



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ÁNGEL, OAXACA

**“ESTUDIO PRELIMINAR DE LA COMPOSICIÓN
ESTEROIDAL DEL OFIUROIDEO *Ophiocoma aethiops*
(Lütken, 1859)”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO MARINO

PRESENTA

MARÍA ZULEMA JUÁREZ CORTÉS

DIRIGIDA POR

M. EN C. MA NIEVES TRUJILLO TAPIA

Puerto Ángel, Oaxaca Febrero del 2011

Puerto Ángel, Oaxaca, Febrero del 2011

HIDROBIÓL. GABRIELA GONZÁLEZ MEDINA
JEFA DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA
DE LA UNIVERSIDAD DEL MAR
P R E S E N T E

Después de haber analizado y evaluado la tesis “**Estudio preliminar de la composición esteroideal del ofiuroido *Ophiocoma aethiops* (Lütken, 1859)**” que presenta la C. María Zulema Juárez Cortés, le comunicamos que cumple con los requisitos académicos para que la citada tesista presente el correspondiente examen profesional.

ATENTAMENTE
COMISION REVISORA

M. en C. Ma Nieves Trujillo Tapia

Dra. Angelina Flores Parra

Dr. J. Marco Vinicio Ramírez Mares

Dra. Ma. del Socorro García Madrigal

M. en C. Julia Patricia Díaz Martínez

RESUMEN

En la actualidad, se ha demostrado que el estudio de la composición esteroideal de especies de equinodermos con diferentes hábitats da una idea de cómo, factores poblacionales, estacionales y geográficos influyen a lo largo de la ruta biogenética de estos metabolitos. Por ello en este trabajo se realizó un estudio preliminar sobre la composición esteroideal de estos organismos, para lo cual se llevaron a cabo dos muestreos en la playa “La Tijera”, Oaxaca, en Abril del 2009 y en Marzo del 2010. La biomasa total obtenida fue sometida a dos tratamientos, los cuales consistieron en una extracción fraccionada de mayor a menor polaridad y una extracción por disolvente individual respectivamente, utilizando los disolventes metanol, butanol, acetato de etilo, cloroformo y hexano en el tratamiento 1 y hexano, cloroformo y acetato de etilo en el tratamiento 2; se evaluaron tres tiempos de extracción 6, 12 y 24 horas; siendo 24 horas el que mejor rendimiento dió, posteriormente se determinó y cuantificó la presencia de esteroides mediante la prueba Liebermann-Burchard, los extractos positivos fueron analizados por cromatografía en capa fina probando 6 fases móviles benceno-acetato de etilo (50:10); butanol-acetato de etilo-agua (40:50:10), (120:30:10); etil éter-éter de petróleo (1:99), (4:96) y (8:92), siendo esta última proporción la más adecuada para la separación de los compuestos. La separación de los mismos fue realizada por cromatografía en fase sólida y columna abierta, obteniendo las fracciones finales 3H, Z3 y A, las cuales se estudiaron por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectroscopía de masas y espectroscopía infrarroja (IR), encontrándose en la fracción 3H un compuesto con el anillo esteroideal, el cual no pudo ser identificado completamente. En Z3 se identificaron dos compuestos esteroidales y en A no pudo identificarse ninguno de los dos compuestos presentes.

El amor, el ejemplo y las lecciones que los padres brindan a sus hijos, así como las distintas experiencias que ofrece la vida, y las decisiones que tomamos de manera individual, nos ayudan a formar el carácter y ser mejores cada día. Por esta razón quiero dedicar este trabajo a mis padres Benito Juárez Gutiérrez y María Cortés Hernández, quienes son para mí, grandes ejemplos de lucha y superación.

INDIVISA MANENT
(Permanezcamos siempre unidos)

AGRADECIMIENTOS

El trabajo en equipo permite la realización de un objetivo o meta, por ello deseo agradecer a todas esas personas que colaboraron para que este trabajo de tesis se hiciera realidad.

En primer lugar agradezco a mis padres quienes a pesar de todas las dificultades que han vivido, siempre me han apoyado y motivado para cumplir mis objetivos. Los amo, como ustedes nadie.

A mis hermanas, Viviana Inés Juárez Cortés y Rosario Juárez Cortés quienes a pesar de la distancia siempre han estado conmigo en las buenas y las malas.

A Jorge Alberto Sánchez Burgos persona especial para mí y además pilar de este trabajo, que sin la guía, la paciencia y el conocimiento que me ha brindado, no sé si esto se hubiera hecho realidad. Gracias por la motivación y el apoyo.

A mis amigas y amigo: Aurora Villa Esparragoza, Hermelinda Santiago Gutiérrez, Perla Elizabeth Carrasco Bautista, Esmeralda Morales Domínguez, Cristina Hernández Tlapale, Rosa Estela Cerqueda y Miguel Matus (ñoño) gracias por los bellos momentos, por los disgustos, por el apoyo, por las ricas comidas y cenas, por las tardes y noches de tertulia y películas, por los tecitos para mi tos, por las risas y por toda la comprensión brindada a este ser humano imperfecto. Las quiero mucho y a ti también ñoño.

A Inés Cruz Salinas y Bricio de Nova por abrirme la puerta de su hogar y considerarme como un miembro más de su familia, y en especial a ti Ine porque nunca me dejaste sola, gracias por todo tu apoyo en los malos momentos emocionales y económicos, eres una gran amiga y mamá postiza.

A Samantha Flores Morales quien me brindó su amistad cuando creí que me había quedado sola.

Al Dr. Rolando Cardeña, Cristina Hernández, Ma. Trinidad Domínguez, H. Hiram Ortiz, Jorge Sánchez, Lorena Contreras, Elizabeth Franco y Leonides Aquino quienes colaboraron con su tiempo y esfuerzo para que los muestreos se pudieran llevar a cabo.

A mi directora de tesis Ma Nieves Trujillo Tapia, por aceptar el reto de este trabajo, y por la motivación que me brindó en mis malos momentos.

A la Dra. Angelina Flores Parra, Profesora en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), por su ayuda en la identificación de los compuestos aislados.

Al Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares jefe del Laboratorio de Investigación de Biología y Química por todas las facilidades brindadas, así como por sus observaciones a este trabajo.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE CUADROS.....	xiii
INDICE DE ECUACIONES.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Phylum equinodermata.....	2
1.1.1 Clase ophiuroidea.....	2
1.1.1.1 Ophiocoma aethiops (Lütken, 1859).....	4
1.2 Los lípidos: Clasificación y funcionalidad en los organismos vivos.....	5
1.2.1 Esteroides: clasificación, estructura molecular y funciones que desempeñan en los organismos.....	6
1.2.2 Biosíntesis de esteroides en organismos marinos.....	8
1.2.3 Esteroides presentes en invertebrados marinos.....	9
1.3 Métodos de extracción de lípidos.....	11
1.4 Determinación de colesterol y derivados.....	12
1.5 Técnica de cuantificación por curva de calibración.....	13
1.6 Métodos de separación de lípidos.....	13
1.6.1 Métodos cromatográficos.....	13
1.6.1.1 Cromatografía en capa fina (TLC).....	14
1.6.1.2 Separación en columna abierta.....	15
1.6.1.3 Extracción en fase sólida.....	15
1.7 Técnicas de dilucidación.....	16
1.8 Estudios realizados a nivel bioquímico y tecnológico en equinodermos.....	17
1.8.1 Estudios bioquímicos y biotecnológicos realizados en la clase Ophiuroidea.....	17
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 General.....	19
3.2 Particulares.....	19
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1 Zona de recolecta.....	20
4.2 Recolecta e identificación.....	21
4.3 Trabajo de laboratorio.....	21
4.3.1 Extracción de los compuestos esteroidales.....	21

	Página
4.3.2 Determinación colorimétrica de esteroides por la reacción de Liebermann-Burchard (modificado de Parekh y Chanda, 2006).....	23
4.3.3 Cuantificación de compuestos esteroidales	23
4.3.3.1 Curva de calibración.....	23
4.3.3.2 Determinación de la concentración de compuestos esteroidales en los extractos crudos de <i>O. aethiops</i>	24
4.3.3.3 Análisis estadístico	24
4.3.4 Separación de los compuestos esteroidales mediante técnicas cromatográficas.....	24
4.3.4.1 Cromatografía en capa fina	24
4.3.4.2 Cromatografía en fase sólida y columna abierta (<i>Peña et al.</i> , 2003).....	25
4.3.4.3 Evidencia y limpieza de los compuestos esteroidales de las fracciones obtenidas de los extractos crudos de <i>O. aethiops</i>	26
4.3.4.4 Identificación de los compuestos obtenidos del extracto en hexano de <i>O. aethiops</i>	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1 Obtención de los extractos crudos del tejido corporal de <i>O. aethiops</i>	28
5.1.2 Análisis estadístico	29
5.1.2.1 ANDEVA de una vía para determinar el efecto de los tratamientos en la masa obtenida por extracto crudo de <i>O. aethiops</i>	29
5.1.2.2 MANOVA para determinar el efecto del tiempo en la masa obtenida por extracto crudo de <i>O. aethiops</i>	30
5.2 Determinación colorimétrica de compuestos esteroidales en los extractos crudos de <i>O. aethiops</i>	31
5.3 Cuantificación de compuestos esteroidales por curva de calibración.....	32
5.3.1 Longitud de onda de máxima absorción en la reacción L-B con colesterol.....	32
5.3.2 Curva de calibración del colesterol y ecuación lineal obtenida para la cuantificación de compuestos esteroidales en extractos crudos de <i>O. aethiops</i>	33
5.3.3 Concentración de compuestos esteroidales en los extractos crudos de <i>O. aethiops</i>	35
5.4 Técnicas cromatográficas.....	40
5.4.1 Cromatografía en capa fina de los extractos crudos de <i>O. aethiops</i> obtenidos con el T1	40

	Página
5.4.2 Cromatografía en fase sólida del extracto crudo en hexano de <i>O. aethiops</i> obtenido en el t ₃	42
5.4.3 Cromatografía en capa fina de los extractos crudos de <i>O. aethiops</i> obtenidos en el T2	44
5.4.4 Cromatografía en columna abierta del extracto crudo de <i>O. aethiops</i> obtenido en 21 días con hexano	45
5.5 Identificación de compuestos por RMN y EM	47
5.5.1 Fracción 3H	48
5.5.2 Subfracción Z3	49
5.5.3 Fracción A	52
6. CONCLUSIONES	54
7. PERSPECTIVAS	56
8. REFERENCIAS	57
9. ANEXOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 <i>Ophiocoma aethiops</i> (Lütken, 1859).....	4
2 Distribución de <i>Ophiocoma aethiops</i> en el pacífico sur	5
3 Molécula de colesterol con los átomos de carbono enumerados; los anillos A, B y C de seis átomos de carbono (amarillo) y el anillo D con cinco átomos de carbono (verde) conforman el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno. Grupo OH (color rosa) y cadena lateral de ocho átomos de carbono (color rojo) característicos de los esteroides	7
4 Compuestos de invertebrados marinos que poseen en su estructura el núcleo esteroide	10
5 Mecanismo de la reacción Liebermann-Burchard ejemplificado para el colesterol (modificado de Burke <i>et al.</i> , 1974)	12
6 Procedimiento para la extracción en fase sólida (tomado de Macherey-Negel, 2003).....	15
7 Zona de recolecta de los ofiuroides en playa “la tijera”, Pochutla, Oaxaca	20
8 Tubo eppendorf con la solución verde-azul que forma el anillo en la reacción colorimétrica de Liebermann-Burchard con el colesterol	23
9 ANDEVA de una vía de los tratamientos 1 y 2 realizados a los extractos crudos de <i>O. aethiops</i> respecto a la cantidad de masa obtenida	30
10 MANOVA de los tiempos de extracción utilizados en los tratamientos 1 y 2	31
11 Espectro de absorción de la solución que forma el anillo en la reacción en la reacción Liebermann-Burchard con el colesterol desde una λ de 200-1100 nm, pico de máxima absorción a 295 nm	33
12 Curva de calibración y ecuación lineal ($y= 0.634x - 0.0635$) obtenidas a partir de los datos de absorbencia de la solución que forma el anillo en la reacción L-B en las distintas concentraciones del colesterol.....	34
13 ANDEVA de una vía de los extractos crudos de <i>O. aethiops</i> en los tratamientos 1 y 2 respecto al porcentaje obtenido de compuestos esteroideos.	37

Figura	Página
14 Porcentajes promedio de compuestos esteroidales presentes en los extractos crudos de <i>O. aethiops</i>	40
15 Cromatofolios con aplicaciones en cada carril, de los extractos en acetato de etilo por tiempo de extracción (t_1 , t_2 y t_3) del T1, con las fases: A) benceno-acetato de etilo (50:10); B) butanol-acetato de etilo-agua (40:50:10) y C) butanol-acetato de etilo-agua (120:30:10); en la parte superior en un círculo compuestos separados y en la parte inferior los retenidos.....	40
16 Cromatofolios con aplicaciones en cada carril, del extracto en cloroformo por tiempo de extracción (t_1 , t_2 y t_3). A) Separación de los compuestos con la fase butanol-acetato de etilo-agua (40:50:10); y B) cromatofolio revelado con luz UV a una $\lambda=254$ nm.....	41
17 Cromatofolios bajo luz UV (366 nm). En cada carril separación de las aplicaciones de los extractos en hexano por tiempo de extracción (t_1 , t_2 y t_3) con las fases: A) etil éter-éter de petróleo 1:99, B) etil éter-éter de petróleo 4:96 y C) etil éter-éter de petróleo 8:92. En círculos superiores compuesto mayoritario separado, en el círculo inferior compuestos retenidos.....	41
18 Cromatofolio revelado bajo la luz UV ($\lambda=366$ nm) en cada carril separación de las aplicaciones de los extractos crudos en acetato de etilo, hexano, cloroformo y butanol obtenidos en el t_3 , utilizando la fase etil éter-éter de petróleo 8:92. En el círculo compuesto único separado con un $R_f= 0.611$	42
19 Espectros de absorción del colesterol y la fracción 3H, separada del extracto crudo en hexano de <i>O. aethiops</i> (obtenido del T1 en el t_3). En el espectro de absorción de la fracción 3H dos picos de máxima absorción 3.53 ($\lambda= 227$ nm) y 0.419 ($\lambda= 410$ nm).....	43
20 Procedimiento realizado para separar compuestos esteroidales a partir del extracto en hexano obtenido en 21 días utilizando cromatografía en columna abierta y fase sólida.....	46

Figura	Página
21 Cromatofolio con muestras en cada carril de las fracciones obtenidas de la separación del extracto en hexano de 21 días (E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ y E ₅). En la fracción E ₄ el compuesto 3H, separado utilizando la fase etil éter-éter de petróleo (8:92).	47
22 Estructura molecular obtenida a partir de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear para el compuesto de la fracción 3H.	49
23 Estructura molecular obtenida de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear para el compuesto de la fracción Z3.	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Matriz del T2 para determinar el mejor disolvente y tiempo de extracción de compuestos esteroidales contenidos en el tejido corporal de <i>Ophiocoma aethiops</i>	22
2 Sistemas de disolventes propuestos por diferentes autores para separar compuestos esteroidales	25
3 Masa total (seca) obtenida por extracto crudo de <i>O. aethiops</i>	27
4 Resultados de la prueba Liebermann-Burchard en los extractos crudos de <i>O. aethiops</i> obtenidos en el T1	32
5 Absorbencias de la solución que forma el anillo en la reacción L-B a distintas concentraciones de colesterol y su desviación estandar	34
6 Cálculos para obtener la concentración de compuestos esteroidales en 2 mg del extracto en acetato de etilo del tiempo 1 y tratamiento 1	35
7 Concentración y porcentaje de compuestos esteroidales en extractos crudos de <i>O. aethiops</i> obtenidos con los tratamientos 1 y 2	37
8 Factor de retención (Rf) calculado para cada uno de los compuestos separados de los extractos crudos de <i>O. aethiops</i> en el T2.....	44
9 Datos del espectro de RMN 13C del compuesto 3H	49
10 Datos del espectro de RMN 13C del compuesto Z3.....	51

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1 Fórmula para calcular el factor de retención.....	14
2 Ecuación para calcular el contenido de compuestos esteroidales.....	35
3 Ecuación de proporcionalidad directa para estimar el contenido de compuestos esteroidales.....	36
4 Cantidad de compuestos esteroidales contenidos en la masa total del extracto	36