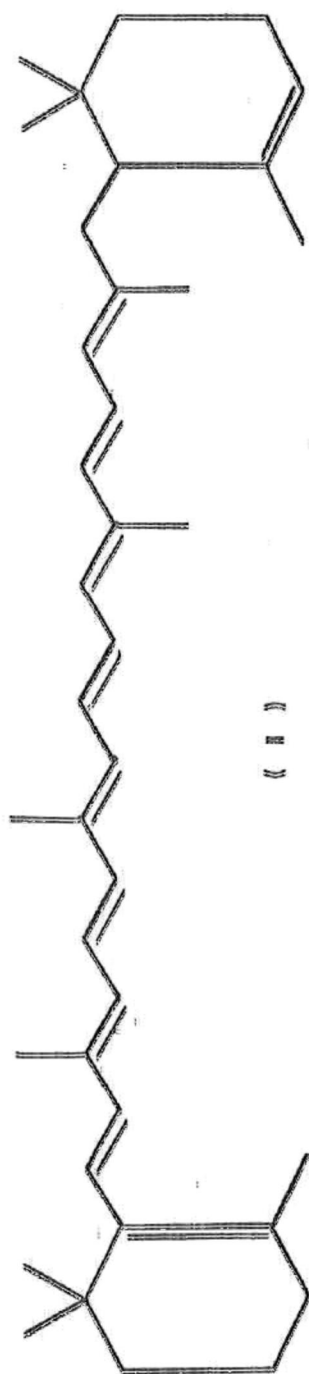
CONSTITUYENTES

DE SARGASSUM MUTICUM

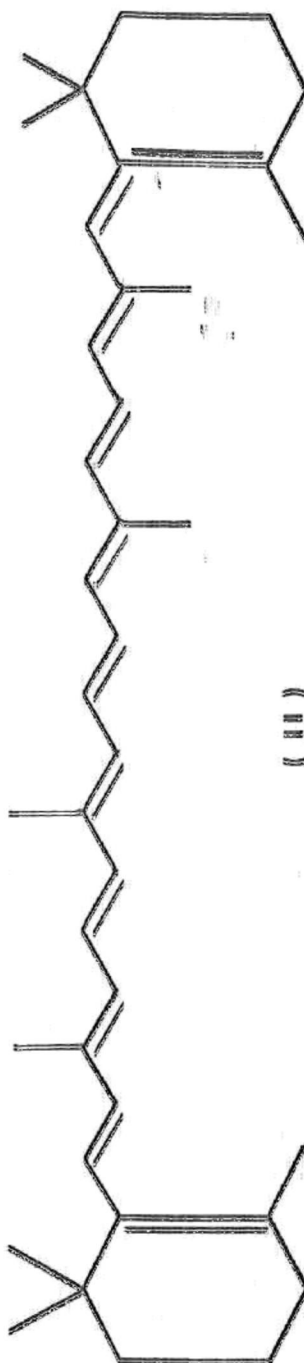
LEWEY Y CORHAM (1984)

INDICE DE ESTRUCTURAS

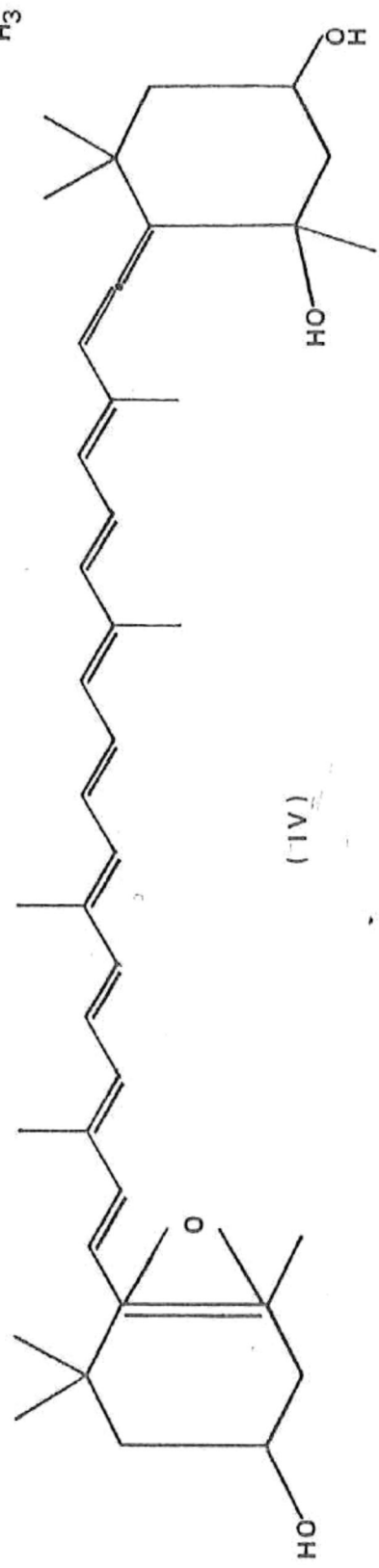
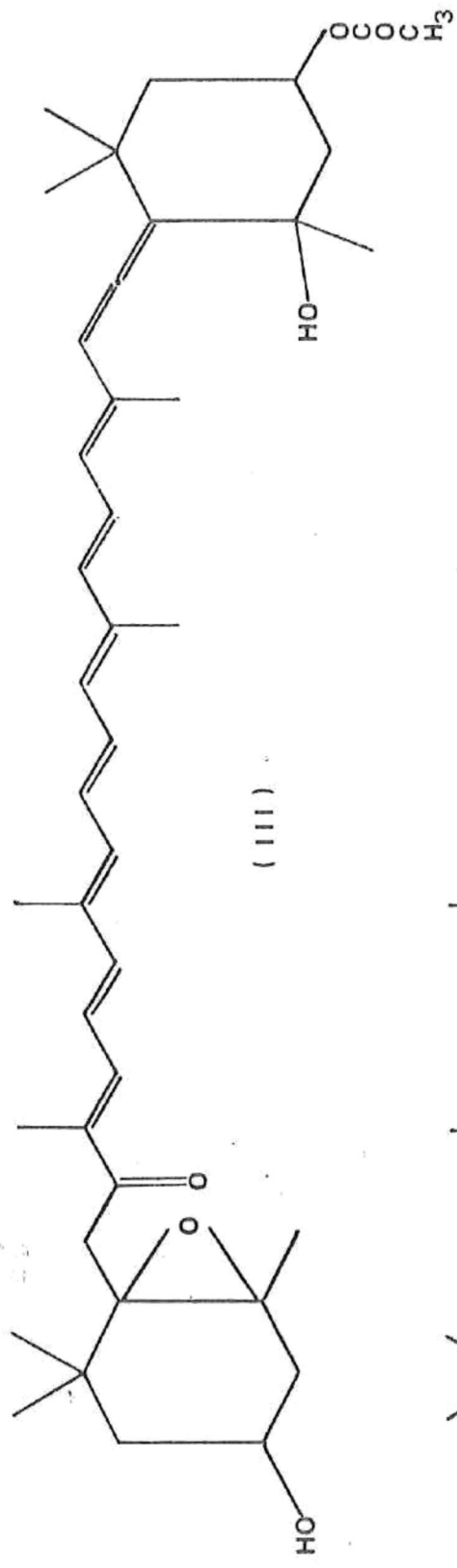
- I.- α -CAROTENO
- II.- β -CAROTENO
- III.- FUCOXANTINA
- IV.- NEOXANTINA
- V.- LUTEINA
- VI.- VIOLAXANTINA
- VII.- DIATOXANTINA
- VIII.- DIADINOXANTINA
- IX.- CLOROFILA A
- X.- CLOROFILA B

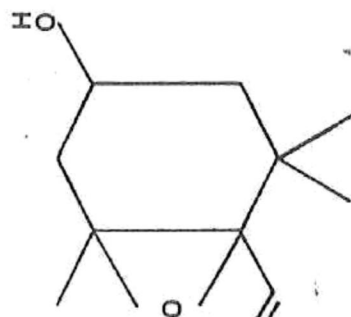
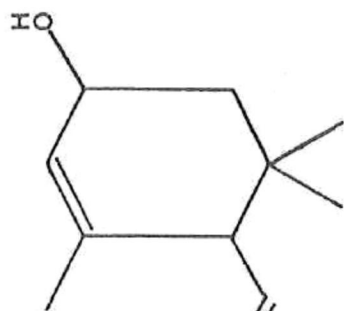


(II)



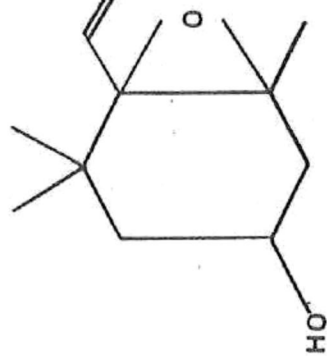
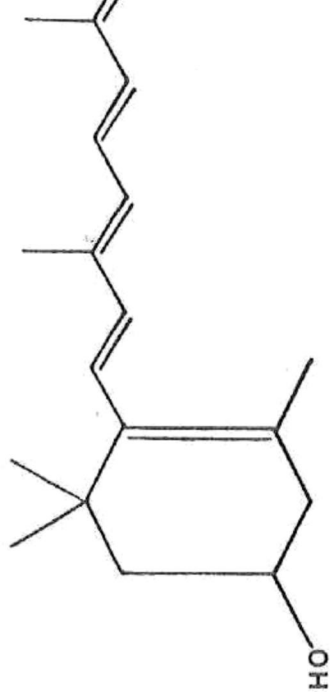
(III)

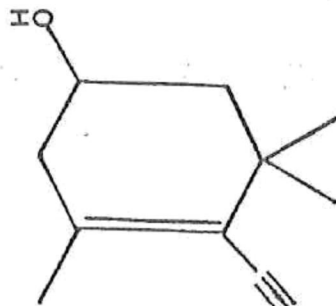
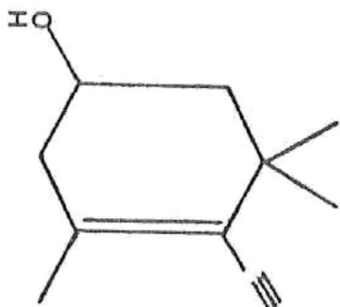




(V)

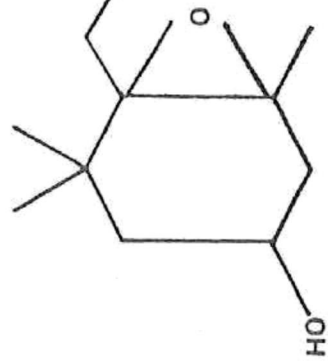
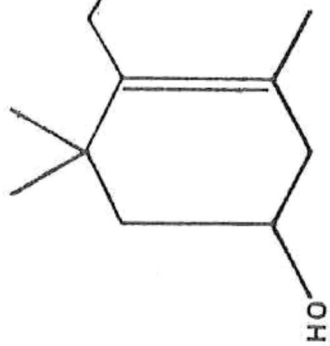
(VI)

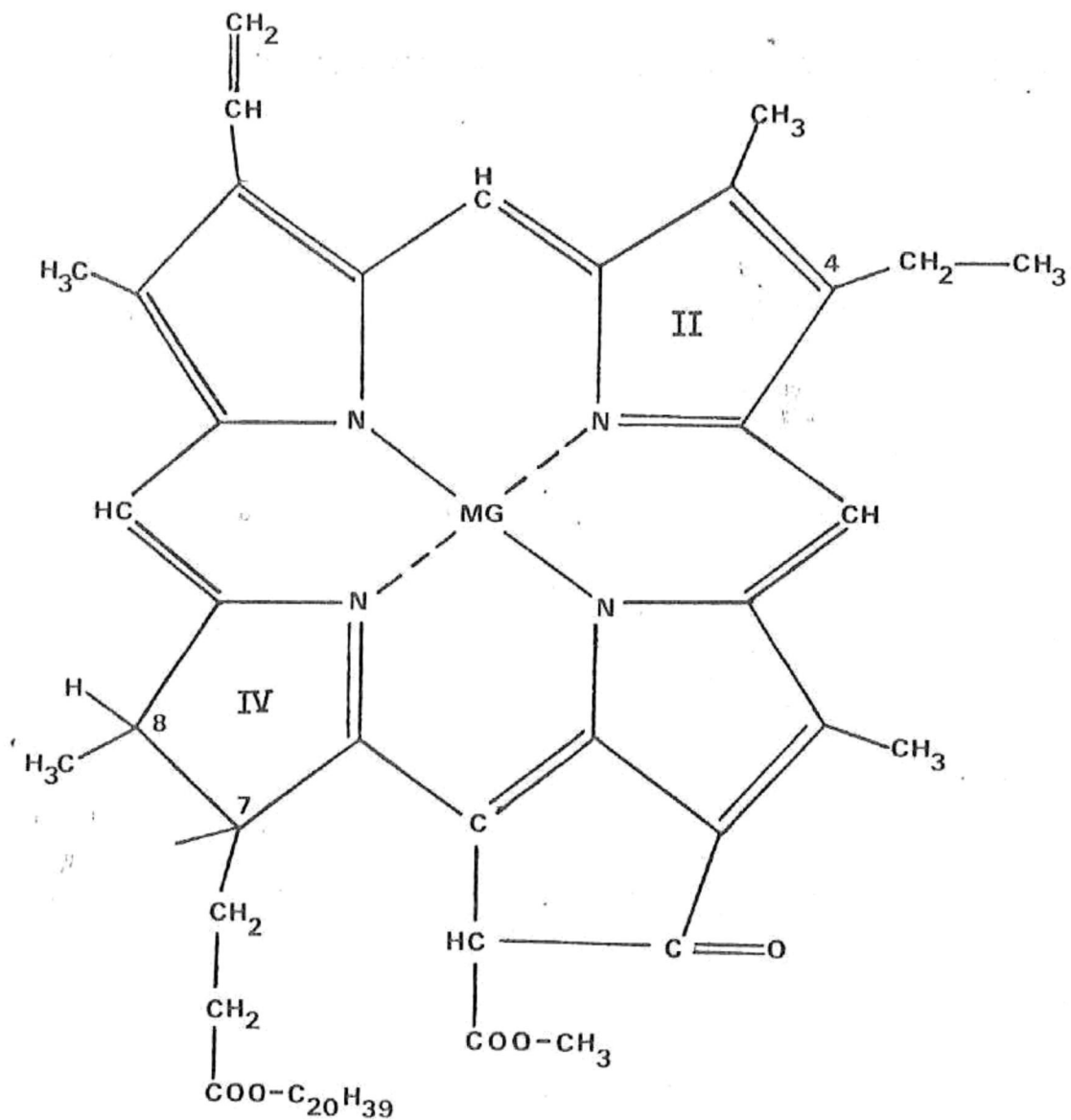




(VII)

(VIII)





(IX)

(X) IV-7 = CH = CHCOOH
 DOBLE ENLACE EN IV-7,8;
 II-4 = CH = CH₂

ANEXO 2

DESCRIPCION GENERAL Y

ALGUNOS ASPECTOS

DEL ALGA PARDA

SARGASSUM MUTICUM

ABBOTT, HOLLENBERG (1976) Y

BOLD (1978)

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt

Descripción

Esta alga pertenece a la familia Sargacea, del orden de las fucales cuya distinción más significativa es la completa ausencia de alternancia de generaciones, es decir las plantas son diploides.

Sargassum es un alga de talla mediana (hasta 2 m. de longitud), su talo es perene y anual el cual esta muy ramificado, es de color café amarillento (pardo) con su órgano de fijación discoide, sus filoides principales (basales) aparecen en la parte basal a unos 5 cm de altura de la planta, repetidamente y con ramificaciones alternadas hasta llegar a una forma intrincada, es decir un talo arbustoso. Sus filoides (hojas) son de forma lineal-lanceoladas en la porción basal del estipe, llegando a medir hasta 10 cm, las orillas de los filoides son dentadas o serratadas. Los filoides entre más altos se encuentren en el estipe son mas chicas, generalmente de solo 4mm de longitud y sus orillas son lisas o dentadas. Sargassum es una planta monoica en donde sus organos reproductivos nacen en apéndices especiales llamados receptáculos los cuales son de 1 cm de largo por 2mm de espesor y tienen una apariencia de estar abultadas. Estos abultamientos son realmente las aberturas de

unas depresiones llamadas conceptáculos en donde se hayan situados los órganos sexuales. No siempre se encuentran plantas fértiles.

Los pneumatocistos, estructuras pequeñas de forma redonda son más prominentes que otras algas de esta familia. Son utilizados para distinguir *S. muticum* de otras especies y algas del mismo orden. Estos pneumatocistos se encuentran llenos de gas lo cual le confiere flotabilidad a las plantas. En *S. muticum* nacen en racimos o sencillos en el eje de los filoides, son lisos y de forma esférica.

Habitat y distribución

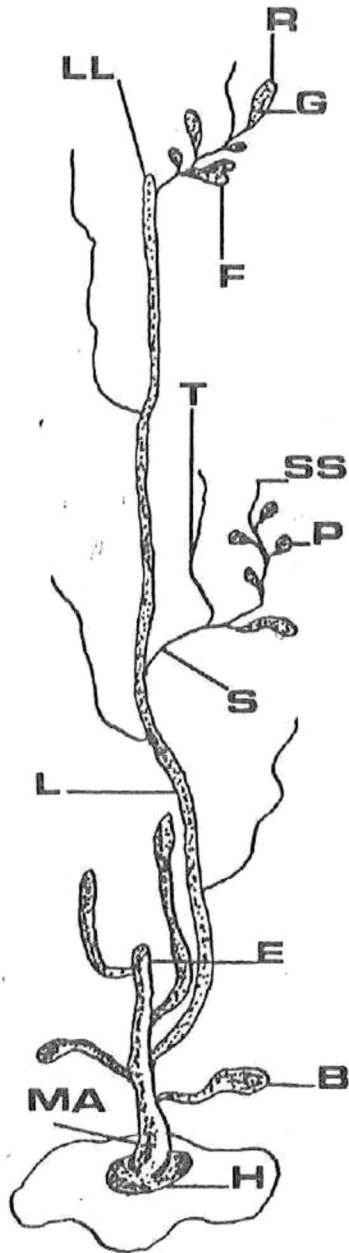
Son localmente abundantes, saxícolas. Se encuentran mantos densos en agua calma, su distribución en la vertical va desde el infralitoral inferior hasta el mesolitoral superior (3 m. a 5 m.). Esta alga no es nativa de esta zona sino que es una especie japonesa la cual fue introducida accidentalmente por la importación de ostiones para cultivos en esta zona. Fue localizada por primera vez en la vecindad de Coos Bay, Oregon. Hoy en día su distribución geográfica en el continente americano abarca desde la isla de Vancouver, Columbia Británica (America del Norte) hasta Baja California Sur (México).

Comentarios

Los pneumatocistos los cuales como se mencionó confieren flotabilidad, son una de las características más importantes de Sargassum. Esto contribuye a su ocurrencia dispersa y a su éxito como invasor en territorios nuevos. Cuando una rama (parte del talo) se rompe y queda desprendido del cuerpo de la planta, puede viajar (ir a la deriva) con las corrientes y ser arrastrado hasta otras áreas tropicales y subtropicales, *S. muticum* presenta una amplia tolerancia a las temperaturas del agua y por lo tanto a adaptarse rápidamente en el orden de poder colonizar exitosamente un área extensa y nueva como ha sucedido en la costa del pacífico .

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt

PARTES ESTRUCTURALES



H.- ORGANOS DE FIJACION

MA.- EJE PRINCIPAL

P.- NEMATOCISTO O VESICULA DE GAS

B.- FILICES BASALES (HOJAS)

R.- RECEPTACULO

C.- CONCEPTACULO

F.- FILOIDES

L.- LATERAL PRIMARIA

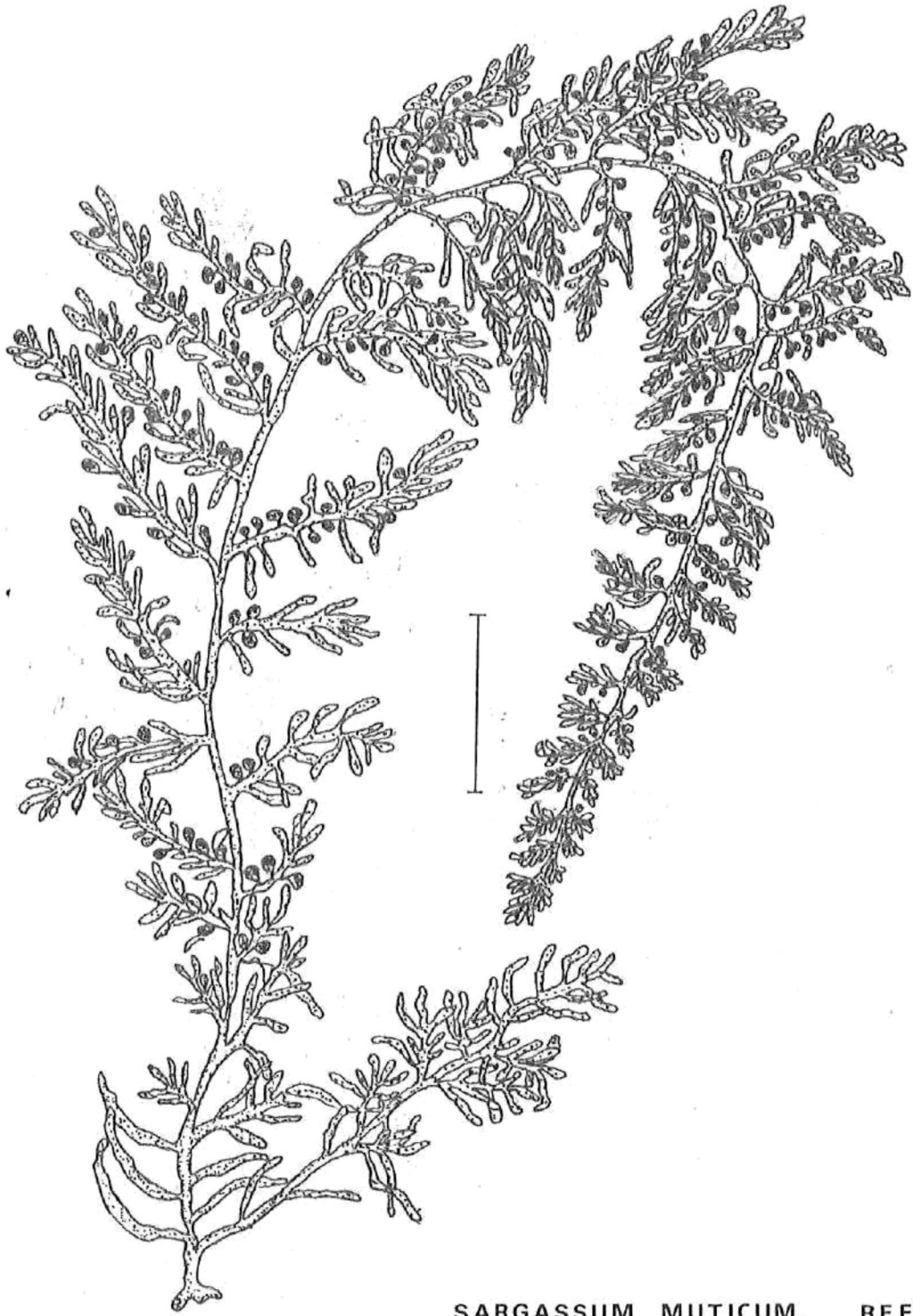
LL.- APICE DE LA LATERAL PRIMARIA

E.- LATERAL PRIMARIA INICIAL

S.- LATERAL SECUNDARIA

SS.- APICE DE LA LATERAL SECUNDARIA

T.- LATERAL TERCIARIA



SARGASSUM MUTICUM. REF. 5 CM.

ANEXO 3

ESTRUCTURAS QUIMICAS DE

LOS ESTEROLES PRESENTES

EN ALGAS PHAEOPHYTAS (PARDAS)

PATTERSON (1971) Y GOODWI (1974)

INDICE DE ESTRUCTURAS

I.- FUCOSTEROL

II.- SARGASTEROL

III.- SARINGOSTEROL

IV.- 24-METILEN-COLESTEROL

V.- BRASSICASTEROL

VI.- CLIONASTEROL

VII.- 5, 24 (28) - STIGMASTADIEN-3 β , 7 α
DIOL

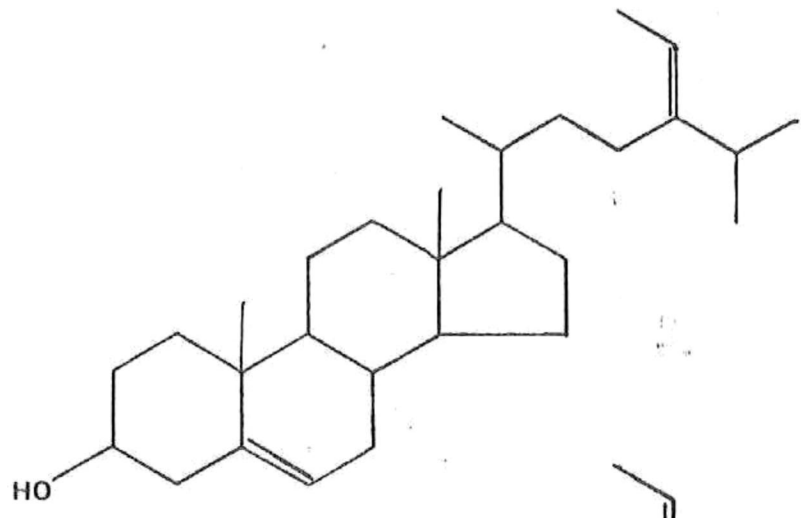
VIII.- 3, 5, 24 (28) - STIGMASTATRIEN-
7ONA

IX.- DESMOSTEROL

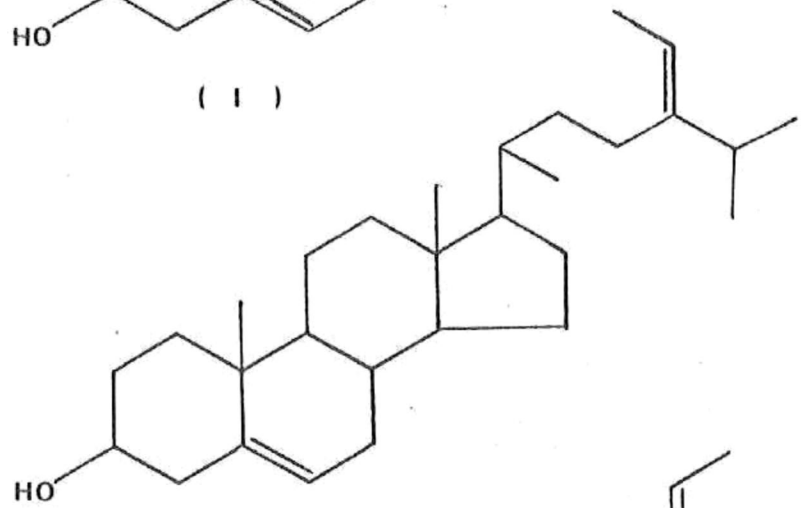
X.- COLESTEROL

XI.- 7 α -HIDROXIFUCOSTEROL

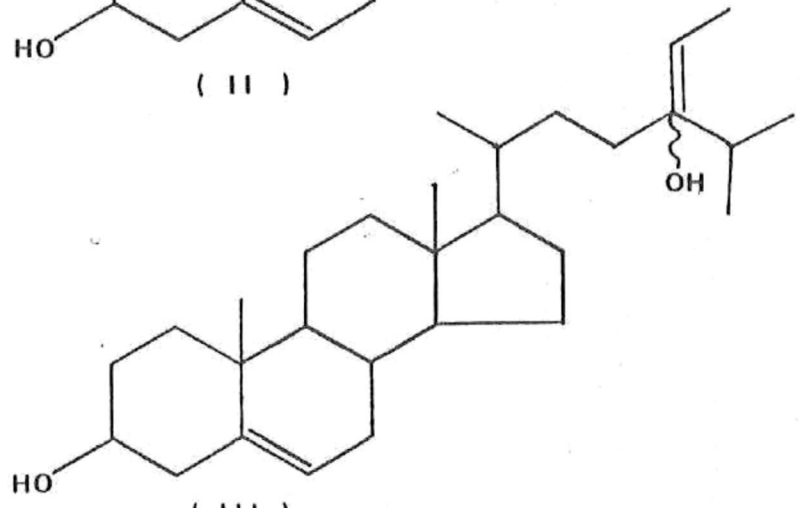
XII.- 24-OXOCOLESTEROL



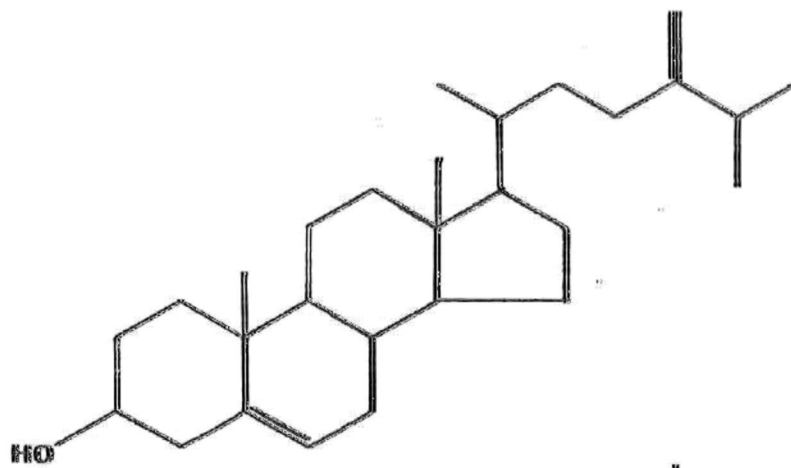
(I)



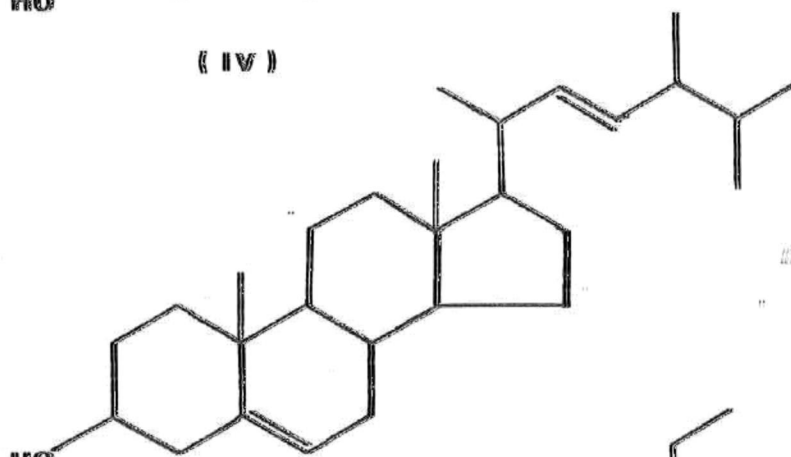
(II)



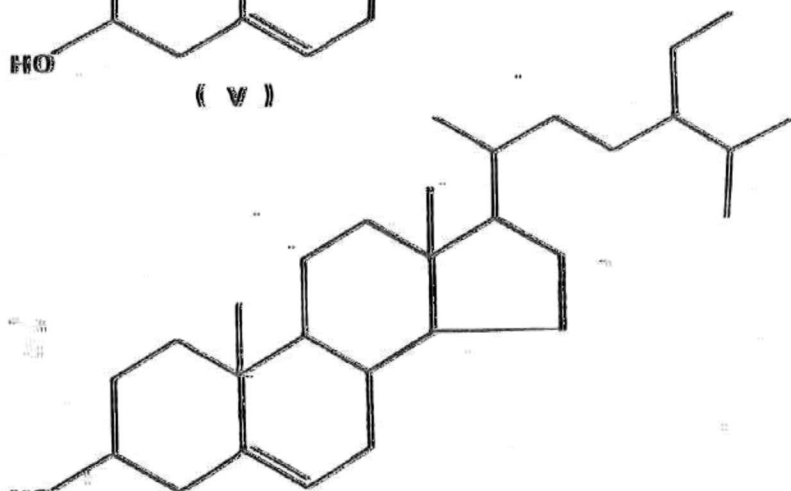
(III)



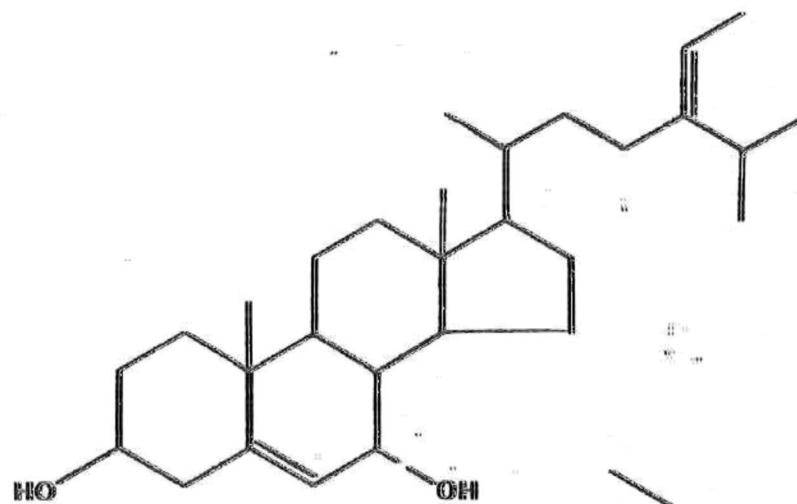
(IV)



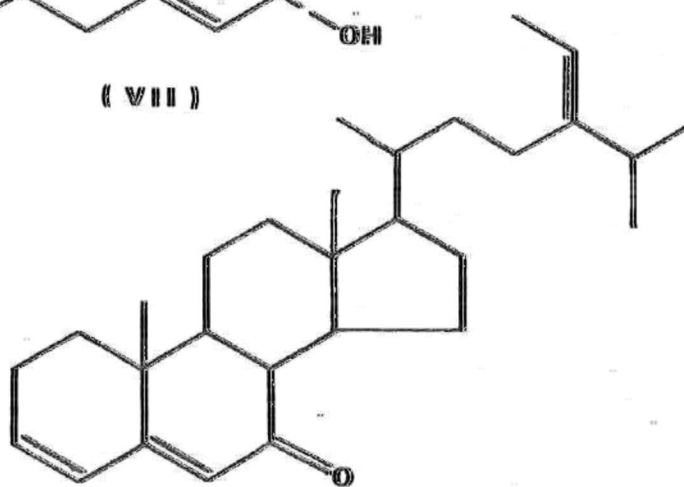
(V)



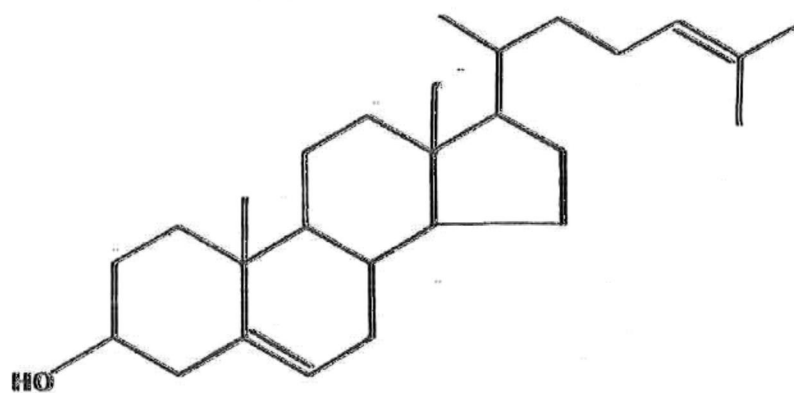
(VI)



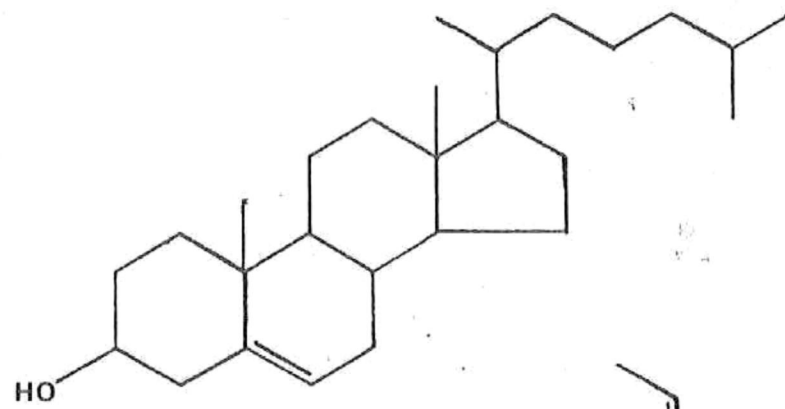
(VII)



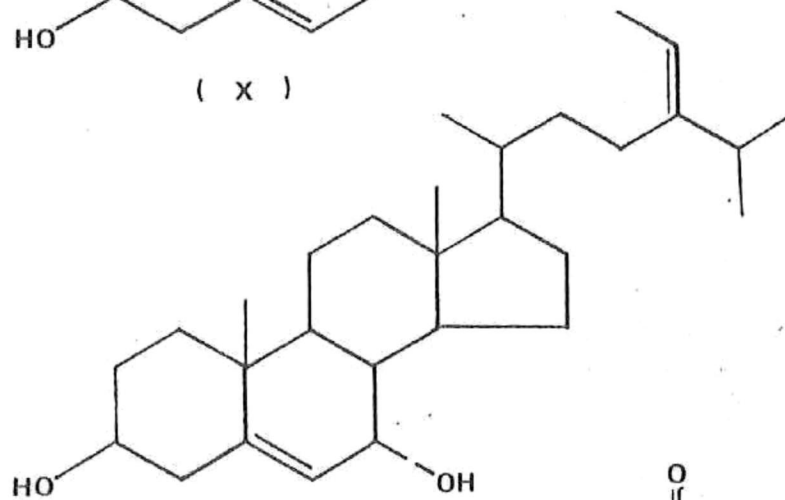
(VIII)



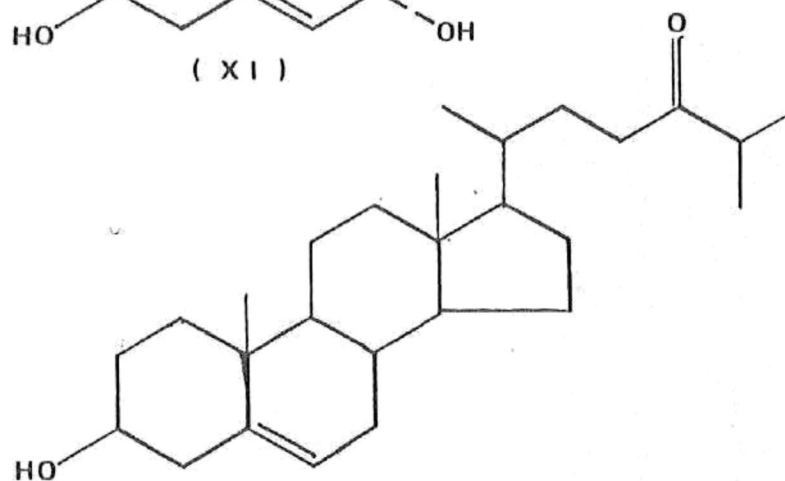
(IX)



(X)



(XI)



(XII)

BIBLIOGRAFIA

Aguilar-Rosas, R., 1985

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt (Fucales, Phaeophytas)
en las costas de Baja California, México. Revista Ciencias
Marinas (Méx) Vol. 11 (2) pp. 127-129

Baslow, Morris H., 1977

Marine Pharmacology. A study of toxins and other biologically
active substances of marine origin. Robert E. Krieger
publishing company. Huntington, New York pp. 79-81

Beveridge J. M. R., Ford Connell W., Mayer G. A. and Haust H.
L., 1958

" Hypocholesterolemic action of certain fats "

Can. J. Biochem. Physiol. Vol 36.

Chiamori, N. and Henry, R. J., (1959)

" Interfering substances in a quantitative colorimetric
procedure for the determination of total serum cholesterol "

J., Am. J. Clin. Path. 31: 305

Dominguez, Xorge A. (1979)

Métodos de Investigación Fitoquímica.

Edit. Limusa México pp. 139-148

Goodwin, T. W., 1974

Botanical Monographs Vol. 10 " Algal physiology and
biochemistry " W.D.P. Stewart University of California Press
Berkeley and Los Angeles pp. 266-280

Gupta, K. C., 1967

"Sterol Contents of the Coelenterate Palythoa tuberculosa"
Ph. D. Dissertation University of Hawaii, Honolulu

Hayatsu, R., 1957

Steroids Studies VII Chem. Pharm. Bull 5, 452-459

Heftmann, E., 1971

"Functions of sterols in plants"
Lipids, 6, pp. 128-133

Heilbron I., Phipers R.F., y Wrighti H.R., 1934

"The chemistry of the algae. Part I. The algal sterol
Fucosterol" J. Chem. Soc. C1572

Hoppe A. Heinz, Tore Levring, Yukio Tanaka (1979)

"Marine Algae in Pharmaceutical Science"

Ed. Walter De Gruyler, pp.25, 139, 165, 203 y 243.

Ikekawa N., Merisaki N., y Yoshida N., 1966

" Sterol composition in some green algae and brown algae "
Steroids 12, 41-46.

Ikekawa N., Tsuda K., and Merisaki N., 1966

" Saringosterol : A new sterol from brown algae " Chem. Ind.,
1179-1180.

Knights, B. A., 1970

"Sterols in Ascephyllum nodosum"

Phytochemistry, Vol 9 pp 903-905 Pergamon Press, England

Fent-Altaba, M. 1972

"Atlas de Mineralogia"

Editorial Barcelona, España

Lewey, S. A., y Gerham J. 1984

"Pigment composition and photosynthesis in Sargassum muticum"

Marine Biology 80, 109-115 Springer-Verlag

Miller, J.D.A. 1962

Fats and Steroids. In physiology and Biochemistry of Algae.
(Edited by Lewin R.A.), Academic Press, New York

Monmaney T. & Springen K., (1988)

"The Cholesterol Connection"

Newsweek Vol. CXI, No.6 February 8: 47-49

Pacheco, R. I., 1978

" Algas pardas (feofitas) de la costa del p&acufico entre Bahía de Todos Santos y la frontera con Estados Unidos de America, (E.U.A.) " Tesis de Licenciatura, E.S.C.M. U.A.B.C.

Patterson G. W., 1967

" Sterols in Laminaria "

Comp. Biochem. Physiol., 24, 501-505.

Patterson G. W., 1971

"The distribution of sterol in algae"

Lipids 6, 120-7

Pretsch, Clerc, Seibl, Simon., 1983

"Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds"

Springer-Verlag, Germany

Reiner E., Idler D. R., And Wood J. D., 1960
"A hypocholesterolemic factor in marine sterols"
Can. J. Biochem. Physiol. Vol. 38

Reiner E., Topliff J., and Wood J. D., 1962
"Hypocholesterolemic agents derived from sterols of marine algae". Can. J. Biochem. Physiol., 40, 1401-1406.

Scagel Robert F., 1956
"Introduction of a Japanese alga, Sargassum muticum into the northeast Pacific". Fish. Res. Pap. St. Wash., Vol 1, pp. 49-58.

Scheuer Paul J., 1973
Chemistry of Marine Natural Products. Academic Press, New York and London .

Scheuer Paul J., 1978
"Marine Natural Products", Chemical and Biological Perspectives. Academic Press, Vol. 1

Secretaría de Marina, 1974.
Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo.
Estudio geográfico de la región de Ensenada, B.C. 59-61 pp.

Siegel, Sidney (1986)

"Estadística No Paramétrica"

Edit. Trillas, México, D.F.

Tsuda K., Akagi S., Kishida Y., 1957

"Sargasterol from Sargassum ringgoldianum Harvey" Chem.
Pharm. Bull. 5, 85

Tsuda K., Hayatsu R., Kishida Y., & Akagi S., 1958a

" Studies on the constitution of sargasterol " Steroid
studies-VI. J. Am. Chem. Soc. 80, 921-925 .

Tsuda K., Akagi, S., Kishida, Y., Hayatsu R., y Sakai K.,
1958b

Steroid Studies VIII Chem. Pharm. Bull. 6, 724

Wood J. D., 1960

"Dietary marine fish oils and cholesterol metabolism"

Can. J. Biochem. Physiol. Vol. 38