

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Aislamiento y Evaluación de la Actividad Biológica de las Briareinas A y B principales
metabolitos secundarios del gorgonio caribeño *Briareum asbestinum*

Informe de Tesis

Presentado por:

Stella María Cobar Coronado

Para optar al título de

Químico Farmacéutico

Guatemala abril del 2006.

INDICE

| | |
|--|-------|
| 1. Resumen..... | 1-2 |
| 2. Introducción..... | 3 |
| 3. Antecedentes..... | 4-6 |
| 4. Justificación..... | 7 |
| 5. Objetivos..... | 8 |
| 6. Hipótesis..... | 9 |
| 7. Materiales y Métodos | |
| 7.1 Universo de la Población..... | 10-11 |
| 7.2 Materiales..... | 11-14 |
| 7.3 Métodos..... | 14-31 |
| 7.4 Diseño de la Investigación..... | 32 |
| 7.5 Análisis e Interpretación de Resultados..... | 32-33 |
| 8. Resultados..... | 34-38 |
| 9. Discusión de Resultados..... | 39-41 |
| 10. Conclusiones..... | 42 |
| 11. Recomendaciones..... | 43 |
| 12. Referencias..... | 44-46 |
| 13. Anexos..... | 47-49 |

1. RESUMEN

Durante los últimos 40 años los productos naturales marinos han sido objeto de exhaustivo estudio por parte de la comunidad científica a nivel mundial. Los resultados de estas investigaciones científicas han dado una nueva visión al mundo del potencial que presentan los productos naturales marinos como fuente de nuevos fármacos.

En esta investigación se aíslan y evalúa la actividad citotóxica, antibacteriana y antimicótica *in vitro* de las briareinas A y B, principales metabolitos secundarios del gorgonio caribeño *Briareum asbestinum*, un coral blando abundante en aguas del caribe mesoamericano y rico en diterpenoides 2,11-ciclizados bioactivos.

Han pasado alrededor de 20 años desde que se elucidó la estructura de las briareinas A y B, sin embargo nunca han sido objeto de estudios de actividad biológica, no obstante, 130 briareinas de las casi 300 aisladas a la fecha, muestran actividad antiviral, citotóxica potente, inmunomoduladora, antiinflamatoria y antibacteriana leve.

Briareum asbestinum, se recolectó en aguas poco profundas de Punta de Manabique, ubicada en el departamento de Izabal, Guatemala, se obtuvo el extracto metanólico, se particionó vía sucesivas Cromatografía de Exclusión Molecular y Cromatografía en Columna, obteniéndose 11 mg de briareina A y 32 mg de briareina B, las cuales se utilizaron para su identificación y ensayos de actividad biológica *in vitro* respectivos.

Briareina B mostró una potente actividad citotóxica (4.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.3 μM), mientras que briareina A ligeramente menor (25.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 39.5 μM), diferencia debida muy probablemente a la presencia de funcionalidades butirato y acetato respectivamente en la posición 12 de cada molécula y comparable con las más bioactivas reportadas a la fecha.

Briareina A y briareina B no muestran inhibición significativa del crecimiento de *Aspergillus flavus* y 8 cepas puras de bacterias ensayadas *in vitro*. Es importante resaltar la actividad presentada por briareina B sobre la pigmentación de *Aspergillus flavus* e inhibición de su crecimiento luego de 7 días de inoculación, siendo este el primer estudio sobre actividad antifúngica realizado sobre briareina alguna.

Se recomienda reaislarlas para continuar estudios de citotoxicidad sobre cepas de líneas celulares cancerosas, explorar a fondo su actividad antifúngica y actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora.

2. INTRODUCCIÓN

En el globo terrestre los océanos cubren aproximadamente dos terceras partes de la superficie terrestre, existen un sin fin de especies animales y plantas marinas distribuidas en el mar. Los organismos marinos como corales blandos, esponjas, algas y microorganismos son una fuente inmensamente rica de metabolitos secundarios marinos.

Debido al estrés a que se ven sometidos estos invertebrados marinos, sin defensas físicas para rechazar a sus depredadores, producen compuestos orgánicos (metabolitos secundarios), cuya toxicidad ha demostrado ser mucho más potente que sus contrapartes terrestres.

Dentro del orden Gorgonacea, el género *Briareum* ha sido objeto de exhaustiva investigación química aislándose diversos metabolitos, destacándose los diterpenoides, entre ellos briareinas, asbestininos y briarelinas. A la fecha se han reportado alrededor de 350 briareinas, doce de las cuales se han aislado de *Briareum asbestinum*. Dentro de los estudios realizados para determinar su actividad biológica, se destacan los reportes de poseer actividad antiinflamatoria, antibacteriana, citotóxica, antiviral e inmunomoduladora. La presente investigación está orientada a generar conocimiento sobre las propiedades antimicrobianas, antimicóticas y citotóxicas de las briareinas A y B, compuestos mayoritarios del gorgonio caribeño *Briareum asbestinum*, actividad biológica no estudiada en estos compuestos, con el objetivo de conocer su potencial como posibles agentes terapéuticos.

En la investigación se extrae, separa, identifica y evalúa la actividad antimicrobiana, antimicótica y citotóxica de las briareinas A y B y establece si poseen dichas propiedades, para que con una visión de sostenibilidad, escalamiento productivo y desarrollo de tecnología apropiada, producir en un futuro, extractos bioactivos que se utilicen como medicamentos naturales.

3. ANTECEDENTES

Los océanos cubren aproximadamente las dos terceras partes de la superficie terrestre, con alrededor de 2,000,000 de especies de animales y plantas marinas distribuidas en el mar. La vida marina es mucho más rica y variada en aguas tropicales con los arrecifes de coral sirviendo de soporte para la gran diversidad de biota existente. Dos áreas principales del globo terrestre poseen arrecifes de coral: la región del Atlántico y la del Indo-Pacífico. La primera, desde el punto de vista químico, se centra en el Caribe, mientras la segunda en la gran barrera de arrecifes de Australia, las islas del Pacífico del Sur y Okinawa en el Japón.^(12.1, 12.2) Los organismos marinos, especialmente los sésiles invertebrados como corales blandos y esponjas, los móviles pero muy débiles tunicados, las algas y los microorganismos son una fuente inmensamente rica de metabolitos secundarios, con estructura química tan variada y compleja que los hacen sin precedentes a aquellos aislados de fuentes terrestres.

Debido al estrés a que se ven sometidos estos invertebrados marinos, sésiles y sin defensas físicas para rechazar a sus depredadores, generan metabolitos secundarios, cuya toxicidad ha demostrado ser mucho más potente que la de sus contrapartes terrestres. Estos organismos están ligados a un medio más hostil, ya que el mar es un fluido con cambios bruscos en salinidad, pH y temperatura, en donde medran incontables depredadores, virus y bacterias^(12.3).

Las estructuras químicas de estos metabolitos no tienen precedente en el mundo terrestre y han demostrado poseer actividad biológica hasta diez veces mayor que aquellos, por lo que su estudio como potenciales fármacos ha crecido durante los últimos treinta años, reportándose alrededor de 5,000 moléculas nuevas, la mayoría con potente actividad biológica

Su actividad anti-inflamatoria, antibacteriana y citotóxica, son las que han sido extensamente estudiadas en los laboratorios de investigación.^(12.4,12.5)

El primer reporte sobre metabolitos secundarios aislados de invertebrados marinos aparece en el "Journal of Organic Chemistry" en 1942, en donde C. Kina y W. Bergman reportan

varios metabolitos de tipo terpénico aislados de un coral caribeño. En 1958 los esposos Burkholder reportan en la revista “Science” antibióticos aislados en gorgonios de Puerto Rico.

Sin embargo, es hasta 1969 en que se inicia la investigación exhaustiva de metabolitos de fuentes marinas, al reportarse en Tethraedron Letters por Wheineimer y Spraggins^(12.6) en cantidades mayores al 1% del peso seco, prostaglandinas del coral blando caribeño *Plexaura homomalla*, sustancias utilizadas en esa época como potentes anticonceptivos.^(12.7)

Briareum asbestinum.

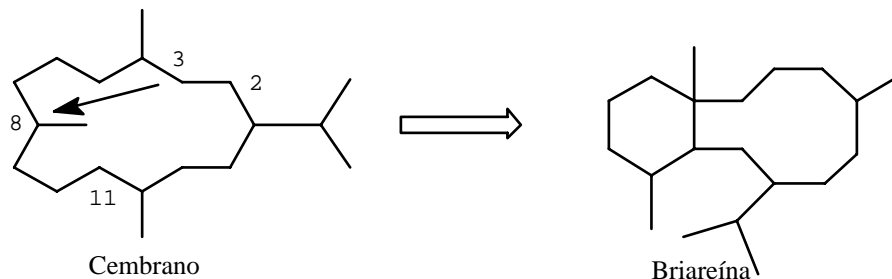
Gorgonios (orden Gorgonacea) son abundantes en aguas de la región Atlántica y corales blandos (orden Alcyonaceae) son típicos del Océano Pacífico. Son invertebrados marinos conocidos ampliamente por ser fuentes importantes de diterpenoides bioactivos. Dentro del orden Gorgonaceae, el género *Briareum* ha sido objeto de exhaustiva investigación química, que ha originado el aislamiento y la elucidación estructural de una variedad de metabolitos secundarios de características únicas dentro de los aislados de cualquier fuente natural y muestran variada e interesante actividad biológica.^(12.8,12.9, 12.10)

Briareum asbestinum (phylum Coelenterata, sub-phylum Cnidaria, clase Anthozoa, sub-clase Alcyonaria, orden Gorgonaceae, sub-orden Scleroxonia, familia Briareidae, género *Briareum*, especie *asbestinum*) es un habitante común en las aguas poco profundas de la región Atlántico-Caribeña, encontrándose en dos distintas variedades morfológicas; incrustada y erecta.^(12.3) Al igual que otros gorgonios, posee escleritas de carbonato de calcio (sus defensas físicas) y es rico en su contenido de terpenoides (defensas químicas).

La primera publicación describiendo metabolitos secundarios aislados del gorgonio aparece en 1966 en la Disertación Doctoral de R.W. Hyde en la Universidad de Oklahoma^(12.11), en la que reporta la presencia de varios diterpenos clorinados sin proponer estructuras, Cierezko en 1968 reporta varios esteroides (incluyendo gorgosterol) y en 1977 la primera estructura (Rayos-X de Briareina A).^(12.12) A partir de esa fecha, la cantidad de moléculas reportadas de *Briareum* ha sido inusualmente grande, alrededor de cien compuestos entre los que destacan diterpenos policíclicos oxigenados altamente funcionalizados como asbestininos, eunicelinas y briareinas.^(12.3)

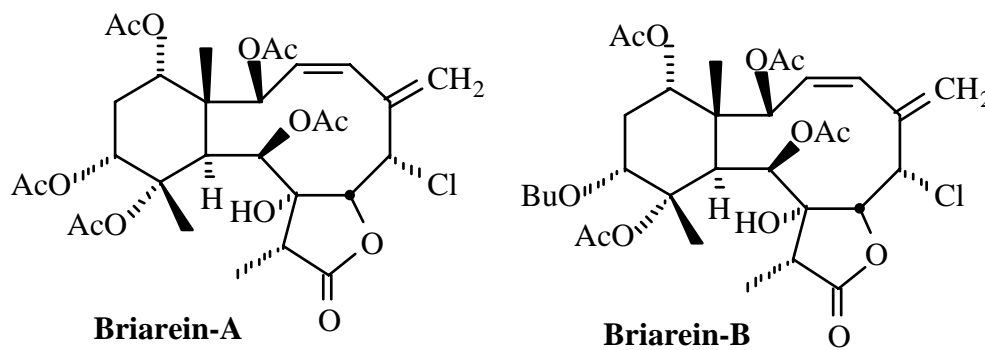
Briareinas

Las briareinas son compuestos orgánicos que se producen biogénicamente por la ciclación 3,8 del esqueleto del cembrano que genera un sistema biciclo[8.4.0].



A la fecha se han reportado alrededor de 350 briareinas, doce de las cuales se han aislado de *Briareum asbestinum*. Se ha encontrado que poseen variada actividad biológica, destacándose anti-inflamatoria, antibacteriana, citotóxica, antiviral e inmunomoduladora. (12.13)

Las briareinas A y B son los metabolitos secundarios más abundantes de *B. asbestinum*, con alrededor del 0.45% del peso seco del organismo. (12.14,12.15, 12.16)



4. JUSTIFICACIÓN

Briareum asbestinum es un coral blando el cual ha sido fuente de exhaustiva investigación química, se han reportado a la fecha 350 briareinas, 12 de las cuales han sido aisladas de *Briareum asbestinum*.

De las diversas clases de briareinas aisladas se ha reportado variada actividad biológica dentro de la cual destaca antiinflamatoria, antibacteriana, citotóxica, antiviral e inmunomoduladora.

Las briareinas A y B son los metabolitos secundarios más abundantes del *Briareum asbestinum*, con alrededor del 45% del peso seco del organismo, hasta el momento no se ha estudiado su actividad biológica, por lo que es importante establecer si poseen actividad antibacteriana, antimicótica y citotóxica *in-vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana, antimicótica y citotóxica de las briareinas A y B.

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1. Aislar e identificar las briareinas A y B de *Briareum asbestinum*.
- 5.2.2. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de las briareinas A y B.
- 5.2.3. Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* de las briareinas A y B.
- 5.2.4. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de las briareinas A y B.

6. HIPOTESIS

Debido a que el presente estudio es de tipo exploratorio, no requiere el planteamiento de una hipótesis.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

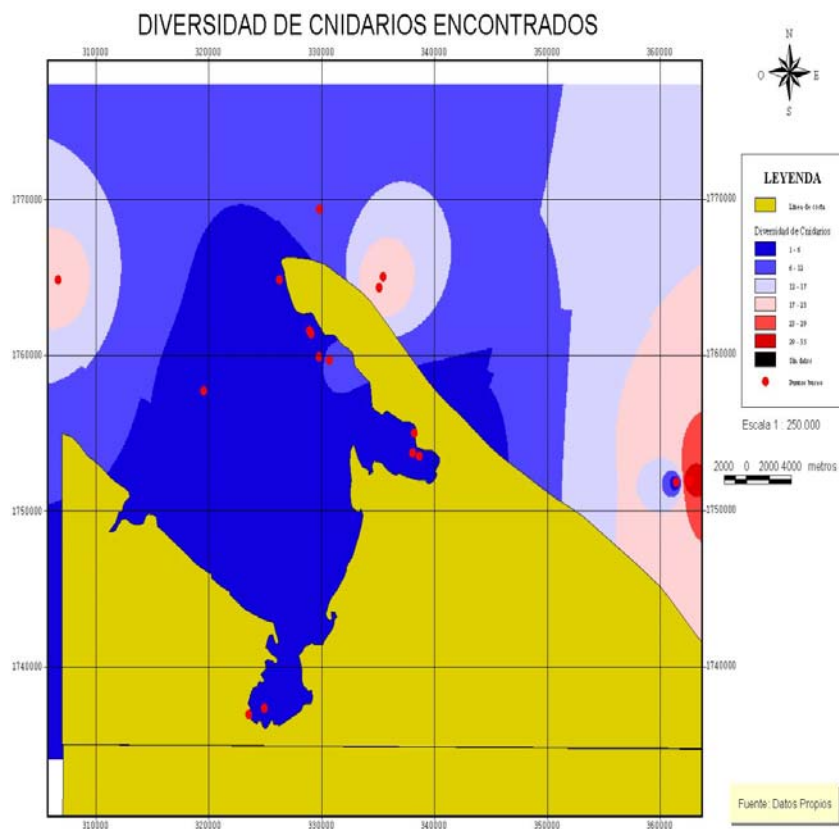
Los materiales y métodos utilizados en la presente investigación son los siguientes:

7.1 UNIVERSO DE LA POBLACIÓN

Organismo marino; gorgonio caribeño *Briareum asbestinum*.

Se cuenta con la colaboración de personeros del Centro de Estudio del Mar y Acuicultura (CEMA), quienes mediante técnicas de buceo y con conocimiento de la especie, identifican y recolectan el gorgonio caribeño *Briareum asbestinum*. El área de muestreo se encuentra ubicada en Punta de Manabique, en el Departamento de Izabal, en la zona señalada en el esquema y que expediciones previas reportan la presencia del gorgonio.^(12.17)

La colecta del coral se realiza a una profundidad aproximada de 5 metros.



7.1.1 POBLACIÓN

Se colecta el espécimen hasta obtener aproximadamente 400 gramos de peso húmedo de *Briareum asbestinum*.

7.1.2 MODELO DE MUESTREO

El modelo de muestreo que se plantea es por intención, de tipo no probabilístico en el cual se colecta la muestra de un arrecife específico de la zona seleccionada y que posea la presencia del coral.

7.1.3. COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA

Según la naturaleza del gorgonio se requiere poseer una muestra representativa de al menos 400 gramos de peso húmedo del gorgonio, que será sometida a los procedimientos descritos en la metodología correspondiente.

7.2 MATERIALES

7.2.1 RECURSOS HUMANOS

7.2.1.1. Autora

Nombre Completo: Stella María Cobar Coronado

Grado Académico: Bachiller en Ciencias y Letras, pensum cerrado de la carrera de Química Farmacéutica.

Atribución: Implementar, elaborar y realizar la parte escrita y práctica de la investigación.

7.2.1.2. Asesor de la Investigación

Nombre Completo: Oscar Manuel Cobar Pinto

Grado Académico: Químico Farmacéutico, Ph.D. en Química Orgánica con especialidad en Química de Productos Naturales Marinos.

Atribuciones: Asesoría, coordinación y supervisión de la investigación.

7.2.1.3 Revisor de la Investigación

Nombre Completo: Beatriz Eugenia Medinilla Aldana

Grado Académico: Química Farmacéutica

Atribuciones: Revisión de la investigación

7.2.2 RECURSOS INSTITUCIONALES

- LIPRONAT: Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Escuela de Química Farmacéutica, en donde se lleva a cabo la extracción, separación e identificación de las briareinas A y B
- Unidad de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, en el cual se lleva a cabo los ensayos de actividad antibacteriana, y antimicótica de la investigación.
- Laboratorios SEPRA (Servicios y Productos Ambientales), en donde se realizarán las pruebas de citotoxicidad de los metabolitos.

7.2.3 .MATERIALES, SUMINISTROS Y EQUIPO

7.2.3.1 MATERIALES

- n-hexano
- Metanol
- Acetona
- Sílica Gel
- Agar Muller Hinton
- Agua desmineralizada
- Etanol 50%
- Caldo tripticasa soya
- Agar Saboraud

- Agar–agar
- Dextrosa
- Fosfato Diácido de Potasio
- Peptona Sulfato de Sodio
- Solución Salina Isotónica

7.2.3.2 EQUIPO

- Evaporador rotatorio
- Balón para rotavapor
- Balanza analítica Digital
- Centrífuga
- Percolador
- Asa de nicromo en argolla
- Autoclave
- Cajas de petri
- Incubadora
- Pipetas automáticas
- Puntas amarillas de 200 μ L
- Puntas azules de 1000 μ L
- Refrigeradora
- Tubos con tapón de rosca
- Campana bacteriológica
- Campana bacteriológica con flujo laminar
- Mechero
- Plantilla para siembra
- Varillas de Agitación
- Cámara de Neubauer
- Campanillas de Durham
- Papel parafilm

7.2.3.3. SUMINISTROS

Útiles de oficina y computación para archivo, análisis y presentación de resultados.

7.3 MÉTODOS

7.3.1 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Las muestras se procesan conforme técnicas convencionales de trabajo con química de productos naturales marinos, que se describen a continuación.

7.3.1.1 IDENTIFICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Se identifica el área en donde se encuentra el arrecife que presenta *Briareum asbestinum*, se identifica y selecciona los organismos a coleccionar y se procede a su colección sin afectar la población del gorgonio donde se colecte, para proteger la ecología del arrecife.

Los individuos colectados se colocan en bolsa plástica bien cerrada (tipo zip lock) y almacenan inmediatamente en hielera a una temperatura mínima de 4°C.^(12.8)

7.3.1.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

Luego de transcurrir un máximo de 96 horas de su colecta, se procede a pesar el organismo (peso húmedo) y extraerlo exhaustivamente con metanol.

La extracción se realiza cortando en pedazos pequeños el organismo marino, colocándolos en un percolador adecuado y se procede a añadir el metanol en porciones de un litro. Se realizan al menos cinco extracciones metanólicas.^(12.18)

El extracto se rotaevapora en su totalidad, se seca y pesa para obtener el peso seco del extracto.

Se obtiene el extracto metanólico ya que es el que contiene las briareinas A y B.

7.3.2 AISLAMIENTO DE BRIAREINAS A Y B

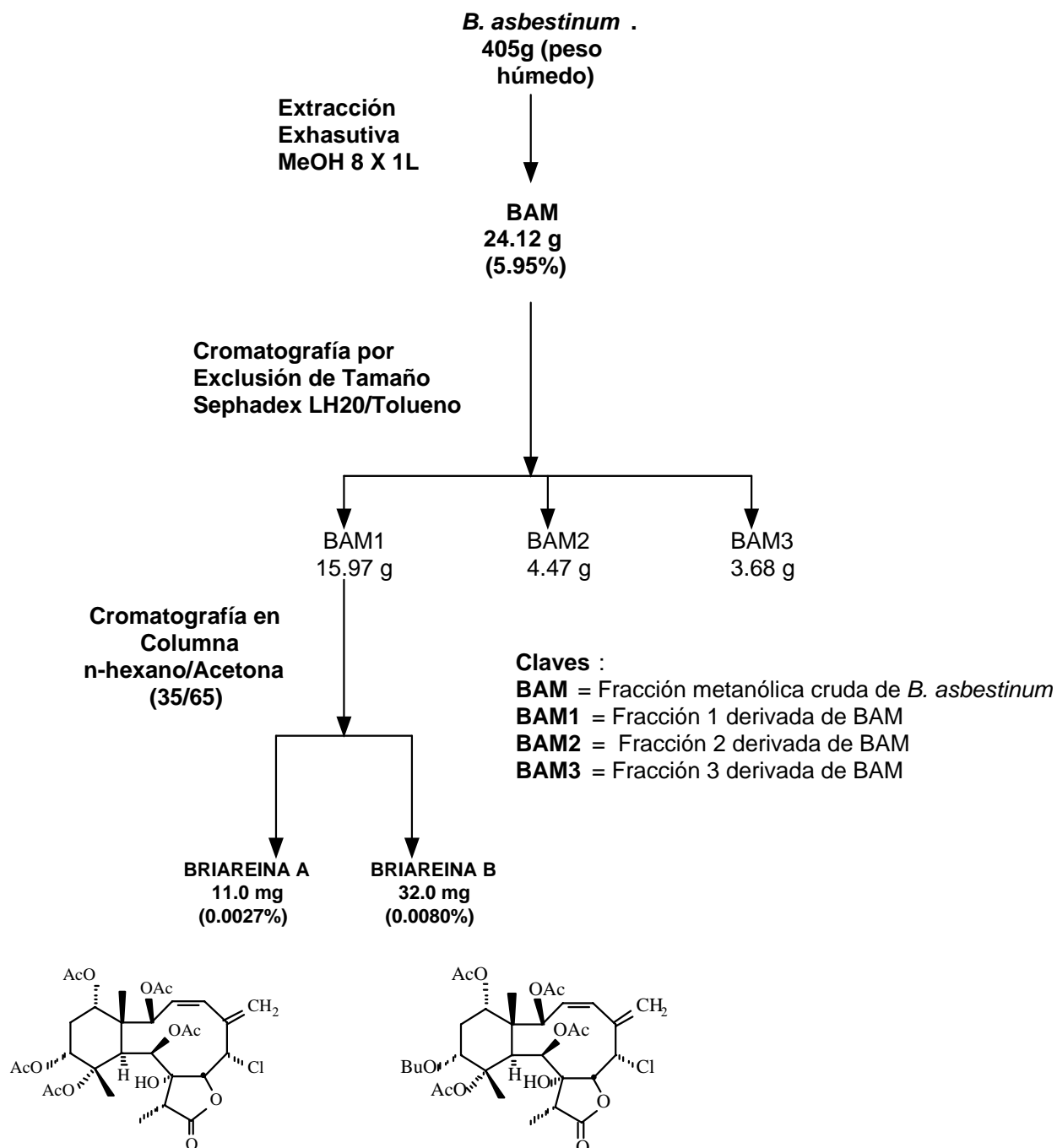
De acuerdo a la literatura, las briareinas A y B, cristalizan directamente del extracto metanólico^(12,13), sin embargo se realizará una cromatografía por exclusión de tamaño del extracto metanólico para asegurar su obtención en cantidades adecuadas.

Se procede a su purificación por recristalización utilizando metanol y agua como solventes, posterior a su separación por cromatografía en columna.

La separación cromatográfica se realiza utilizando como fase móvil (n-hexano/acetona 35:65) y sílica gel como fase estacionaria. La cantidad de fase estacionaria se calcula de acuerdo al peso seco de los cristales a separar en una relación de 30 a 1 (sílica gel /muestra).

La columna cromatográfica se monitorea por cromatografía en capa fina utilizando el mismo solvente y yodo/yoduro (I_2/I) como revelador

Las fracciones separadas se rotaevaporan nuevamente para obtener cristales puros de briareinas A y B, quienes se identifican por sus puntos de fusión; de 185.6 °C y 202.5 °C respectivamente y por su Espectro de Masas de Impacto Electrónico.^(12,19, 12.20)



ESQUEMA DE AISLAMIENTO

7.3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS BRIAREINAS A Y B

7.3.3.1 TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO*.

(12.21,12.22,12.23)

Preparación de Agar-Planta

- Preparar tubos con 9.0 ml de agar Mueller Hinton
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.0 mL de la solución del extracto disuelto. Este debe tener una concentración de 10 mg/mL. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/mL.
- Agitar y verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C por 24 horas, para comprobar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de utilización

Preparación del inóculo

- Purificar el microorganismo a ensayar inoculándolo en un tubo con 5 mL de agar Muller Hinton inclinado, incubar a 36°C durante 24 horas.
- Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 mL de caldo tripticasa soya, incubar a 36 °C durante 48h.
- Diluir 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de agua solución salina estéril (dilución 1:100).
- Sembrar en caja de petri según plantilla a utilizar.
- Demostración de la actividad antibacteriana.
- Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos, siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cuatro repeticiones por microorganismo.
- Dejar reposar durante 5-10 minutos e incubar a 36°C durante 24 horas.
- Utilizar como control negativo de 9 mL de agar Muller Hinton mezclándole 1 mL de etanol al 50%.

Interpretación de resultados

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

7.3.3.2. TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *IN VITRO* ^(12.24).

Preparación del medio de cultivo

- Preparar tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.
- Esterilizar durante 15 minutos a 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de las briareinas a probar (dilución 1:10). Agitar. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL.
- Verter en cajas de petri estériles, dejar solidificar e incubar a 36°C durante 24 horas para verificar esterilidad.
- Guardar en refrigeración hasta el momento de su uso.

Preparación del inóculo

- Preparar medio de Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

| | |
|---------------------------------|------------|
| Dextrosa | 0.6 gramos |
| Na ₂ SO ₄ | 0.3 gramos |
| KH ₂ PO ₄ | 0.3 gramos |
| Peptona | 0.3 gramos |
| Agar-agar | 6.0 gramos |

- Agregarlo a 300 ml de agua, disolver, verter 6 ml en tubos con tapón de rosca, esterilizar en autoclave y dejar solidificar con el mayor declive posible.
- Incubar 48 horas a 25°C para descartar contaminación.
- Sembrar en este medio los hongos a ensayar e incubar a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
- Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada estéril y desprender el hongo con ayuda de una varilla.

- Trasvasar el material obtenido a viales con tapa de rosca.
- Agitar 1 minuto en agitador y hacer un conteo de esporas en cámara Neubauer.
- Llevar la suspensión a 100 esporas / μl = 1×10^5 esporas /ml (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y almacenar en viales estériles en refrigeración.

Inoculación de hongos filamentosos en placa

- Abrir cuatro agujeros en las cajas con agar-planta, con campanillas de Durham de 5 mm. de diámetro en forma equidistante.
- Tomar 30 μl de la suspensión de esporas y depositar en los agujeros.
- Incubar a 27°C por 14 días.
- Hacer un total de 4 repeticiones en la misma forma, usar una caja con agar Sabouraud como control negativo.

Lectura e interpretación de resultados

- Medir el diámetro de la colonia del hongo en mm.
- Calcular el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas de control.
- Tomar como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

7.3.3.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA ^(12.25).

DIA 0

PREPARACIÓN DEL AGUA DULCE ESTANDAR:

- Los viales con sal y soluciones concentradas de sal provistos en el kit, permiten la preparación de 1 litro de agua dulce estándar (artificial).
- La solución estándar de agua es utilizada para preparar el medio de eclosión de los quistes y como medio de dilución para la serie de dilución del tóxico.

Procedimiento:

- Llenar un balón volumétrico de 1 litro con aproximadamente 800ml de agua desionizada.
- Tomar el vial No. 1 (NaHCO_3) y añadir el contenido en el balón.
- Agitar hasta que toda la sal se disuelva.
- Destapar el vial con solución concentrada de sal No.2 (CaSO_4) verter en el balón.
- Repetir el paso 3 para los otros viales con soluciones concentradas de sal vial No.3 (MgSO_4), vial No.4 (KCl).
- Añadir agua desionizada hasta la marca de 1000 ml. y agitar para homogeneizar el medio.

ALMACENAJE DEL MEDIO:

La solución de un litro del agua dulce estándar es suficiente para los seis bioensayos de cada Toxkit. Si las 6 pruebas no se realizaran en los próximos días luego de la preparación del medio, almacenar el agua dulce estándar en la refrigeradora (sin luz). El contenido debe ser distribuido preferentemente en varios balones para su uso por separado.

Se debe tener el cuidado de traer el medio refrigerado de regreso a temperatura ambiente antes de utilizarla.

A. ECLOSION DE LOS QUISTES:

La eclosión de los quistes debe de ser iniciado en 24 horas antes del inicio de las pruebas de toxicidad.

Procedimiento:

- La eclosión se realiza en agua dulce estándar (dilución 1:8 con agua desionizada).
- La dilución de agua dulce estándar disminuye la presión osmótica, que resulta en mayor éxito en la eclosión de los quistes de *Thamnocephalus platyurus*.

Prehidratación de los Quistes:

- Preparar 20ml de Agua Dulce Estándar diluida por medio de la adición de 17.5ml de agua desionizada a 2.5ml de Agua Dulce Estándar.
- Abrir un tubo con quistes y llenarlo con medio de eclosión diluido (aproximadamente 1ml).
- Cerrar el tubo con su tapón y agitar a intervalos regulares por un periodo de 30 minutos.

Transferencia de los Quistes Prehidratados a la Caja de Petri

- Vaciar el contenido del vial con quistes en uno de las dos cajas de petri pequeñas; asegurarse que la mayoría de quistes sean transferidos, por medio del enjuague del tubo con Agua Dulce Estándar diluida.
- Añadir 12ml de agua dulce estándar en la caja de petri, agitar suavemente con movimiento circular para distribuir homogéneamente los quistes.
- Cubrir las cajas petri, incubar a 25°C bajo continua iluminación por 20-22 horas (fuente de luz de 3000-4000 lux).

DIA 1

B. TRANSFERENCIA DE LARVAS:

20-22 horas después del inicio de la incubación, las larvas eclosionadas deben de ser transferidas a un medio fresco. Antes de esta transferencia, verificar la condición de las larvas en un microscopio (magnificación 10-12x). Las pruebas de toxicidad deben de ser llevadas a cabo únicamente con organismos vivos. Si las condiciones anteriormente descritas se siguen correctamente no debe de existir ningún problema. En 24 horas de la transferencia, todas las larvas deben mudar a la etapa instar II y III.

Procedimiento:

- Añadir 12ml de agua dulce estándar en la segunda caja de petri
- Transferir las larvas con la micropipeta de la primera caja de petri a la segunda. Para facilitar este paso, se puede dirigir una lámpara a un lado de la caja de petri. Debido

a que las larvas son fototácticas, los organismos se aglomeran en la región iluminada y puede ser más fácilmente succionado con la micropipeta.

- Cubrir la caja de petri e incubar en la oscuridad a 25°C, por 4 horas para permitir que las larvas pasen a la fase instar II o III.

PREPARACIÓN DE LA SERIE DE DILUCIÓN DEL TÓXICO:

Los bioensayos TOXKIT han sido diseñados principalmente por su agudo tamizaje de toxicidad rentable; por consiguiente esta sección de los Procedimientos Estándar de Operación propone una forma simple y rápida de hacer la serie de dilución del tóxico con la ayuda de tubos plásticos descartables de 10ml y pipetas plásticas graduadas de 1ml y 10ml.

Recomendaciones Generales

- Nunca pipetear muestras de soluciones químicas o efluentes con la boca. Siempre utilice un bulbo.
- Mantenga las pipetas para la transferencia del tóxico y del agua de dilución separadas; se recomienda rotularlos. Por ejemplo con marca roja para el tóxico y con marca verde para el agua.
- Las pipetas graduadas de 1ml se utilizan para transferir volúmenes de 1ml y menores, las pipetas de 10ml se utilizan para transferir volúmenes mayores de 1ml.
- Lavar las pipetas utilizadas para los tóxicos con agua destilada o agua desionizada después de cada transferencia.
- Durante la preparación de la serie de dilución del tóxico los tubos de ensayo deben ser tapados y agitados antes de proceder a la siguiente dilución.

A. Efluentes:

Una serie de diluciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25 de la muestra del efluente se prepara por un procedimiento de dilución en serie; cada dilución se realiza por medio de la dilución de la concentración previa a la mitad (cf.US-EPA/600/4-85/013,1985).

Procedimiento:

- Añadir 5ml del agua de dilución a los tubos de ensayo 2, 3, 4 y 5.
- Transferir 10ml de la muestra de efluente al tubo de ensayo 1 y lavar la pipeta.
- Utilizando la misma pipeta, transferir 5ml del tubo de ensayo 1 al tubo de ensayo 2 y lavar la pipeta; tapar y agitar el tubo No. 2.
- Repetir este procedimiento (paso 3) para las diluciones siguientes:
 5ml del tubo de ensayo 2 al tubo de ensayo 3
 5ml del tubo de ensayo 3 al tubo de ensayo 4
 5ml del tubo de ensayo 4 al tubo de ensayo 5
- Proceder a la sección: **Llenado de las Placas de Ensayo**

Cuadro No.1
Serie de Dilución del Efluente

| Tubo de Ensayo | Concentración del Efluente % |
|----------------|------------------------------|
| 1 | 100 |
| 2 | 50 |
| 3 | 25 |
| 4 | 12.5 |
| 5 | 6.25 |

B. Compuestos Químicos :

Si la toxicidad aproximada del compuesto químico es conocida, se puede proceder directamente a la Prueba Definitiva.

Si la toxicidad aproximada del compuesto químico no es conocida, se debe llevar a cabo la Prueba para Determinación de Rango.

Prueba para Determinación de Rango:

La serie de dilución: 100mg/l, 10mg/l, 1mg/l, 0.1mg/l y 0.01mg/l se debe de preparar para las pruebas

Procedimiento:

Solución Stock

- Pesar 100mg del químico en una balanza analítica y transferirlo a tubo de ensayo A.
- Añadir 10ml del agua de dilución; tapar y agitar vigorosamente.
- Transferir 1ml del tubo de ensayo A al tubo de ensayo B y lavar la pipeta.
- Añadir 9ml del agua de dilución, tapar y agitar el tubo de ensayo.

Concentraciones de Ensayo (Cuadro No. 2)

- Transferir 9ml de agua de dilución a los tubos 1, 2, 3, 4 y 5.
- Añadir 1ml del tubo B al tubo 1 y lavar la pipeta; tapar y agitar el tubo 1.
- Añadir 1ml del tubo 1 al tubo 2 y lavar la pipeta; tapar y agitar el tubo 2.
- Repetir este procedimiento (Paso 3) para las siguientes diluciones:
 1ml del tubo 2 al tubo 3
 1ml del tubo 3 al tubo 4
 1ml del tubo 4 al tubo 5

Llenado de la Placa de Ensayo.

Cuadro No. 2
Serie de Dilución del Compuesto Químico

| Tubo de Ensayo | Concentración del Químico (mg/l) |
|----------------|----------------------------------|
| 1 | 100 |
| 2 | 10 |
| 3 | 1 |
| 4 | 0.1 |
| 5 | 0.01 |

Prueba Definitiva

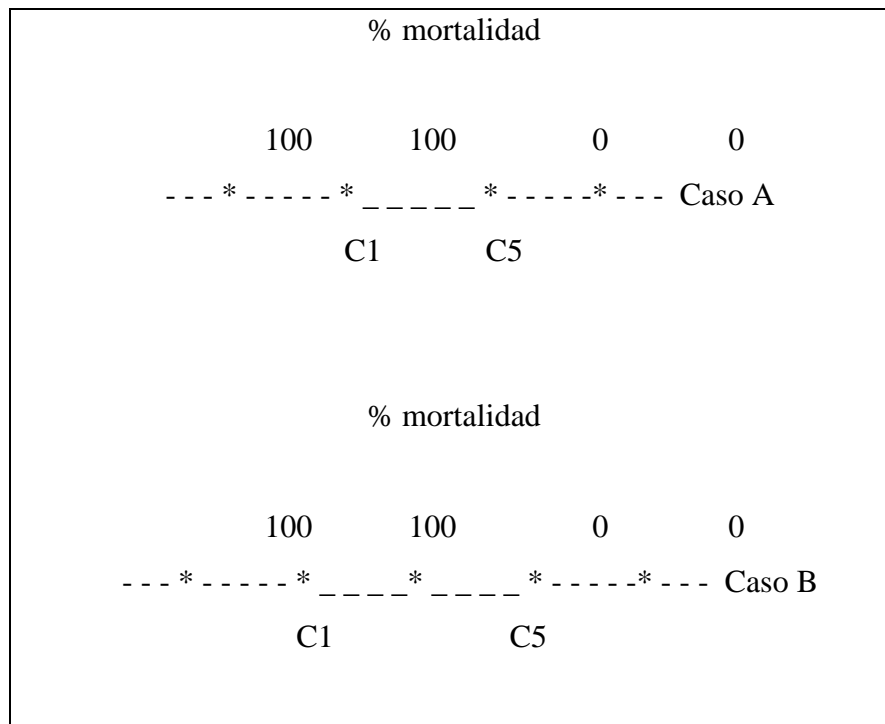
La serie de dilución a ser ensayada en la Prueba Definitiva abarca el rango de la concentración más baja produciendo 100% de mortalidad y la concentración más alta

produciendo 0% de mortalidad en la Prueba de Determinación de Rango. Este rango puede abarcar un orden de magnitud (caso A) o dos ordenes de magnitud (caso B) como se indica en el Cuadro No. 3. Este rango de concentración será llamado C1-C5.

Procedimiento:

- Una serie de dilución con rango desde C1 (100% mortalidad) hasta C5 (0% mortalidad) se prepara.
- C1 se prepara de acuerdo a las instrucciones de dilución dadas en la Tabla No. 2.

Cuadro No. 3
Representación Diagramática del 100% y el 0% del rango de concentración de mortalidad, como se ha determinado en la Prueba de Determinación de Rango



C1-C5 abarca un orden de magnitud

Dato importante: En este caso la concentración C1 debe de prepararse en duplicado (2 tubos de ensayo).

- Añadir los volúmenes de agua de dilución como lo indica el Cuadro No. 4 a los tubos de ensayo respectivos.
- Añadir los volúmenes del tóxico de concentración C1 como lo indica el Cuadro No. 4.
- Tapar y agitar los tubos de ensayo.

Cuadro No. 4
Serie de dilución C1-C5

| Tubo de Ensayo | Agua de Dilución (ml) | C1 (ml) |
|----------------|-----------------------|---------|
| C1 | 0 | 10 |
| C2 | 4.4 | 5.6 |
| C3 | 6.8 | 3.2 |
| C4 | 8.2 | 1.8 |
| C5 | 9.0 | 1.0 |

Calcular la concentración actual de C1, C2, C3, C4 y C5 (estas figuras se necesitan para el calculo de la Dosis Letal Media (DL₅₀)

$$C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C2 = 0.56 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C3 = 0.32 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C4 = 0.18 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C5 = 0.10 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

Proceder a la sección “Llenado de la Placa de Ensayo”

C1-C5 abarca dos ordenes de magnitud

Dato importante: En este caso la concentración C1 debe de prepararse una vez.

- Añadir los volúmenes de agua de dilución como lo indica el Cuadro No. 5 a los tubos de ensayo respectivos.
- Añadir los volúmenes del tóxico a concentración C1 como lo indica el Cuadro No. 5.
- Tapar y agitar los tubos de ensayo.

Cuadro No. 5
Serie de dilución C1-C5

| Tubo de Ensayo | Agua de Dilución (ml) | C1 (ml) |
|----------------|-----------------------|---------|
| C1 | 0 | 10 |
| C2 | 6.8 | 3.2 |
| C3 | 9.0 | 1.0 |
| C4 | 9.7 | 0.3 |

Calcular la concentración actual de C1, C2, C3, C4 y C5 (estas figuras se necesitan para el cálculo de DL₅₀)

$$C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C2 = 0.32 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C3 = 0.10 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C4 = 0.03 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

$$C5 = 0.01 \times C1 = \dots\dots\dots \text{ mg/l}$$

Proceder a la sección “Llenado de la Placa de Ensayo”

LLENADO DE LA PLACA DE ENSAYO

- Cada dilución del compuesto tóxico debe de ser transferido a todos los pozos de una columna en la placa multipozos.
- Los pozos son numerados de 1 a 6 horizontalmente y de A a D verticalmente.

- La distribución de las soluciones test siempre se llevaran a cabo empezando del control (izquierda, columna1) hacia la concentración más elevada (derecha, columna 6)

Procedimiento

Controles:

Añadir 1 ml de agua de dilución a cada pozo de la columna 1 (pozos A1, B1, C1, D1)

Diluciones del Tóxico

- Agitar cada tubo de ensayo
- Transferir 1 ml del tubo de ensayo 5 a cada pozo de la columna 2 (pozos A2, B2, C2, D2)
- Repetir este procedimiento (pasos 2 y 3) con los tubos de ensayo 4, 3, 2 y 1 para llenar los pozos de las columnas 3, 4, 5 y 6 , respectivamente:

TRANSFERENCIA DE LAS LARVAS A LOS POZOS DE ENSAYO

- La micropipeta debe de ser sostenida como un lápiz con el dedo índice y el pulgar ejerciendo presión al bulbo. Esta posición usualmente provee el mejor control y produce la menor fatiga, pero cualquier posición puede ser utilizada sí se siente más comfortable.
- El bulbo debe de ser presionado suavemente para proveer la succión apropiada. Tomara un poco de práctica para ejercer la presión adecuada.
- Micropipetear las larvas es una destreza fácil de adquirir. Luego de 15 minutos de práctica, la mayoría de personas se vuelven diestras el coleccionar, contar y transferir las larvas rápidamente para completar exitosamente el bioensayo.
- Una vez acostumbrado a ello, micropipetear se vuelve comfortable para la mayoría de personas.
- La transferencia de *Thamnocephalus* a placa multipozos se logra por medio de dos pasos:

- a. Transferencia de las larvas de la caja de petri a los pozos de enjuague de la placa multipozos (D1 a D6)
- b. Transferencia de las larvas de los pozos de enjuague a los pozos de ensayo (filas A,B,C).

Nota: La transferencia intermediada de las larvas por pozos de enjuague (fila D) minimiza la dilución de las soluciones de tóxico en los pozos de ensayo (filas A,B,C)

Procedimiento

Sacar la caja petri de la incubadora y esperar aproximadamente 5 minutos para permitir que los nauplios se congreguen.

Los siguientes pasos son ejecutados bajo un microscopio de disección con una magnificación 10-12x.

- Colocar la caja petri debajo del microscopio y utilizando una micropipeta, transferir aproximadamente 50 larvas de la caja petri a caja pozo de enjuague (cada pozo de la fila D), en la siguiente secuencia: D1 control, D2, D3, D4, D5 y D6 (incrementando la concentración del tóxico). Tratar de cargar el menor líquido posible de la caja petri a los pozos durante esta transferencia.
- Colocar la placa multipozos bajo el microscopio de disección y transferir 10 nauplios por pozo.
- Repetir esta transferencia para las columnas 2, 3, 4, 5 y 6 (en esta secuencia).

INCUBACION DE LA PLACA DE ENSAYO

Procedimiento:

- Colocar una tira de parafilm sobre la placa y poner la cubierta sobre ella.
- Colocar la placa multipozos en la incubadora a 25 °C en la oscuridad, por 24 horas.

DIA 2

EVALUACION DE LOS RESULTADOS

Procedimiento:

- Sacar la placa de la incubadora y colocarla debajo del microscopio de disección.
- Chequear todos los pozos de las filas A, B y C , registrar el numero de larvas muertas* y de vivas
- Las larvas son consideradas muertas si no muestran ningún movimiento después de 10 segundos de observación.
- Marcar los resultados en la hoja de resultados.
- Totalizar el numero de larvas muertas para cada concentración y calcular el % de mortalidad *.

* Si la mortalidad de los controles excede el 10%, el bioensayo es considerado inválido y el ensayo debe de repetirse de nuevo.

ESTIMACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀)

Existen muchos procedimientos para el cálculo de DL₅₀. Un procedimiento muy simple que es descrito a continuación, se registran los resultados del número de *thamnocephalus* utilizados, número de *thamnocephalus* vivos y número de *thamnocephalus* muertos en el ensayo con sus respectivas concentraciones. Con el programa informático de DL₅₀ se calculan los resultados de DL₅₀ y los límites de confianza del ensayo.

ENSAYO DE REFERENCIA

Con el fin de verificar la ejecución correcta del procedimiento del ensayo y la adecuada condición fisiológica de los organismos de ensayo, se recomienda realizar un ensayo de referencia de tiempo en tiempo.

Cada THAMNOTOXKIT contiene un vial con 1 g de un tóxico de referencia (Dicromato de Potasio) para realizar un ensayo de control de calidad.

Procedimiento

- Verter el contenido del vial del químico de referencia en un balón volumétrico de 1 litro.

- Añadir agua desionizada hasta la marca, tapar el balón y agitar para disolver y homogeneizar la solución stock de 1g/l de Dicromato de Potasio.
- Realizar una serie de dilución del tóxico de referencia, de acuerdo a el procedimiento indicado en la sección 4: Compuestos Químicos- Ensayo Definitivo

La serie de dilución que debe de realizarse y utilizada para este ensayo es la siguiente:

C1 (dos tubos de ensayo): 100mg/l

C2 (un tubo de ensayo): 56mg/l

C3 (un tubo de ensayo): 32mg/l

C4 (un tubo de ensayo): 18mg/l

C5 (un tubo de ensayo): 10mg/l

Proceder a la Sección "Llenado de la Placa de Ensayo"

Con los datos proporcionados en el ensayo de control de calidad, un DL_{50} de 24h debe de ser calculado, el valor del cual debe de encontrarse dentro de los límites (rango) estipulados en la hoja de especificaciones.

7.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

7.4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de tesis es una investigación explorativa, en la cual se lleva a cabo la manipulación de varias variables.

Variable Independiente:

- Gorgonio Caribeño *Briareum asbestinum*.

Variable Dependiente:

- Presencia o Ausencia de briareinas A y B
- Presencia de Actividad Antimicótica
- Presencia de Actividad Antimicrobiana
- Presencia de Actividad Citotóxica

7.5. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

7.5.1 Actividad Antimicrobiana^(12.22,12.23)

Se mide de acuerdo a los siguientes parámetros:

Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación.

7.5.2 Actividad Antimicótica^(12.24)

Se analiza de acuerdo a los siguientes parámetros:

Se mide el diámetro de la colonia del hongo en milímetros.

Se calcula el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas de control.

Se toma como positivos los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

7.5.3 Actividad Citotóxica^(12.25)

Se registran los resultados del número de *thamnocephalus platyurus* utilizados, número de *thamnocephalus platyurus* vivos y número de *thamnocephalus platyurus* muertos en el ensayo con sus respectivas concentraciones. Con el programa informático de DL₅₀ se calculan los resultados de DL₅₀ y los límites de confianza del ensayo.

8. RESULTADOS

8.1 TAMIZAJE DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO*.

El tamizaje antibacteriano se realizó por medio del método de “difusión de disco”, en el cual se impregnó 40µL de briareinas A y B.

Se realizaron 4 repeticiones por cada microorganismo dando los siguientes resultados.

Tabla No.1
Actividad Antibacteriana de Briareina A y Briareina B

| METABOLITO SECUNDARIO | A | B | C | D | E | F | G | H |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Briareina A | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Briareina B | - | - | - | - | - | - | - | - |

Microorganismos ensayados: A: *S. aureus*, B: *S. tiphyi*, C: *M. smegmatis*, D: *B. subtilis*, E: *P. aeruginosa*, F: *C. albicans*, G *C. neoformans*; H *E. coli*,. **Referencias:** (+) no hay crecimiento de cepa, actividad positiva, (-) Si hay crecimiento, actividad negativa.

8.2 TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA *IN VITRO*

Tabla No.2
Actividad Antimicótica de Briareina A y Briareina B

| COMPUESTO | DIÁMETRO DE LA COLONIA (mm.) | % DE INHIBICIÓN | RESULTADO |
|-------------|------------------------------|-----------------|-----------|
| Control | 36.37 mm. | | |
| Briareina A | 32 mm. | 12.01% | Negativo |
| Briareina B | 19.3 mm. | 47% | Negativo |

Organismo investigado: *Asperigillus flavus*

Fuente: Datos Experimentales

Se observó una inhibición en la pigmentación del hongo a los 7 días de inoculación con briareina B (ver anexo 3 y 4), sin embargo no presenta inhibición completa a los 14 días(ver anexo 5).

8.3 TAMIZAJE DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO*

Se realizaron las pruebas para encontrar rangos de toxicidad contra *Thamnocephalus platyurus*, dando los siguientes resultados:

BRIAREINA A

Búsqueda de Rango de Concentración:

Serie de Diluciones Probadas:

- Concentración 1 = 110 ppm
- Concentración 2 = 11.0 ppm
- Concentración 3 = 1.1 ppm
- Concentración 4 = 0.11 ppm
- Concentración 5 = 0.011 ppm

Tabla No.3
Rango de Concentración Inhibitoria Máxima y Mínima de Briareina A

| | CONTROL | CONC. 5 | CONC. 4 | CONC. 3 | CONC. 2 | CONC. 1 |
|------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| TOTAL | 0/30 | 0/30 | 0/30 | 0/30 | 0/30 | 30/30 |
| % DE MORTALIDAD | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 100% |

Fuente: Datos Experimentales

El ensayo definitivo se realizó con briareina A: a una concentración de 110 ppm.

Ensayo Definitivo de Briareina A

Serie de Diluciones Probadas: Concentración 1 = 110 ppm
 Concentración 2 = 61.6 ppm
 Concentración 3 = 35.2 ppm
 Concentración 4 = 19.8 ppm
 Concentración 5 = 11.0 ppm

Tabla No.4
Prueba de Actividad Citotóxica Definitiva de Briareina A

| | CONTROL | CONC. 5 | CONC. 4 | CONC. 3 | CONC. 2 | CONC. 1 |
|------------------------|-----------|------------|--------------|------------|------------|-------------|
| A | 1 | 0 | 3 | 7 | 10 | 10 |
| B | 0 | 0 | 0 | 9 | 10 | 10 |
| C | 1 | 0 | 5 | 8 | 10 | 10 |
| TOTAL | 2/30 | 0/30 | 8/30 | 24/30 | 30/30 | 30/30 |
| % DE MORTALIDAD | 0% | 0% | 26.6% | 80% | 0% | 100% |

Fuente: Datos Experimentales

Tabla No.5
Tamizaje Citotóxico de Briareina A

| CONCENTRACIÓN (partes por millón) | NÚMERO EXPUESTOS | NÚMERO MUERTOS | PORCENTAJE MUERTOS | PROBABILIDAD BINOMIAL % |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------|
| 110 | 30 | 30 | 100 | $9.31 e^{-8}$ |
| 61.6 | 30 | 30 | 100 | $9.31 e^{-8}$ |
| 35.2 | 30 | 24 | 80 | $7.15e^{-2}$ |
| 19.8 | 30 | 8 | 26.67 | 0.81 |
| 11 | 30 | 0 | 0 | $9.31e^{-8}$ |

Fuente: Datos Experimentales

BRIAREINA B:

Búsqueda de Rango de Concentración:

Serie de Diluciones Probadas: Concentración 1 = 120 ppm
 Concentración 2 = 12.0 ppm
 Concentración 3 = 1.2 ppm
 Concentración 4 = 0.12 ppm
 Concentración 5 = 0.012 ppm

Tabla No.6
Rango de Concentración Inhibitoria Máxima y Mínima de Briareina B

| | CONTROL | CONC. 5 | CONC. 4 | CONC. 3 | CONC. 2 | CONC. 1 |
|------------------------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 10 |
| B | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 10 |
| C | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| TOTAL | 0/30 | 0/30 | 0/30 | 0/30 | 7/30 | 30/30 |
| % DE MORTALIDAD | 0% | 0% | 0% | 0% | 22% | 100% |

Fuente: Datos Experimentales

El ensayo definitivo se realizará con briareina B: 120 ppm

Ensayo Definitivo de briareina B:

Serie de Diluciones Probadas: Concentración 1 = 120 ppm
 Concentración 2 = 46.08 ppm
 Concentración 3 = 14.4 ppm
 Concentración 4 = 4.32 ppm
 Concentración 5 = 1.44 ppm

Tabla No.7
Rango de Concentración Inhibitoria Máxima y Mínima de Briareina B

| | CONTROL | CONC. 5 | CONC. 4 | CONC. 3 | CONC. 2 | CONC. 1 |
|------------------------|--------------|------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| A | 1 | 6 | 5 | 10 | 10 | 10 |
| B | 0 | 0 | 2 | 10 | 10 | 10 |
| C | 0 | 0 | 3 | 10 | 10 | 10 |
| TOTAL | 1/30 | 6/30 | 10/30 | 30/30 | 30/30 | 30/30 |
| % DE MORTALIDAD | 3.33% | 20% | 33.33% | 100% | 100% | 100% |

Fuente: Datos Experimentales

Tabla No.8
Tamizaje Citotóxico de briareina B

| CONCENTRACIÓN (partes por millón) | NÚMERO EXPUESTOS | NÚMERO MUERTOS | PORCENTAJE MUERTOS | PROBABILIDAD BINOMIAL % |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------|
| 120 | 30 | 30 | 100 | $9.31 e^{-8}$ |
| 46.8 | 30 | 30 | 100 | $9.31 E^{-8}$ |
| 14.4 | 30 | 30 | 100 | $9.31 e^{-8}$ |
| 4.32 | 30 | 10 | 33.33 | 4.94 |
| 1.44 | 30 | 6 | 20 | $7.15e^{-2}$ |

Fuente: Datos Experimentales

Tabla No.9
Dosis Letal Media (DL₅₀) de Briareina A y Briareina B

| METABOLITO SECUNDARIO | DL ₅₀ (MOVING AVERAGE) | LÍMITE DE CONFIANZA |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Briareina A | 25.46 µg/mL (39.5 µM) | 95% (22.60096 – 28.61878) |
| Briareina B | 4.29 µg/mL (6.3 µM) | 95% (3.313231 – 5.541996) |

En briareina A se observó un efecto “subagudo” en *Thamnocephalus platyurus* al ponerse en contacto con el compuesto etanólico.

En briareina B se observó un efecto “agudo” con una mortalidad del 100%.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Revisión de literatura^{12,15,12,16} muestra que de las aproximadamente 300 briareinas aisladas a la fecha (todas de invertebrados marinos), 103 (33%), han sido sometidas a alguna prueba de actividad biológica, destacándose la actividad citotóxica de 185, actividad antiinflamatoria 13, antiviral 7, inmunomoduladora 4 y antibacteriana 1.

Briareinas A y B no han sido sometidas a ningún tipo de ensayo para determinar su actividad biológica.

Cabe mencionar que no se reporta ningún estudio de determinación de actividad antimicótica para briareinas.

9.1 Actividad Citotóxica.

Realizando un breve análisis de la relación de las briareinas que muestran actividad citotóxica importante con la presencia de funcionalidades acetato o butirato en la posición 12 de la molécula, se observa que no existe una correlación que muestre la influencia de alguno de estos grupos para potenciar su citotoxicidad (Tabla No. 10).

En el caso de la actividad mostrada por las briareinas A (acetato en C12) y B (butirato en C12) se observa que la presencia del grupo butirato potencializa su actividad citotóxica (4.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs. 25.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), congruente con lo observado en los Excavatolidos F y G.

Briareina A presenta una DL_{50} de 25.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, alrededor de 39.5 μM , observándose un efecto “subagudo” en *Thamnocephalus platyurus*, los cuales no mueren completamente, sin embargo presentan una disminución muy evidente en su cuanto a su motilidad en un tiempo específico, lo cual puede indicar que posee propiedades neurotóxicas.

Briareina B presenta mayor actividad citotóxica que briareina A, establecida en una DL_{50} 4.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$, alrededor de 6.3 μM , observándose un efecto “agudo” en *Thamnocephalus*

platyurus ya que al momento de entrar en contacto con el compuesto se observa mortalidad del 100% en el transcurso de los primeros 2 minutos.

Tabla No. 10
Relación de la Estructura de Briareinas con Actividad Citotóxica

| Briareina | Funcionalidad/ Posición | Citotoxicidad/Cepa de Célula Cancerosa |
|------------------|------------------------------------|--|
| Excavatulido F | butirato sobre C12 | ED ₅₀ 6.2 µg/mL (P-388), ED ₅₀ 5.5 µg/mL (A-549) |
| Excavatulido G | Acetato sobre C12 | ED ₅₀ 15.7 µg/mL (P-388), ED ₅₀ 22.8 µg/mL (A-549) |
| Brianteina V | butirato sobre C12 | ED ₅₀ 13 µg/mL (P-388) |
| Brianteina Z | Acetato sobre C12 | ED ₅₀ 10 µg/mL (P-388) |
| Excavatulido H | butirato sobre C12 | ED ₅₀ >50 µg/mL (P-388, A-549) |
| Excavatulido I | acetato sobre C12 | ED ₅₀ >50 µg/mL (P-388, A-549) |
| Excavatulido J | butirato sobre C12 | ED ₅₀ 3.8 µg/mL (P-388), ED ₅₀ 5.2 µg/mL (A-549) |
| Excavatulido K | acetato sobre C12 | ED ₅₀ 0.9 µg/mL (P-388), ED ₅₀ 3.0 µg/mL (A-549) |

Este es el primer reporte de actividad citotóxica de briareinas contra *Thamnocephalus platyurus*. Se reportan valores de DL₅₀ entre 20 y 500 µg/mL de briareinas contra nauplios de *Artemia salina*, destacándose únicamente malayenólido B^{12,15}, aislado de *V. malayense* en 1999 con una DL₅₀ de 2 µg/mL.

Lo anterior conduce a pensar que, principalmente briareina B, tiene un alto potencial como sustancia citotóxica, por lo que debe reaislarse y probar su actividad contra líneas celulares cancerosas.

9.2 Actividad Antibacteriana

La única briareina a la que se reporta alguna actividad antibacteriana^{12,16} es umbraculolido A, aislado del coral blando *Gorgonella umbraculum* en 1998 con actividad inhibitoria a 500 µg/mL contra *Bacillus pumilus*.

A las concentraciones utilizadas de briareina A (1,100 µg/mL) y briareina b (1,200 µg/mL) no se mostró inhibición del crecimiento de las cepas de bacterias utilizadas (Tabla No. 1), por lo que puede indicarse que no poseen actividad antibacteriana. No obstante las briareinas no parecen mostrar en general este tipo de actividad.

9.3 Actividad Antimicótica

En cuanto a la actividad antimicótica, las briareinas A y B no mostraron actividad notable, sin embargo se observa claramente la inhibición del pigmento de *Aspergillus flavus* durante los primeros 7 días del crecimiento por parte de briareina B (Tabla No. 2 ; Anexo 3 y 4), que inhibe un 47% del crecimiento del hongo. Sin embargo, no puede tomarse como positivo el ensayo debido a que a los 21 días hay crecimiento de hongo.

Es de enfatizar que este estudio es el primero en que se reporta alguna actividad antimicótica de un compuesto con el esqueleto de Briarano.

Se considera importante realizar estudios sobre la actividad antimicótica de briareina B, tomando en consideración la inhibición de la pigmentación que produjo sobre *Aspergillus flavus*.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Las briareinas A y B no presentan actividad antibacteriana *in vitro*.
- 10.2 La briareina B presenta inhibición de la pigmentación *Aspergillus flavus*, sin embargo pueden considerarse ambas inactivas *in vitro* contra este hongo.
- 10.3 La briareina A presenta potente actividad citotóxica y un efecto subagudo en *Thamnocephalus platyurus*.
- 10.4 Briareina B presenta muy potente actividad citotóxica y un efecto agudo en *Thamnocephalus platyurus*.
- 10.5 Este es el primer estudio que se realiza sobre la actividad biológica *in vitro* de briareinas A y B.
- 10.6 Este es el primer reporte sobre actividad antimicótica realizado sobre un compuesto con esqueleto de Briarano.
- 10.7 Briareina B es la primera briareina a la que se le reporta actividad antimicótica.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Continuar aislando briareinas A y B de *Briareum asbestinum*, para realizar otras pruebas de actividad biológica, que han dado positivo briareinas de estructura similar, como actividad inmunomoduladora, antiinflamatoria y antiviral.
- 11.2 Realizar ensayos citotóxicos de briareinas A y B con *Artemia salina* y líneas celulares cancerosas.
- 11.3 Realizar ensayos biológicos a la briareina A como probable compuesto neurotóxico.
- 11.4 Realizar ensayos de inhibición de la pigmentación *in vitro* de cepas de hongos patógenos con briareina B.
- 11.5 Continuar aislando y evaluando la actividad biológica de invertebrados marinos que se encuentran en las costas del país, ya que demuestran ser potentes fármacos contra enfermedades que mas afectan a la población.

12 REFERENCIAS

- 12.1 Rodríguez, A.D. 1995. THE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY OF WEST INDIAN GORGONIAN OCTOCORALS. *Tetrahedron* (51). pp 4571-4618.
- 12.2 Coll, J.C. 1992. THE CHEMISTRY AND CHEMICAL ECOLOGY OF OCTOCORALS (COELENTERATA, ANTHOZOA, OCTOCORALLIA). *Chemical Reviews* (92). pp 613-631.
- 12.3 Bayer, F. M. 1961. THE SHALLOW WATER OCTOCORALLIA OF THE WEST INDIAN REGION. Martinus Nijhoff. The Hage, Netherlands.
- 12.4 Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R. 2005. MARINE NATURAL PRODUCTS. *Natural Product Reports*. (22). pp 15-61.
- 12.5 Harbone, J. B. 2001. TWENTY-FIVE YEARS OF CHEMICAL ECOLOGY, MILLENIUM REVIEW, *Natural Product Reports*. (18). pp 15-61.
- 12.6 Weinheimer, A.J.; Spraggins, R.L. THE OCCURRENCE OF TWO NEW PROSTAGLANDIN DERIVATIVES (15-EPI-PGA₂ AND ITS ACETATE, METHYL ESTER) IN THE GORGONIAN *Plexaura homomalla*. CHEMISTRY OF COELENTERATES XV. 1969, *Tetrahedron Letters* (10). pp. 5185-5188.
- 12.7 Faulkner, D. J. 2000. HIGHLIGHTS OF MARINE NATURAL PRODUCTS. *Natural Product Reports; Millenium Review* (17). pp 1-6.
- 12.8 Cobar O.M. 1996. NEW NATURAL PRODUCTS FROM THE CARIBBEAN MARINE INVERTEBRATES: *Briareum asbestinum*, *Halichondria* sp., and *Eunicea calyculata* forma Coronata. Dissertation Thesis, University of Puerto Rico. pp.222.
- 12.9 Sung, P.J. 2002. THE HETEROCYCLIC NATURAL PRODUCTS OF GORGONIAN OCTOCORALS OF GENUS BRIAREUM EXCLUSIVE OF BRIARANE-TYPE DITERPENOID. *Heterocycles* (57). pp 1705-1715.

- 12.10 Newman, D.J. 2004. MARINE NATURAL PRODUCTS AND RELATED COMPOUNDS IN CLINICAL AND ADVANCED PRECLINICAL TRIALS. *Journal of Natural Products* (67). pp 1216-1238.
- 12.11 Hyde, R. W.1966. Ph.D. DISSERTATION, University of Oklahoma, USA.
- 12.12 Burks, J.E.; van der helm, D.; Chang, C. Y.; Ciereszko, L. S. 1977. THE CRYSTAL AND MOLECULAR STRUCTURE OF BRIAREIN A, A DITERPENOID FROM THE GORGONIAN *Briareum asbestinum*. *Acta Crystallographica* (B33). pp 704-709.
- 12.13 Bernardelli, P.; Paquette, L. 1998. SURVEY OF OXYGENATED 2,11-CYCLIZED CEMBRANOIDS OF MARINE ORIGIN. *Heterocycles*. (49). pp. 531-556.
- 12.14 Rodríguez, A.D.; Ramírez, C.; Cobar, O.M. 1996. BRIAREINS C-L, NEW BRIARANE DITERPENOID FROM THE COMMON CARIBBEAN GORGONIAN *Briareum asbestinum*. *Journal of Natural Products*, (59). pp. 16-22.
- 12.15 Sung, P.J.; Sheu, J.H.; Xu, J.P. 2002. SURVEY OF BRIARANE-TYPE DIETRPENOID OF MARINE ORIGIN, *Heterocycles* (57). pp. 535-579.
- 12.16 Sung, P.J.; Chang, P. Ch.; Fang, L. Sh.; Sheu, J.H.; Chen, W. Ch.; Chen, Y.P.; Lin, M.R. 2005. SURVEY OF BRIARANE-TYPE DIETRPENOID PART II. *Heterocycles* (65). pp. 195-204.
- 12.17 Polo, A. 2003. INFORME DE PROSPECCIÓN 2003 DEL CARIBE GUATEMALTECO. Mediterráneo Servicios Marinos S.L. Departamento de Biología Marina. Alicante, España. pp.35.
- 12.18 Wright, A.E. ISOLATION OF MARINE NATURAL PRODUCTS in *Natural Products Isolation*, 1998. *Methods in Biotechnology No. 4*, Humana Press, USA. pp. 365-408.
- 12.19 McLafferty, F.W; Turecek, F. MASS SPECTRAL CORRELATIONS. 1982. 2th Ed. *Advances in Chemistry Series (40)*. American Chemical Society, USA. pp 124.

- 12.20 McLafferty, F.W; Venkataraghavan, R. INTERPRETATION OF MASS SPECTRA. 1993. 4th Ed. University Science Books, USA. pp 371.
- 12.21 CYTED. (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) 1995. MANUAL DE TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica, Proyecto X-1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. pp. 45-46.
- 12.22 Bauer, A.W.; Kirby, G.; *et.al.* 1966. ANTIBIOTIC SUCEPTIBILITY TESTING BY A STANDARIZED SINGLE DISK METHOD. American Journal of Clinical Pathology (45). pp. 493-497.
- 12.23 Mitscher, L.A.; Leu, R.P.; Bathala, M.S.; Wu, W.N.; Beal, J.L.; White, R. 1972. ANTIMICROBIAL AGENTS FROM HIGHER PLANTS. INTRODUCTION RATIONALE AND METHODOLOGY, Lloydia (35). pp. 157-163.
- 12.24 Brancato F.P; Holding N.S. 1983. THE DIAMETER OF THE MOULD COLONY AS A RELIABLE MEASURE OF GROWTH. *Journal of Mycology* (45): pp. 848-863.
- 12.25 Persoone, G.; Mayorga, P. 2005. ENSAYO DE TAMIZAJE DE TOXICIDAD PARA AGUA DULCE CON CRUSTACEOS (*Thamnocephalus platyurus*). *Journal of Ethnopharmacology*. Sometido a publicación.

13. ANEXOS

Anexo No. 1
Briareum asbestinum
In-Situ



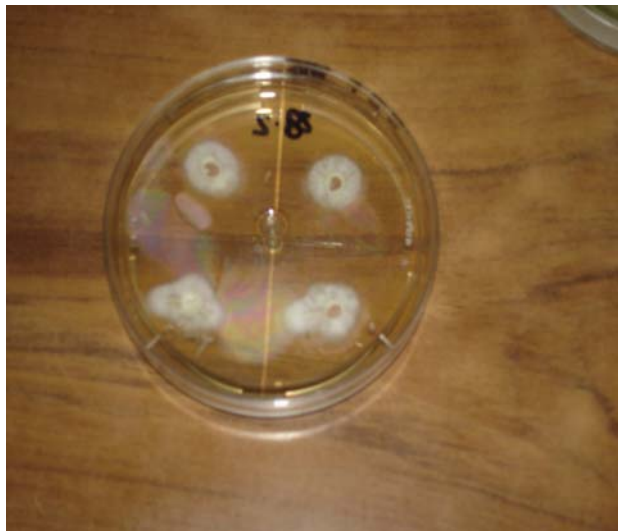
ANEXO No. 2
Briareum asbestinum
Seco, Ex-situ



ANEXO No. 3
Resultados de Actividad Antimicótica
Briareina a, Briareina B y Control



ANEXO No. 4
Resultados de Actividad Antimicótica
Briareina B a los 7 días de inoculación



ANEXO No. 5
Resultados de Actividad Antimicótica
Briareina B a los 14 días de inoculación

