

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a knight on horseback, holding a shield and a sword. Above the knight is a crown. The seal is surrounded by a circular border containing the Latin motto "SICUT ERAT CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA CONJECTA INTER CARTELOS SACROS PLVS ULTRA".

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Y LA CLASE PRINCIPAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PRESENTES EN EL EXTRACTO n-HEXANICO DEL GORGONIO CARIBEÑO
Erithropodium caribaeorum

LESLIE PATRICIA VELÁSQUEZ LÓPEZ

QUÍMICA FARMACÉUTICA

Guatemala, Marzo del 2006

DL
06
T(2407)

JUNTA DIRECTIVA

<i>M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán</i>	<i>Decano</i>
<i>Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona</i>	<i>Secretaria</i>
<i>Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo</i>	<i>Vocal I</i>
<i>Licda. Liliana Vides de Urizar</i>	<i>Vocal II</i>
<i>Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez</i>	<i>Vocal III</i>
<i>Br. Juan Francisco Carrascoza Mayén</i>	<i>Vocal IV</i>
<i>Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro</i>	<i>Vocal V</i>

AGRADECIMIENTO

A: LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Especialmente a:

- **LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**, Prestigioso centro de formación de profesionales a la cual tuve el privilegio de incorporarme.
- **A MI ASESOR DR. OSCAR CÓBAR**, por sus sabias enseñanzas, asesoría, paciencia y amistad.
- **A LICENCIADA SULLY CRUZ y LICENCIADA WALESKA ARGUETA** por sus oportunas observaciones en la corrección del presente trabajo.
- **AL PERSONAL DE EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES (LIPRONAT)**, por permitirme realizar este proyecto de tesis
- **AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS. (IIQB)**, Por su asesoría en el diseño estadístico.
- **AL PERSONAL DE EL LABORATORIO DE BIOENSAYOS DEL DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGÍA DE LA ESCUELA DE QUÍMICA BIOLÓGICA**, por su asesoría y colaboración de la parte experimental.
- **AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS. QUÍMICAS Y FARMACIA**, por su valiosa colaboración en la realización de la presente investigación.
- **A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE ME BRINDARON SU AYUDA INCONDICIONAL PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS.**

DEDICATORIA

- A DIOS:** Que con su inmensurable amor y bondad ha guiado cada paso de mi vida, porque sin Él no hubiera podido alcanzar este triunfo.
- VIRGEN MARIA:** Fuente de sabiduría, amor y esperanza, gracias por protegerme a lo largo de este camino.
- A MIS PADRES:** Edgar Velásquez y Leticia de Velásquez, que Dios me los bendiga por su apoyo y paciencia.
- A MIS HERMANOS:** Karina y Rolando, mis amigos de la infancia y testigos de mi felicidad a su lado.
- A MI FAMILIA:** Gracias por su cariño y oración.
- A MIS AMIGOS:** Quienes han estado conmigo siempre y por ser parte de gratos momentos en los años de estudio.
- A USTED:** Por acompañarme y ser parte de este triunfo.
MUCHAS GRACIAS.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
4. Justificación	4
5. Objetivos	5
6. Hipótesis	6
7. Materiales y Métodos	7
8. Resultados	8
9. Discusión de Resultados	9
10. Conclusiones	10
11. Recomendaciones	11
12. Referencias	12
13. Anexos	13

1. RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó con el propósito de contribuir al estudio de los productos naturales marinos en Guatemala, por lo que resultó de interés seleccionar al coral blando *Erithropodium caribaeorum*. Dicha especie ha sido poco estudiada, sin embargo ha sido explorada su composición química de sus extractos clorofórmico y etanólico, encontrándose entre sus principales componentes diterpenoides tipo Sarcodyctina, el que constituye el esqueleto carbonado de Eleutherobina, un metabolito secundario que en la actualidad se estudia en el FDA (Food Drug Administration) de los Estados Unidos como un probable medicamento anticáncer.

A la fecha no existen reportes sobre la composición química de otros extractos, derivándose de ello la importancia de la presente investigación, al investigar la composición química del extracto n-hexánico, en el que se esperaba encontrar compuestos con esqueleto carbonado similar a Eleutherobina.

El coral se recolectó en Punta de Manabique en el Departamento de Izabal, Guatemala, posteriormente se obtuvo el extracto n-hexánico mediante partición líquido-líquido y extracción exhaustiva; a una porción del extracto se le realizaron pruebas *in vitro* para determinar su actividad antibacteriana y citotóxica, separaciones cromatográficas y análisis de Espectrometría de Masa para determinar la naturaleza de los componentes presentes en el extracto.

En el estudio se evaluó la actividad antibacteriana del extracto n-hexánico contra varias cepas patógenas y la actividad citotóxica contra *Artemia salina*, estas pruebas determinaron que el extracto no presentó actividad contra cepas patógenas, mientras que se presentó citotoxicidad en la prueba contra *A. salina*.

Los resultados demuestran que el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* no posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium*

smegmatis, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli*.

El ensayo *in vitro* contra *A. salina* permitió evaluar la actividad citotóxica del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus diferentes fracciones, el cual presentó una concentración letal media (CL₅₀) 0.26 mg/ml en el extracto n-hexánico puro, su posterior fraccionamiento arrojó una CL₅₀ de 0.32 mg/ml en la fracción No. 1, CL₅₀ de 0.30 mg/mL en la fracción No. 2 y una CL₅₀ de 0.29 mg/mL en la fracción No. 6.

Se analizó cada una de las fracciones por medio de cromatografía de gases acoplada a Cromatografía de Masas (CG/EM), donde se identificó la clase principal de metabolitos secundarios presentes en cada fracción y determinó la presencia de compuestos tipo Sarcodyctina, de acuerdo al análisis de su patrón de fragmentación de sus Espectros de Masa de Impacto Electrónico. Dichas estructuras se encontraron en la fracción No. 6, que arrojó una mayor CL₅₀.

Por lo anterior se establece que el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* presentó citotoxicidad contra larvas de *Artemia salina* y posee Sarcodyctinas de estructura similar a Eleutherobina, las que deberá posteriormente elucidar su estructura química.

2. INTRODUCCIÓN

En las aguas tropicales del Océano Atlántico mesoamericano habitan diversos tipos de invertebrados marinos como los corales blandos (gorgonios, plumas de mar, abanicos de mar y otros), entre los cuales se encuentra el gorgonio caribeño *Erithropodium caribaeorum* (Phylum Coelenterata, Sub-phylum Cnidaria, Clase Anthozoa, Familia Briareidae).^{1,2} Este es un tipo de coral córneo (gorgónido), cnidiario, alcionario tropical y subtropical, con forma de crecimiento ascendente, a modo de plantas y esqueleto de un material orgánico córneo.

El cuerpo de la mayoría de los gorgonios presenta una varilla central axial, compuesta de una sustancia orgánica denominada gorgonia.³ *E. caribaeorum* se encuentra exclusivamente en aguas del Atlántico Caribeño (desde Bahamas al Atlántico Colombiano), es rico en diterpenoides altamente funcionalizados tipo briareína, los cuales han demostrado tener actividad biológica de interés.⁴

Recientemente, se aisló en una especie cultivada de este coral, el compuesto Eleutherobina el cual en la actualidad es un potencial compuesto anticáncer, con un novedoso mecanismo de acción, al enlazarse a las tubulinas polimerizadas. Este compuesto está siendo estudiado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) en Estados Unidos.^{6,8,10}

Se han realizado pocos estudios de la química de este coral, entre los que se puede mencionar el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de carácter diterpénico en sus extractos clorofórmico y etanólico, no existiendo reportes sobre la composición química de otros extractos orgánicos, por lo que es de suma importancia estudiar el extracto hexánico, en el que se sospecha la presencia de diterpenoides bioactivos, tipo Sarcodyctina, que constituye el esqueleto carbonado de Eleutherobina.^{4,5,6,8,9}

En esta investigación, se evaluó la actividad biológica del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y se determinó la clase principal de metabolitos secundarios presentes en

dicho extracto, mediante la extracción exhaustiva del gorgonio con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) y posterior partición con n-hexano. La actividad antibacteriana contra varias cepas de bacterias patógenas y actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*, se evaluó utilizando métodos *in-vitro* que confirmen la actividad biológica del extracto n-hexánico de este gorgonio y simultáneamente, se determinó por métodos cromatográficos y espectroscópicos, la clase principal de metabolitos secundarios presentes en dicho extracto orgánico.^{18,19}

Este gorgonio caribeño es un recurso natural, que al ser rico en metabolitos secundarios altamente bioactivos y ser endémico del caribe mesoamericano, requiere seguir investigándose con la visión de su cultivo y de un desarrollo futuro de nuevos medicamentos de origen natural que tiendan a mejorar los niveles de salud de la población.

3. ANTECEDENTES

Erithropodium caribaeorum pertenece a la orden Gorgonacea de la familia Briareidae, es un tipo de coral córneo (gorgónido), cnidiario, alcionario tropical y subtropical, con forma de crecimiento ascendente, a modo de plantas y esqueleto de un material orgánico córneo.

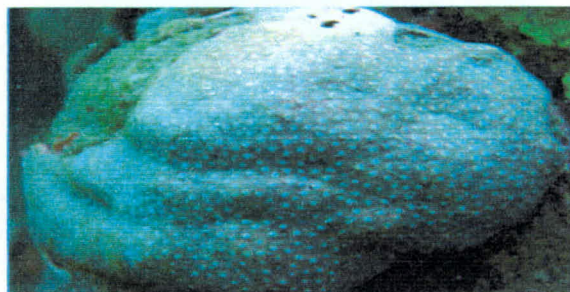


Figura 1. *Erithropodium caribaeorum*

Los gorgonios son miembros comunes y conspicuos de la fauna de los arrecifes del Caribe mesoamericano, principalmente abundante en aguas de las Antillas y el Mar Caribe. El cuerpo de la mayoría de los corales gorgónidos presenta una varilla central axial, compuesta de una sustancia orgánica denominada Gorgonia (proteína más mucopolisacáridos).

En torno al eje del animal, hay un cilindro de cenénquima y pólipos. El cenénquima posee espículas calcáreas embebidas de diferentes formas y colores. Es precisamente el color de las masas calcáreas del esqueleto el que presta su matriz amarillo, anaranjado o verdoso a algunas especies. Las colonias de la mayoría de estos corales son varas erectas ramificadas y parecen más bien plantas.^{1,2}

E. caribaeorum habita en aguas poco profundas y en nuestra región se le encuentra en Punta de Manabique en el Departamento de Izabal (Fig.2).^{3,9}

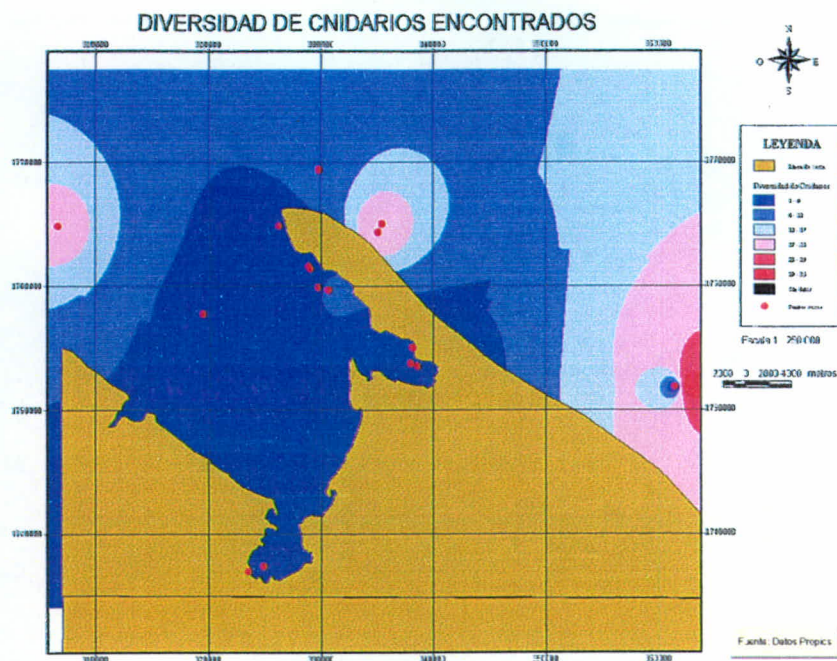


Figura 2. Parches Coralinos del Atlántico Guatemalteco

En 1995, se reporta la presencia de diterpenos con esqueleto briarano de especímenes colectados en las Islas Vírgenes. Estos compuestos denominados Erythrolidos, son usualmente clorados en el carbono 6 y son altamente oxigenados. Adicionalmente se publican algunas propuestas sobre la ruta biosintética de formación de estos diterpenos en el coral.⁴ Erythrolidos A y B fueron aislados del extracto clorofórmico del gorgonio caribeño colectado en Carrie Bow Cay, Belice, y su estructura confirmada por medio de difracción de rayos X y datos espectroscópicos. La conversión fitoquímica de estos dos compuestos, vía un rearrreglo tipo “di π metano” ayudó a confirmar su cercana relación estructural.⁴

En 1999, de especímenes colectados en la costa norte de Jamaica, se reportan tres nuevas briareínas, además de las seis ya conocidas, (Erythrolidos A, B, D, E, F, I). La estructura de estos diterpenos fue establecida por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).⁵

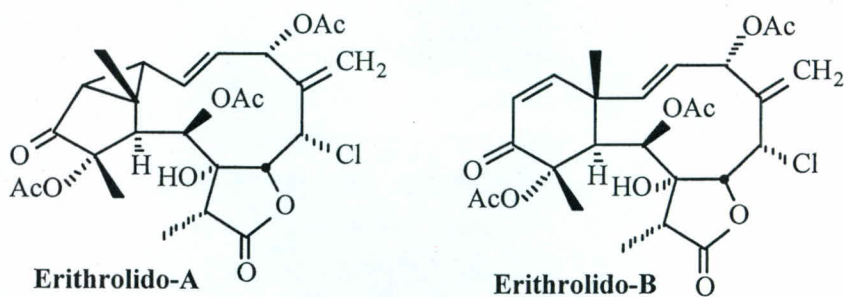


Figura 3. Estructura de Erithrólidos A y B

En 2000, se reporta el aislamiento de varios diterpenos con propiedades antimitóticas, del que de acuerdo a su variación estructural, se proponen farmacóforos responsables de ser estabilizadores microtubulares.⁶

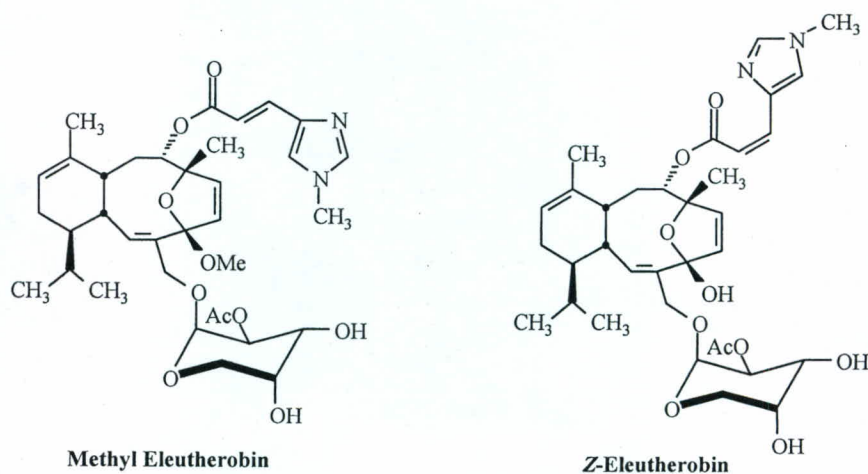


Figura 4. Estructura de Eleutherósidos

K. Kim y colaboradores en ese mismo año, en un estudio prospectivo, reportan que *E. caribaeorum* se encuentra exclusivamente en aguas del Atlántico Caribeño (desde Bahamas al Atlántico Colombiano), es rico en diterpenoides altamente funcionalizados tipo briareína, los cuales han demostrado tener actividad biológica de interés.⁷

La actividad antimitótica de eleutherobina y paclitaxel (Taxol®) y otros extractos naturales, se reporta por Roberge y colaboradores en ese mismo año. Se utiliza un ensayo de “pantalla de célula base” para detectar compuestos antimitóticos, que dan positiva la prueba ELISA. Este ensayo fue utilizado para estudiar más de 24,000 extractos de microorganismos

marinos e invertebrados y plantas terrestres. Fue relevante la actividad antimicótica del grupo de diterpenos tipo Elutherobina.⁸

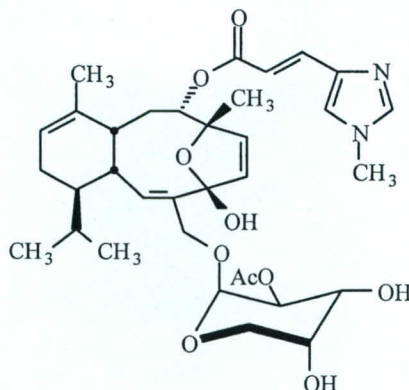


Figura 5. Estructura de Eleutherobina

La actividad anticancerígena de Eleutherobina y su inusual mecanismo de acción antimicótica, es estudiado por el FDA en Estados Unidos.^{8,9,10.}

Los Microtúbulos son fibras o filamentos proteicos, de unos 24 nm de diámetro, constituidos sobre todo por la proteína tubulina, proteína globular de 55 kD. Los microtúbulos forman la estructura del citoplasma celular conocida como citoesqueleto. Durante la mitosis, los microtúbulos se reorganizan formando el denominado “huso mitótico”.

El papel central de los microtúbulos en el proceso de separar a los cromosomas duplicados antes de la división celular, los hacen importantes objetivos de los medicamentos anticáncer.

El delicado balance en su proceso ensamblaje/desensamblaje que genera el huso mitótico, es clave en el movimiento de los dos sets de cromosomas, el que depende de la extensión y contracción coordinadas de la estructura terminal de los microtúbulos.^{8,10}

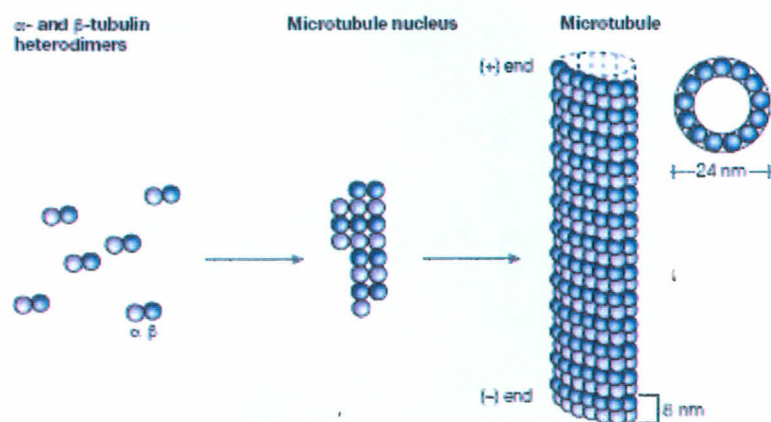


Figura 6. Estructura y Ensamblaje de Microtúbulos

En el 2002, se reporta el aislamiento de Eleutherobina, Herilolidos A y B y la nueva briareína Aquariolido A, de especies cultivadas de *E. caribaeorum*. Esta publicación es importante, ya que permite determinar que estos diterpenoides bioactivos pueden obtenerse también en especímenes cultivados y no sólo en aquellos que viven en su hábitat natural.¹¹

Nuevos diterpenoides bioactivos han continuado reportándose de este coral, en 2000 Caribaeolin (sin la molécula de azúcar), en 2001, Caribaeorano y 15-hidroxiCaribaeorano, han sido identificados en extractos etanólicos y metanólicos¹² y en el 2002, se aíslan nuevos Erythrolidos (K-Q), acompañados de los ya conocidos erithrolidos A, B, C, F y J, de especímenes colectados en los arrecifes Buccoo y Flying, en Tobago. Las estructuras de estas briareínas fueron determinadas por Resonancia Magnética Nuclear. La estructura de erithrolidos K y P fueron confirmados con análisis cristalográfico de rayos X.¹³

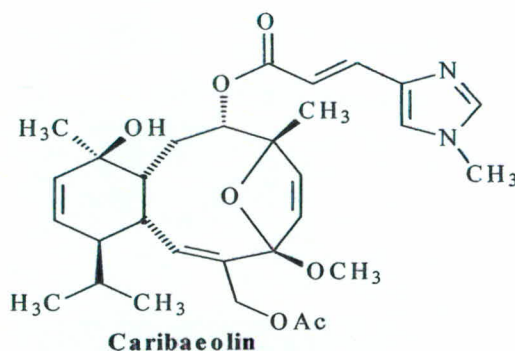


Figura 7. Estructura de Caribaeolin

Como podrá observarse, este coral no ha sido exhaustivamente estudiado, y los metabolitos secundarios reportados se han aislado de sus extractos metanólico (principalmente) y clorofórmico, de aquí la importancia de estudiar el extracto n-hexánico del coral, los cuales son ricos en diterpenoides en este tipo de invertebrados marinos.^{14,15,16,17,18}

Sarcodyctina A, junto con sus congéneres Sarcodyctinas B, D, E y F, fue reportada en 1987 de *Sarcodictyon roseum* del pacífico australiano, indicándose que este compuesto posee actividad antitumoral contra una variedad de células cancerígenas a niveles de IC₅₀ entre 400 y 900 nM e induce polimerización de las tubulinas y estabilización de los microtúbulos, un mecanismo de acción que actualmente se encuentra en estudio y es por el que actúa Taxol, comercializado como medicamento anticáncer con el nombre comercial de Paclitaxel. Actualmente se han reportado 22, la mayoría del pacífico norte y pareciera ser el grupo que mayor actividad biológica posee, reportándose Eleutherobina con un IC₅₀ entre 10 y 15 nM contra una variedad de células cancerosas, induciendo también la polimerización de tubulinas y la estabilización de los microtúbulos.

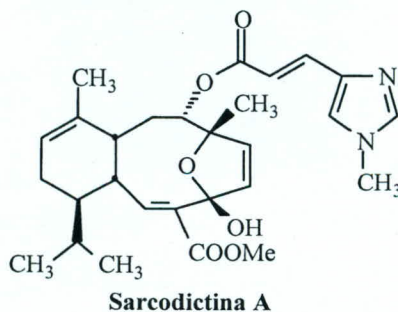


Figura 8. Estructura de Sacodyctina A

4. JUSTIFICACIÓN

Erithropodium caribaeorum es un coral blando, que se encuentra exclusivamente en aguas del caribe mesoamericano, del que se han reportado metabolitos secundarios bioactivos con actividad antimitótica actualmente en estudio en el FDA de Estados Unidos, para convertirlos en medicamentos anticáncer.

Los estudios de la química y actividad biológica de *E. caribaeorum* se han realizado únicamente con los extractos clorofórmico y metanólico, de donde se han aislado los metabolitos bioactivos. Por lo anterior, es importante estudiar la bioactividad y familia de metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico, en el que se sospecha la presencia de metabolitos con esqueleto tipo Sarcodyctina (base de Eleutherobina) y briareínas poco funcionalizadas como los principales.

Es de hacer notar que el estudio de los metabolitos secundarios bioactivos obtenidos de invertebrados marinos es relativamente reciente. El cultivo *in vitro* de estos invertebrados, así como la síntesis de estas moléculas bioactivas representan un área en franca expansión.

La preparación de extractos estandarizados que contengan los metabolitos bioactivos, puede en un futuro convertirse en una fuente de medicamentos naturales a bajo costo, que permitan combatir enfermedades terminales que afectan a la población mundial y sociedad guatemalteca particularmente.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antibacteriana, citotóxica y principal familia de metabolitos secundarios presentes en el extracto n-hexánico del coral blando *Erithropodium caribaeorum*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.2.1 Colectar e identificar el coral *E. caribaeorum*.
- 5.2.2 Obtener y fraccionar el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum*.
- 5.2.3 Evaluar la actividad antibacteriana del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* contra varias cepas de bacterias patógenas *in vitro*.
- 5.2.4 Determinar la actividad citotóxica del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus fracciones contra nauplios de *Artemia salina*.
- 5.2.5 Identificar la clase de metabolitos secundarios presentes en el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum*.

6. HIPÓTESIS

El extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* posee actividad antibacteriana y citotóxica *in vitro* contra cepas de bacterias patógenas y nauplios de *Artemia salina*, entre sus principales metabolitos secundarios contiene cembranoides 2-11 ciclizados tipo Sarcodyctina poco funcionalizados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO DEL TRABAJO

El universo de trabajo está integrado por el extracto n-hexánico de *Erithropodium caribaeorum*.

7.2 MEDIOS

7.2.1 RECURSOS HUMANOS

7.2.1.1 Nombre completo: Br. Leslie Patricia Velásquez López

7.2.1.2 Categoría y puesto: Estudiante de Química Farmacéutica

7.2.1.3 Horas semanales dedicadas a la investigación: 25h/semana

7.2.1.4 Atribuciones: Realizar extracciones y fraccionamiento del gorgonio caribeño, efectuar las pruebas de tamizaje químico y fraccionamiento, coordinar la realización de bioensayos de los extractos y fracciones, analizar los resultados, discutir la interpretación de los resultados químicos, espectroscópicos y de actividad biológica con el equipo de trabajo y preparar una versión preliminar del informe final para su revisión, aprobación y posterior publicación como informe final de tesis.

7.2.2 PERSONAL DE APOYO

Dr. Oscar Cóbar (5h/semana) asesorar en la realización de ensayos químicos, espectroscópicos y de actividad biológica, interpretación de los espectros obtenidos.

7.2.3 RECURSOS INSTITUCIONALES

- Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (LIPRONAT)
- Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica.
- Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias. Químicas y Farmacia.
- Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. (IIQB)
- Centro de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia -CEDOBF-.

7.2.4 RECURSOS MATERIALES

7.2.4.1 Organismos de experimentación:

7.2.4.1.1 Especímenes de *Erithropodium caribaeorum* y su extracto n-hexánico.

7.2.4.1.2 Para la actividad antibacteriana; cepas de microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli* ATCC 25922.

7.2.4.1.3 Para la actividad citotóxica; Nauplios de *Artemia salina*.

7.2.4.2 Material y Equipo:

7.2.4.2.1 Disolventes orgánicos necesarios para efectuar las extracciones requeridas, así como para las pruebas analíticas, (metanol, cloroformo, n-hexano, acetona, acetato de etilo, etc.)

7.2.4.2.2 Medios de cultivo (Muller Hinton, Mycosel y Sabouraud) para probar la actividad antibacteriana.

7.2.4.2.3 Equipo para extracciones orgánicas y monitoreo de metabolitos secundarios: Placas pre-cortadas de cromatografía en capa fina (Sílica Gel G F254), revelador universal Yodo/Yoduro, percoladores de vidrio, evaporador rotatorio, desecadora, balanza analítica.

7.2.4.2.4 Equipo a utilizar para identificación de los metabolitos secundarios en convenios de cooperación: Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, utilizando la base de datos Wiley 275.1. Cromatógrafo de gases (Hewhelt P. 5890 Series II) acoplado al Detector de masas selectivo (Hewlett Packard 5971), Columna HP-5 (Crosslinked 5%

PH ME Siloxano) con grosor de la película de 0.33 μ m, un diámetro interno de 0.2 mm y de largo 25 m.

7.2.4.2.5 **Equipo utilizado:**

- Balanza analítica
- Rotavapor
- Percolador
- Bomba de vacío
- Ampolla de decantación
- Cámaras de revelado cromatográfico
- Asperjador
- Campana de extracción de gases
- Lámpara de luz UV/VIS
- Campana microbiológica
- Incubadora
- Refrigeradora
- Cristalería común de laboratorio
- Placas cromatográficas de Sílica Gel 60 F254
- Cajas de Agar Muller-Hinton
- Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas
- Útiles de oficina y computación para digitación, análisis y presentación de resultados.

7.2.4.2.6 Los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Bioensayos del Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, quien proporcionó la asesoría correspondiente, el material de limpieza y mantenimiento para realizar bioensayos.

7.2.4.2.7 El trabajo químico se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales -LIPRONAT- y el Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica de la Escuela de Química Farmacéutica, los cuales están equipados con recursos propios y proporcionados por IIQB, DIGI, OEA y CONCYT.

7.3 METODOLOGÍA

7.3.1 PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS

7.3.1.1 FASE DE RECOPIACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se efectuó revisión bibliográfica exhaustiva en la literatura, incluyendo revistas científicas arbitradas internacionalmente como Journal of Natural Products, Journal of Organic Chemistry, Organic Letters, Natural Product Reports, Journal of Medicinal Chemistry y revisión de literatura existente en el Centro de Documentación de la Facultad.

7.3.1.2 OBTENCIÓN DEL ORGANISMO

El organismo se colectó vía buceo a una profundidad de 5 metros en las aguas de Punta de Manabique en el Departamento de Izabal, en parche coralino previamente identificado. El espécimen se introduce en bolsa plástica de cierre hermético y se coloca en hielera a una temperatura de 0°C o menor, utilizando para ello CO₂ sólido (hielo seco) o bien “pastillas de gel congelante” y transportadas debidamente identificadas al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales -LIPRONAT-.¹⁸

7.3.1.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

El material colectado se pesa y es cortado en pequeños pedazos, extrayéndose exhaustivamente durante 72 horas con metanol/cloroformo (1:1), utilizando recambios continuos de disolvente (aproximadamente 8 X 1 L). El extracto crudo obtenido se concentra por rotaevaporación hasta sequedad y se pesa.

El extracto crudo se suspende en agua y se extrae exhaustivamente con n-hexano, utilizando recambios continuos de disolvente (aproximadamente 6 X 1L).

El extracto n-hexánico se concentra por rotaevaporación hasta sequedad y se pesa.

7.3.1.4. TAMIZAJE QUÍMICO, FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS y BIOENSAYOS

A una porción del extracto n-hexánico se le realizaron pruebas *in vitro* para determinar su actividad antibacteriana y citotóxica.

7.3.1.4.1 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El extracto n-hexánico es estudiado vía cromatografía en capa fina, utilizando placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ como fase estacionaria y disolventes no polares de proporción variable, principalmente mezclas de Acetato de etilo-n-hexano, iniciando en proporción (3:7) hasta concluir con (5:5).

El perfil cromatográfico indicará la abundancia relativa de los metabolitos de este extracto y proporcionará, por comparación con la literatura reportada¹⁸ una indicación preliminar del tipo de metabolitos secundarios presentes. El fraccionamiento posterior se logra al someter el extracto n-hexánico a cromatografía en columna, utilizando Sílica Gel G 60 como fase estacionaria y Acetato de Etilo/n-hexano 7:3 como la fase móvil.

La confirmación del tipo de metabolitos y su probable identidad se obtiene por estudios de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS) en el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, utilizando la base de datos Wiley 275.1 (ChemStation Software, HP Analytical CD-ROM, MSD Mass Selective Detector Productivity), al obtenerse el Espectro de Masas de Impacto Electrónico de cada uno de los metabolitos del extracto, luego de posterior fraccionamiento, se observan las señales características de los distintos tipos de diterpenoides que pueden estar presentes.

Para obtener el Espectro de Masa de los diterpenoides, la temperatura de operación de la columna debe encontrarse entre 150-300°C. La fase móvil es un gas inerte, la elección del gas depende del sistema detector y en este caso se utilizó Helio. Por medio de un dispositivo de inyección, se introducen 0.1-5.0 µl muestra a analizar en la parte superior de

la columna. La muestra se volatiliza al entrar en contacto con la fase estacionaria. Dentro de la columna se separan los diferentes componentes de la fracción inyectada y pasan al Espectrómetro de Masas, cuyo sistema detector analiza el gas que fluye en la columna y da una señal eléctrica que es registrada gráficamente por un dispositivo adecuado, obteniéndose el Espectro de Masa de Impacto Electrónico de cada componente de la fracción.

7.3.1.4.2 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO*

PROCEDIMIENTO: Se mide por el crecimiento de bacterias inoculadas en superficie de medios de cultivo conteniendo moléculas bioactivas. El procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar y se basa en el descrito por Mitscher *et al.*, que consiste en preparar cajas de Agar Muller-Hinton (AMH) con 1.0 mg/ml del extracto (AMH-E). Se inoculan las bacterias en caldo, incuban 24 horas a 36⁰C, diluyen 1:100 en agua destilada estéril, inoculan con estrías por cuadruplicado (error <0.05) en la superficie de AMH-E e incuban a 36⁰C por 24 horas.

EVALUACIÓN: Se evalúa el crecimiento de bacterias (-) o su inhibición (+). Para la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) se usan diluciones decrecientes (1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL), se consideran positivos los extractos activos a concentraciones <1 mg/ml. El tamizaje antibacteriano se efectuó con las siguientes cepas de microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli*.¹⁹

7.3.1.4.3 BIOENSAYO *IN VITRO* EN NAUPLIOS DE *Artemia salina*.

PROCEDIMIENTO: Este ensayo permite la estimación de la citotoxicidad en nauplios de *A. salina* mediante la evaluación de al menos 3 niveles de dilución del extracto y las fracciones a ensayar. La técnica consiste en la preparación de un medio salino adecuado, la colocación de huevos del crustáceo en dicho medio y su eclosión. Se transfiere la mayor

cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con medio salino fresco. Se preparan para cada sustancia de prueba 3 niveles de dilución (1000, 500 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se colocan por triplicado en 9 pozos de la microplaca, haciendo un volumen total por pozo de 100 μL de solución a ensayar. Posteriormente se agregan a cada pozo 100 μL de medio salino conteniendo de 10-15 nauplios y 100 μL de medio salino. Se utilizan 3 pozos como controles negativos los que se preparan en forma similar, utilizando como sustancia de prueba el medio de disolución de los extractos.

EVALUACIÓN: Luego de 24 horas, se procede a contar el número de sobrevivientes en cada dilución, del que por diferencia con el valor inicial, se calcula el número de decesos observados. La Concentración Letal Media (CL_{50}) se calcula mediante una regresión no paramétrica utilizando el programa "Trimmed Spearman-Karber Method", versión 1.5. Los nauplios son sensibles a muchas sustancias de prueba, con lo que puede determinarse la bioactividad de las mismas. Como prueba de pretamizaje resulta idónea, principalmente en lo referente a la búsqueda de posibles sustancias antibióticas, citotóxicas, antimicrobianas y/o plaguicidas¹⁹.

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se efectuaron los tratamientos estadísticos respectivos a las pruebas de actividad antibacteriana y citotóxica contra *A. salina*, teniendo como factor el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum*.

Para la determinación de actividad antibacteriana, se utilizó el diseño de bloques completos al azar para los microorganismos, inoculando con estrías por quintuplicado en cajas de Agar Muller-Hinton (AMH) con 1.0 mg/mL del extracto *n-hexánico*, esperando obtener una respuesta binomial (crecimiento o no crecimiento).

7.4.1 NÚMERO DE RÉPLICAS

Utilizando la prueba de hipótesis binomial para la obtención de actividad biológica en microorganismos (actividad antibacteriana):

Ho : $p \leq 0.50$ (no efecto)

Ha : $p > 0.50$ (si efecto)

Para $p = 0.50$ y $\alpha = 0.05$, se requiere como mínimo 5 ensayos por cada tratamiento, esperando que los 5 sean éxito¹⁹.

Los resultados demuestran que de 5 ensayos realizados para cada cepa patógena, los 5 no presentaron actividad, por lo que Ho no se rechaza y se concluye que no tiene efecto antibacteriano el extracto n-hexánico de *E. Caribaeorum*.

7.4.2 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realizó mediante inferencia estadística, haciendo uso de técnicas no paramétricas, donde se utilizó para la estimación de concentraciones inhibitorias al 50% (CI₅₀), y utilizando la transformación a Trimmed Spearman-Kärber Method, versión 1.5, para la actividad citotóxica en nauplios de *A. salina*.

Se determinó la actividad citotóxica contra *A. salina* del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum*, el cual fue evaluado por quintuplicado agregando 100 μ l del extracto disuelto y 100 μ l del agua de mar con 10-15 nauplios (concentración final de 1mg/ml), utilizando como control negativo 100 μ l de agua de mar y 100 μ l de agua de mar con 10-15 nauplios. La citotoxicidad se expresa como concentración letal media (CL₅₀), es decir la concentración que mata el 50 por ciento de los nauplios. Se calculó el porcentaje de nauplios muertos de la siguiente manera:

Sumar el número de camarones muertos en los cinco pozos (X)

Sumar el número total de camarones en los cinco pozos (Y)

Dividir X dentro de Y, multiplicarlos por 100.

Se determinó el valor de CL_{50} con el programa de computadora Trimmed Spearman-Kärber Method, versión 1.5.

Si el porcentaje obtenido es mayor del 50 por ciento, significa que la CL_{50} es menor de 1 mg/ml, por lo que se realizó la prueba nuevamente utilizando concentraciones decrecientes (1.0, 0.5, 0.250, 0.125, 0.0625 y 0.031 mg/ml).

La prueba de hipótesis binomial para la caracterización de los extractos, en la que se realizaron ensayos macro y semimicro, muestra reacciones de coloración en Cromatografía de Capa Fina utilizando reveladores químicos para la identificación de los metabolitos secundarios presentes, análisis posterior del patrón de fragmentación del Espectro de Masas de Impacto Electrónico de cada metabolito y el análisis de las señales, utilizando la biblioteca de identificación Wiley 275.1.¹⁸

8. RESULTADOS

8.1 Rendimiento del extracto y sus fracciones:

En las tablas No. 1 y No. 2, se observan la cantidad de extracto obtenido y de cada fracción derivada (en gramos) y el porcentaje de rendimiento de cada uno.

Tabla No. 1

**Rendimiento del proceso de obtención
del extracto n-Hexánico de *E. caribaeorum***

Peso Organismo (gramos)	Peso de Extracto (gramos)	Rendimiento (%)
5.8243	3.5121	60.3008

Tabla No. 2

**Rendimiento del proceso de fraccionamiento
del extracto n-Hexánico de *E. caribaeorum***

No. de la fracción	Peso (gramos)	Porcentaje de rendimiento (%)
1	1.2131	34.5405
2	0.3319	9.4501
3	0.0565	1.6087
4	0.0311	0.8855
5	0.0448	1.2755
6	0.2088	5.9451
Total	1.8862	53.7057

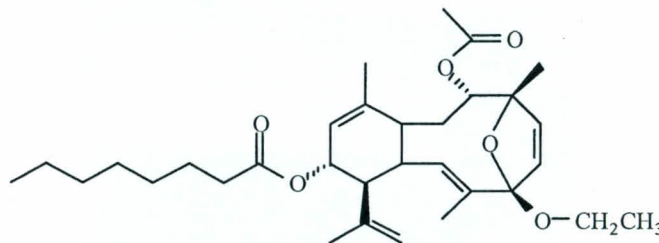
8.2 Constituyentes del extracto n-Hexánico identificados por medio de Espectrometría de Masas.

El Espectro de Masa de Impacto Electrónico (EMIE) obtenido de cada componente presente en las 6 fracciones obtenidas del extracto, fueron comparadas con los que posee la base de datos Wiley 275.1 incluida en el software del Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas, dando los siguientes porcentajes de correspondencia (Anexo 1).

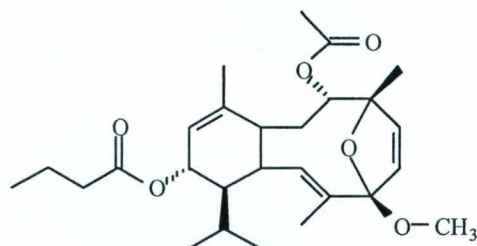
Tabla No. 3
Principales Metabolitos Secundarios y
Correspondencia de su EMIE de Base de Datos

Compuesto	% de Correspondencia
Colesta-5-eno-3 β -ol	99
α -Cubebeno	86
β -Cubebeno	89
α -Gurjuneno	93
<i>cis</i> -Calamaneno	97
β -Selineno	95
Valenceno	90

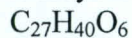
El análisis del Espectro de Masa de Impacto Electrónico de dos compuestos presentes en la Fracción No. 6 y la propuesta de su Mecanismo de Fragmentación, sugieren fuertemente la presencia de compuestos tipo Sarcodyctina, similares estructuralmente a las Valdivonas^{20,21}, cuya estructura se muestra a continuación (ver Anexos 2 y 3). Se sugieren los nombres de Caribaedyctinas 1 y 2.



Caribaedyctina 1
 $C_{32}H_{48}O_6$
 m/z 528.345089



Caribaedictina 2



$$m/z \ 460.282489$$

8.3 Determinación de la actividad contra bacterias, levaduras y hongos:

8.3.1 Fase de tamizaje

Se determinó la actividad del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus fracciones derivadas, contra las bacterias gram (+): *B. subtilis* y *S. aureus*, las bacterias gram (-): *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*; los hongos levaduriformes: *C. albicans* y *C. neoformans*, así como la micobacteria: *M. smegmatis*.

Tabla No.4

Actividad antibacteriana y antifúngica del extracto
n-Hexánico de *E. caribaeorum*

Extracto / Fracción	A	B	C	D	E	F	G	H
n-Hexánico (sin fraccionar)	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción No. 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción No. 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción No. 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción No. 4	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción No. 5	-	-	-	-	-	-	-	-
Fracción No. 6	-	-	-	-	-	-	-	-

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

De acuerdo a la tabla No. 4 se observa que hubo crecimiento de microorganismos al utilizar el extracto n-hexánico y sus fracciones, por lo que representa una actividad antibacteriana negativa.

8.4 Determinación de la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*:

8.4.1 Fase de tamizaje:

La actividad del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus fracciones fue determinada según la letalidad de las muestras contra nauplios de *A. salina* de 48 horas de vida a los que se enfrentaron. En la fase de tamizaje se consideró que un extracto presentaba actividad positiva si era capaz de matar a más del 50 por ciento de los nauplios contra los que se evaluó. Este procedimiento se realizó por quintuplicado por lo que el valor obtenido es el promedio de los cinco pozos de la prueba.

Tabla No. 5

Tamizaje de la actividad citotóxica del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus fracciones contra nauplios de *A. salina*

Extracto	Pozo No.1 Muertos/ Totales	Pozo No.2 Muertos/ Totales	Pozo No.3 Muertos/ Totales	Pozo No.4 Muertos/ Totales	Pozo No.5 Muertos/ Totales	Total muertos/ Total ensayo	Nauplios muertos (%)
n-hexánico (sin fraccionar)	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	50/50	100.0
Fracción No. 1	11/13	9/10	11/13	9/11	8/10	48/57	84.21
Fracción No. 2	11/13	9/11	13/15	13/14	11/15	57/68	83.82
Fracción No. 6	11/12	14/14	10/10	10/10	10/10	55/56	98.21

Puede apreciarse en la tabla anterior, que el extracto n-hexánico sin fraccionar de *E. caribaeorum* presentó actividad positiva en la fase de tamizaje, ya que el porcentaje de nauplios muertos es del 100% seguido de la fracción No. 6 con un 98.21%, estos valores fueron mayores del 50 por ciento, el cual era considerado como valor indicador de la actividad citotóxica positiva. No se evaluaron las fracciones No. 3, 4 y 5 debido a la escasa muestra del extracto.

8.4.2 Determinación de la CL_{50} :

Debido a que el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus particiones mostraron actividad positiva contra los nauplios de *A. salina* en la fase de tamizaje, se procedió a determinar la dosis a la que el mismo extracto era capaz de matar al 50 por ciento de estos crustáceos. El procedimiento aplicado fue el mismo que se utilizó en la fase de tamizaje, pero empleando tres diferentes concentraciones de las muestras a evaluar (1.0, 0.5 y 0.25 mg/ml), para obtener a través del programa Trimmed Spearman-Kärber Method, versión 1.5 la Concentración Letal Media (CL_{50}).

Tabla No. 6

**Determinación de la Concentración Letal Media (CL_{50})
del extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y
sus particiones contra nauplios de *A. salina*.**

Extracto /Fracción	No. nauplios muertos por dosis			CL_{50} mg/ml	Intervalo de Confianza LCS-LCI al 95%
	1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml		
n-hexánico (sin fraccionar)	50	48	30	0.260	0.230 – 0.290
Fracción No. 1	57	45	17	0.330	0.300 - 0.370
Fracción No. 2	66	59	18	0.300	0.280 – 0.340
Fracción No. 6	56	35	26	0.290	0.220 – 0.390

Los resultados anteriores demuestran que el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* posee actividad citotóxica ya que su CL_{50} se encuentra a menos de 1mg/ml, con lo que también se refleja en el porcentaje de nauplios muertos por concentración.

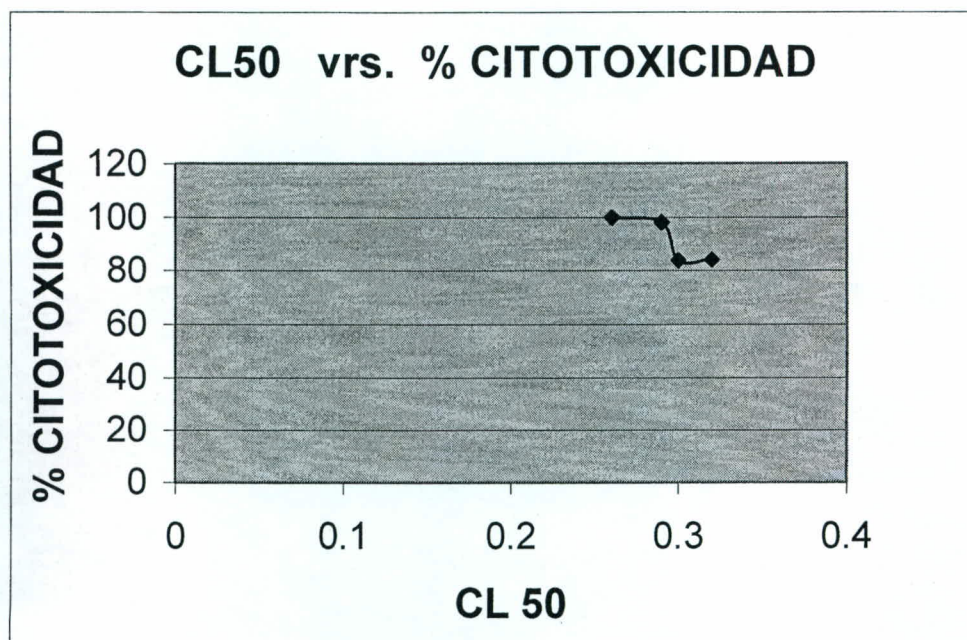


Grafico No. 1

El mayor porcentaje se obtiene del extracto sin fraccionar con una CL_{50} de 0.26 mg/ml, seguido de la fracción No. 6 con CL_{50} de 0.29 mg/ml., las fracciones 1 y 2 presentaron CL_{50} de 0.30 mg/ml y 0.33 mg/ml.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* corresponde a un 60.3008% del peso en extracto crudo del organismo y el fraccionamiento del extracto n-hexánico un 53.70%. Estos resultados son normales, al considerarse que el extracto n-hexánico es el más rico en compuestos apolares orgánicos en invertebrados marinos.¹⁸

Los resultados de actividad biológica del extracto n-hexánico del gorgonio, no mostraron actividad antibacteriana, sin embargo, como era de esperarse por los compuestos que posee, mostraron promisoria actividad citotóxica contra *A. salina*, siendo la fracción que contiene las Sarcodyctinas la más activa, con una CL_{50} de 0.29 mg/ml, alrededor de 640 μ M, que se considera un valor muy aceptable en su potencialidad citotóxica.

La potencialidad citotóxica se confirma al observar el gráfico No. 1 en el que se establece que a mayor porcentaje de nauplios muertos hay una dosis letal media menor de 1mg/ml, tal es el caso de la fracción que contiene las sarcodyctinas que posee un CL_{50} 0.29 mg/ml comparada con las otras fracciones con CL_{50} 0.30 mg/ml y 0.33 mg/ml donde hay un menor porcentaje de mortalidad.

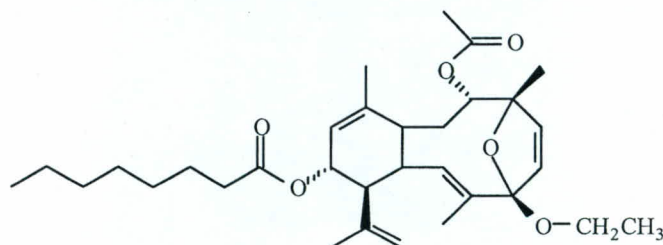
El análisis de los patrones de fragmentación de los compuestos separados por Cromatografía de Gases de cada fracción, determinaron que son esteroides y sesquiterpenos los compuestos más abundantes en el extracto n-hexánico del gorgonio, lo que se considera normal al comparar la composición de extractos n-hexánicos de corales blandos similares taxonómicamente a *E. caribaeorum*.^{5,14,18}

En el Anexo No. 1 se presenta una comparación del Espectro de Masas de Impacto Electrónico de los principales compuestos obtenidos con el que presenta la Base de Datos Wiley 275.1 incluida en el software del Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas utilizado.

Las fracciones 5 y 6, muestran espectros de masa que pueden asignarse a compuestos tipo Sarcodyctina, lo que se esperaba al conocerse por la literatura que el extracto metanólico posee Eleutherobina y Eleutherósidos.^{6,11,12}

En los anexos No. 2 y 3 se presenta la propuesta de estructura de dos nuevas Sarcodyctinas, fundamentadas éstas en el mecanismo de fragmentación de sus Espectros de Masa de Impacto Electrónico.

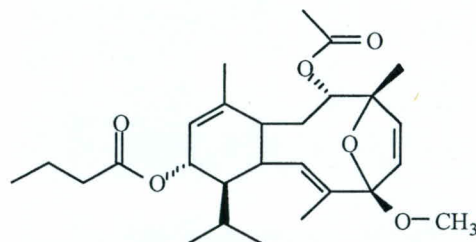
La propuesta de la estructura de los Compuestos 1 y 2 (Caribaedyctinas 1 y 2), cuyas estructuras se muestran a continuación, se fundamentan en el análisis de su Espectro de Masa de Impacto Electrónico, análisis que se incluye dentro de los anexos 2 y 3, en el que se adjunta el Espectro de Masas de cada uno, propuesta de su mecanismo de fragmentación y la discusión, que incluye la estructura asociada con cada pico considerado fundamental, su intensidad en el espectro y la base teórica que explica su formación.



Caribaedyctina 1

$C_{32}H_{48}O_6$

m/z 528.345089



Caribaedyctina 2

$C_{27}H_{40}O_6$

m/z 460.282489

El patrón de fragmentación de estos compuestos muestra claramente su naturaleza terpénica, típica de compuestos similares como los Asbestininos¹⁸, Eunuicelinas^{11,18}, Briareínas¹⁸ y Sarcodyctinas^{11,21}.

La ausencia del éster del Ácido Urocánico en Caribaedictinas 1 y 2, se demuestra por la ausencia en los Espectros de Masas¹¹ de fragmentos con m/z 135 y m/z 153 y con pérdidas de M-135 y M-153.

La ausencia de la molécula de glucosa, por no presentarse fragmentos a m/z 180 y m/z 179.¹⁸

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus fracciones expuestas a cepas patógenas no presentaron actividad antibacteriana.
- 10.2 El extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* y sus fracciones presentaron importante actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*.
- 10.3 Los principales tipos de metabolitos secundarios encontrados en el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* son esteroides y sesquiterpenos.
- 10.4 Se identificaron compuestos tipo Sarcodyctina en el extracto n-hexánico del gorgonio.
- 10.5 Los compuestos tipo Sarcodyctina se encuentran presentes en la fracción que presentó mayor actividad citotóxica del extracto.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Continuar evaluando el extracto n-hexánico de *E. caribaeorum* para determinar si el mismo posee otro tipo de actividad biológica.
- 11.2 Confirmar la estructura de las Sarcodyctinas encontradas en el extracto n-hexánico del gorgonio mediante nuevas investigaciones.
- 11.3 Continuar con el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios tipo Sarcodyctina del extracto n-hexánico del gorgonio, para identificar nuevas moléculas con potencial anticáncer.
- 11.4 Realizar pruebas de citotoxicidad con otros agentes como *Thamnocephalus platiurius* y líneas celulares cancerosas con las fracciones que demostraron mayor actividad.
- 11.5 Continuar los estudios de prospección de invertebrados marinos del caribe guatemalteco para continuar con la búsqueda de nuevos medicamentos de origen marino.

12. REFERENCIAS

1. Barnes, Robert, D. Zoología de los Invertebrados. Cuarta Edición. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F. **1984**, pp. 175-181
2. Bayer, F. M. The Shallow Water Octocorallia of the West Indian Region. Martinus Nijhoff. The Hage, Netherlands, **1991**, pp. 112-113.
3. Ruiz, Jorge. Clasificación de Corales. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología, Cátedra de Zoología. Guatemala, **2004**, Entrevista Personal.
4. Rodríguez, A. D. The Natural Products Chemistry of the West Indian Gorgonian Octocorals. *Tetrahedron*. **1995**, *51*, 4571-4618.
5. Maharaj D.; Pascoe, K.O.; Tinto, W.F. Briarane Diterpenes from the Gorgonian Octocoral *E. caribaeorum* from the Northern Caribbean. *Journal of Natural Products*. **1999**, *62*, 313-314.
6. Cinel, B. *et.al.* Antimitotic Diterpenes from *Erythropodium Caribaeorum*: Test Pharmacophore Models for Microtubule Stabilization. *Organic Letters*. **2000**, *25*, 257-260.
7. Kim, K. *et.al.* Fungal Disease Resistance of Caribbean Sea Fan Corals (*Gorgonia* spp.). Springer-Verlag, EE.UU. **2000**, *136*, 259-267.
8. Roberge, M., *et.al.* Cell-based Screen for Antimitotic Agents and Identification of Analogues of Rhizoxin, Eleutherobin, and Paclitaxel in Natural Extracts. *Cancer Research*. **2000**, *60*, 5052-5058. b) Amos, L.A. Microtubule Structure and Stabilisation. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2004**, *15*, 2153-2160.

9. Polo, S. A.; Sales Machí, L. Campaña de Muestreo Científico y Evaluación Ecológica; Área de Biodiversidad y Medio Natural en el Atlántico Guatemalteco. Informe Final. BIONET Servicios Técnicos S.L de España, Guatemala, **2002**, 38 pp.
10. Cragg, Gordon M.; Newman, David J. A Tale of Two Tumor Targets: Topoisomerase I and Tubulin. The Wall and Wani Contribution to Cancer Chemotherapy. *Journal of Natural Products.* **2004**, *67*, 232-244.
11. Taglialatela-Scafati, O. *et.al.* Diterpenoids From Cultured *Erythropodium caribaeorum*. *Organic Letters.* **2002**, *32*, 4085-4088.
12. Britton, R. *et.al.* Antimitotic Diterpenoids from *Erythropodium caribaeorum*, Isolation Artifacts and Putative Biosynthetic Intermediates. *Tetrahedron Letters.* **2001**, *42*, 2953-2956.
13. Banjoo, D. *et.al.* New Erythrolides from the Caribbean Gorgonian Octocoral *Erythropodium caribaeorum*. *Journal of Natural Products.* **2002**, *65*, 314-318.
14. Blunt, John W. *et.al.* Marine Natural Products. *Natural Product Reports.* **2005**, *22*, 15-61.
15. Ping-Jyun, Sung *et.al.* Survey of Briarane-type Diterpenoids of Marine Origin. *Heterocycles.* **2002**, *57*, 535-579.
16. Ping-Jyun, Sung *et.al.* Survey of Briarane-type Diterpenoids Part II. *Heterocycles.* **2005**, *65*, 195-204.
17. Hanson, R. Diterpenoids. *Natural Products Report.* **2004**, *21*, 185-793.

18. Cobar, Oscar. New Natural Products from caribbean marine Invertebrates: *Briareum asbestinum*, *Halichondria sp.* and *Eunicea calyculata* forma coronata. *Ph.D. Dissertation*. University of Puerto Rico. **1996**, 222 pp.
19. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo –CYTED–; MANUAL DE TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN, Subprograma X. Química Fina Farmacéutica, Proyecto X-1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región; España, **1995**. Pp. 44-46, 63-66, 69-70.
20. McLafferty, F.W.; Turecek, F. Interpretation of Mass Spectra. 4th Ed. University Science Books, Mill Valley, CA, USA. **1993**, 371 pp.
21. Lin, Y.; Bewley, C.A.; Faulkner, D.J. The Valdivones, Anti-inflammatory Diterpene Esters from the South African Soft Coral *Alcyonium valdivae*. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 7977-7984.
22. B.S. Mootoo, D. Banjoo. 10th International Symposium on Marine Natural Products, Symposium Paper, Okinawa, Japan. **2001**, 133 pp.
23. Paull, K. D., Lin, C. M. Identification of novel antimetabolic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity. *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 3892-3900.
24. Long, B.H, Carboni, J.M., Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (taxol). *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1111-1115.
25. Dambrosio, M., Guerriero, A., and Pietra, F. Sarcodyctin B, novel diterpenoidic alcohols esterified by (E)-N(1)-methyluronic acid. Isolation from the Mediterranean stolonifer *Sarcodictyon roseum*. *Helv. Chim. Acta.* **1987**, *70*, 2019-2027.

ANEXOS

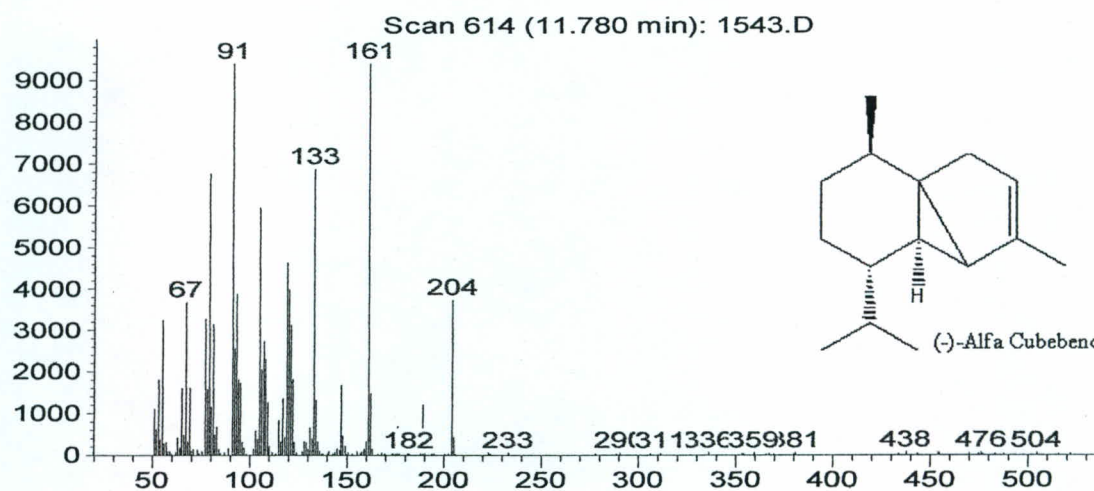
Anexo 1.

Comparación del Espectro de Masas de Impacto Electrónico de los principales compuestos obtenidos con el que presenta la Base de Datos Wiley 275.1 incluida en el software del Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas utilizado.

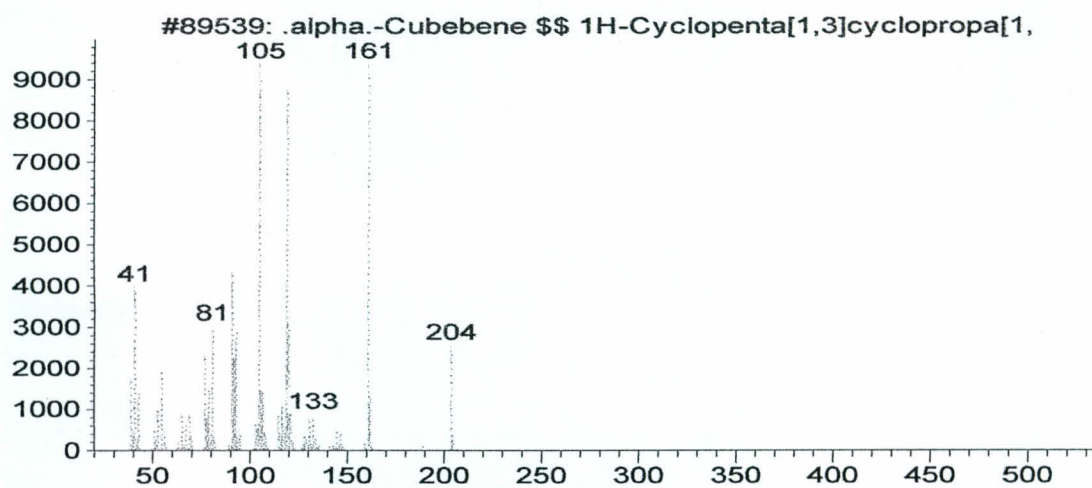
 α - Cubebeno

ESPECTRO *E. caribaeorum*

Abundance



m/z-->
Abundance

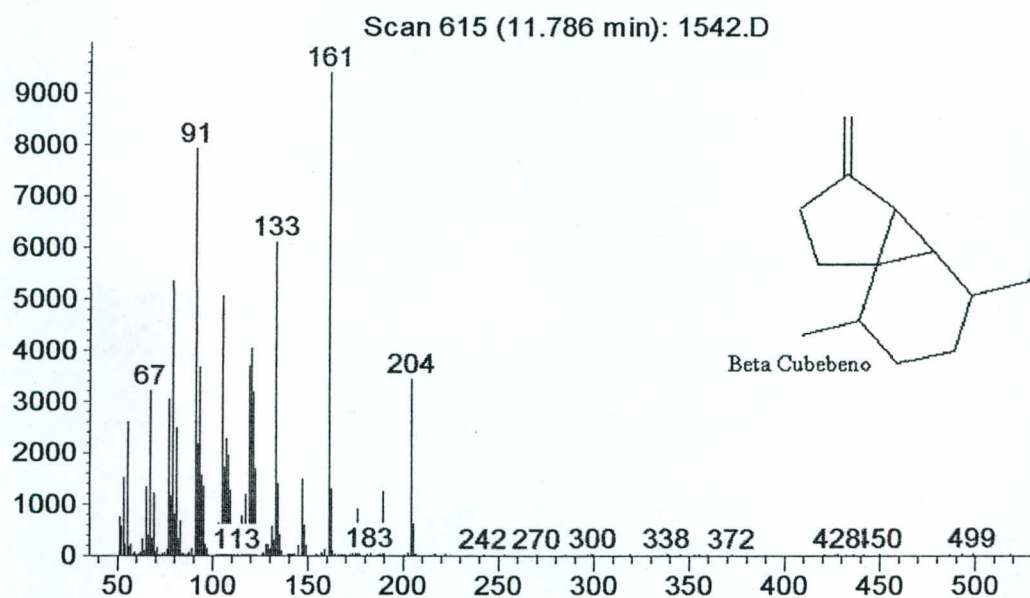


m/z-->

Espectro Base de Datos Wiley 275.1

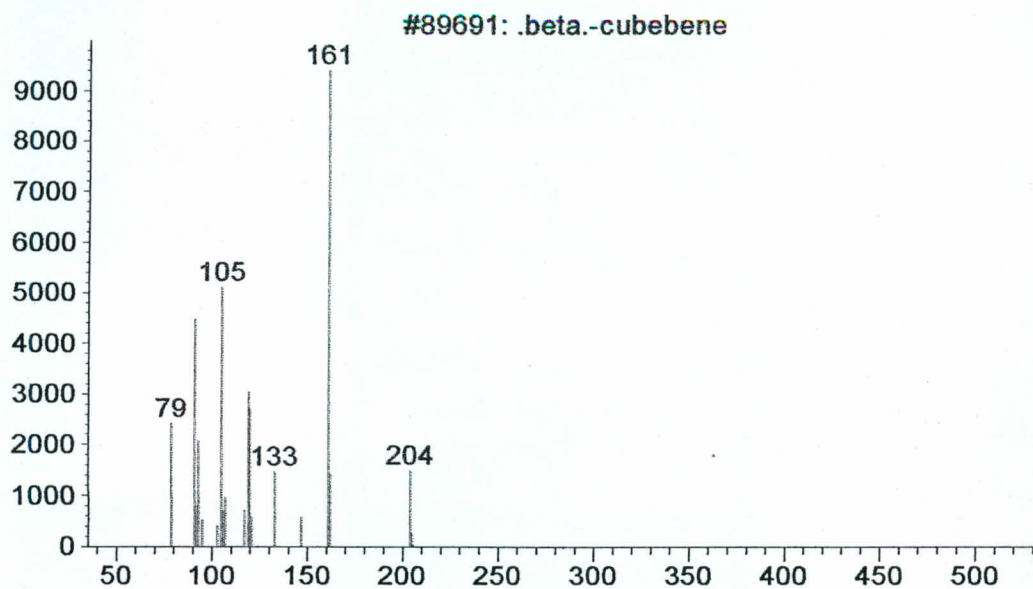
β - Cubebeno*ESPECTRO E. caribaeorum*

Abundance



m/z-->

Abundance

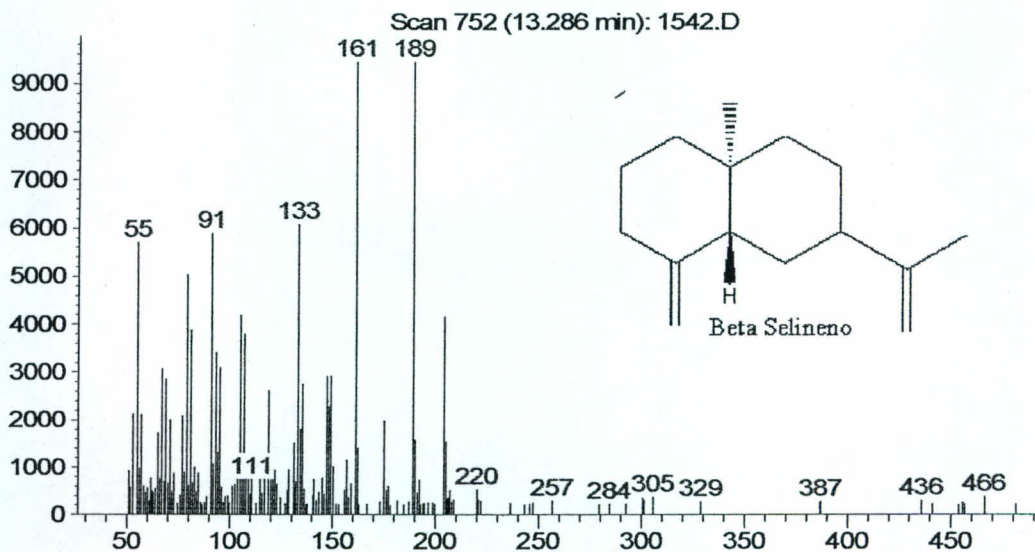
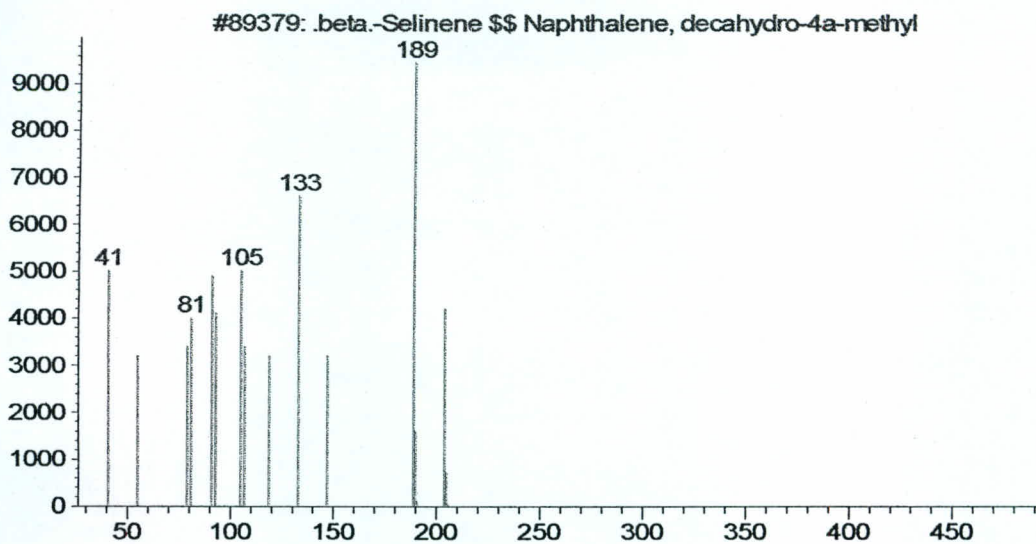


m/z-->

Espectro Base de Datos Wiley 275.1

β - Selineno*ESPECTRO E. caribaeorum*

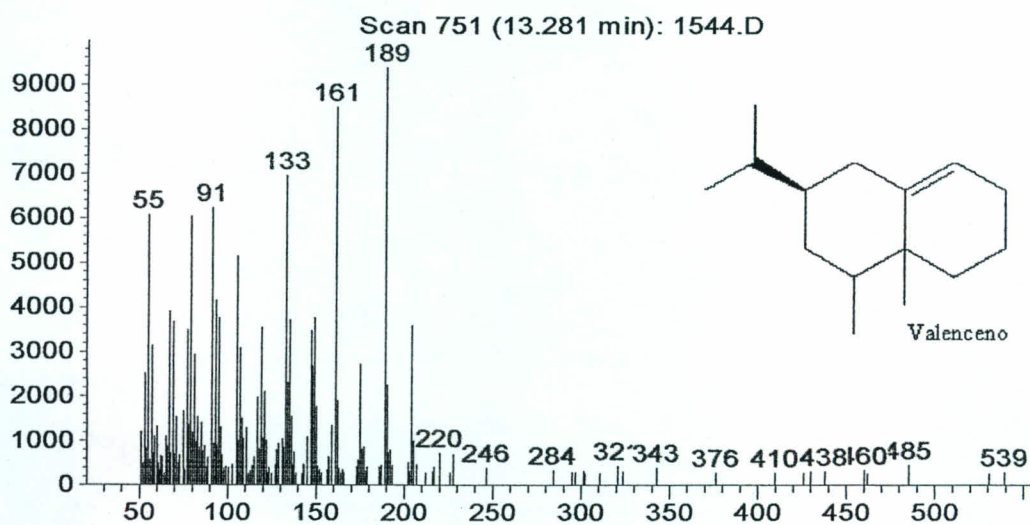
Abundance

m/z \rightarrow
Abundancem/z \rightarrow

Espectro Base de Datos Wiley 275.1

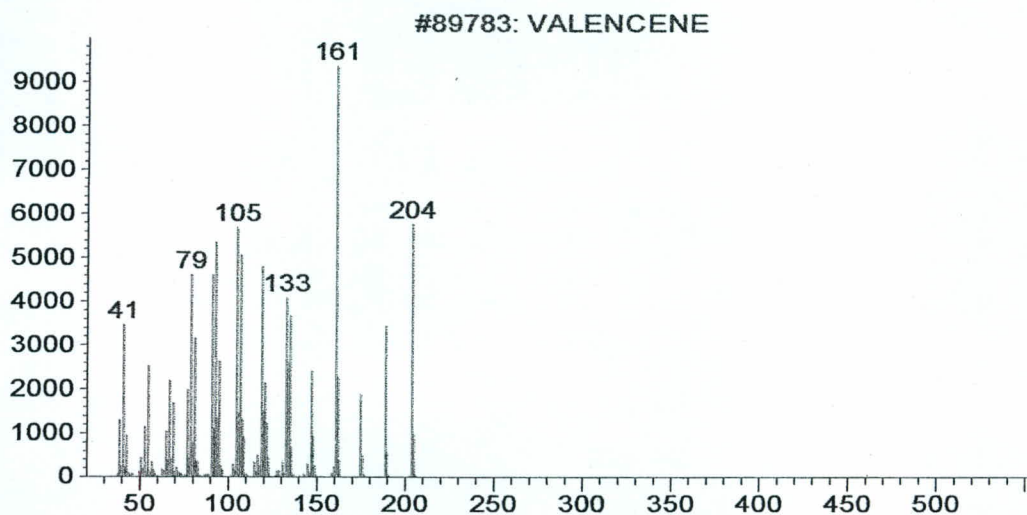
Valencene*ESPECTRO E. caribaeorum*

Abundance



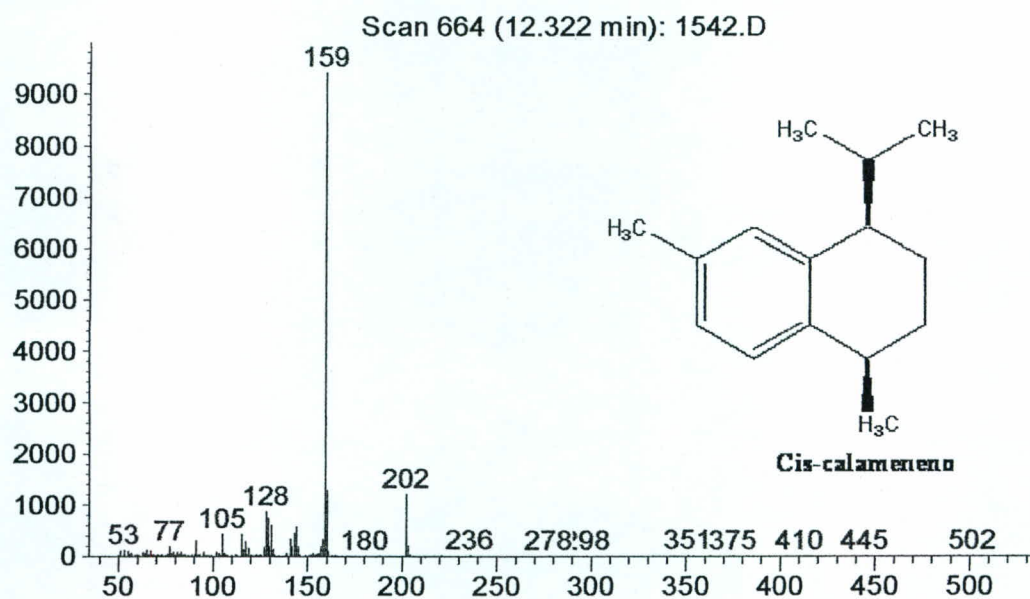
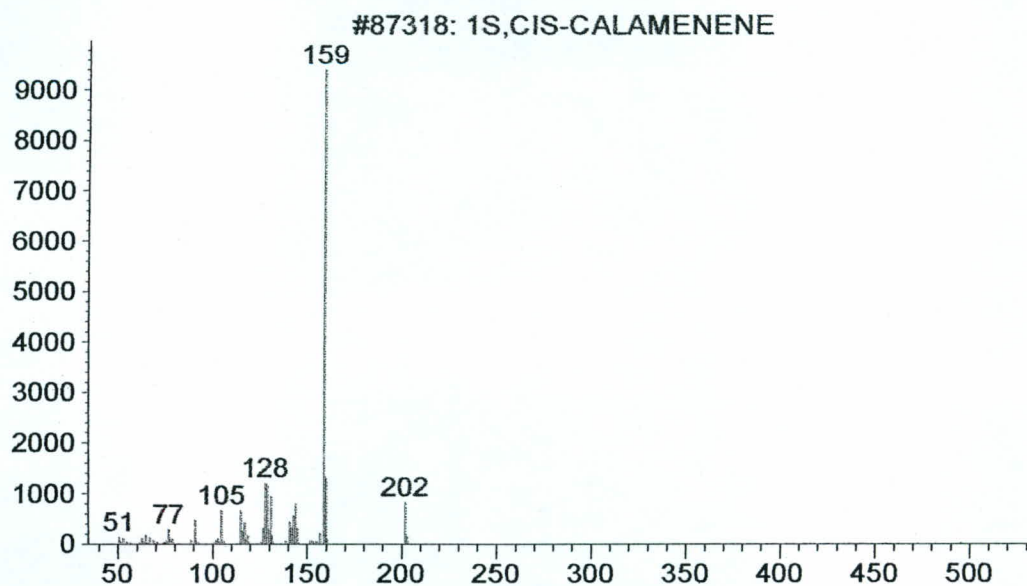
m/z-->

Abundance

**Espectro Base de Datos Wiley 275.1**

Cis- calamineno*ESPECTRO E. caribaeorum*

Abundance

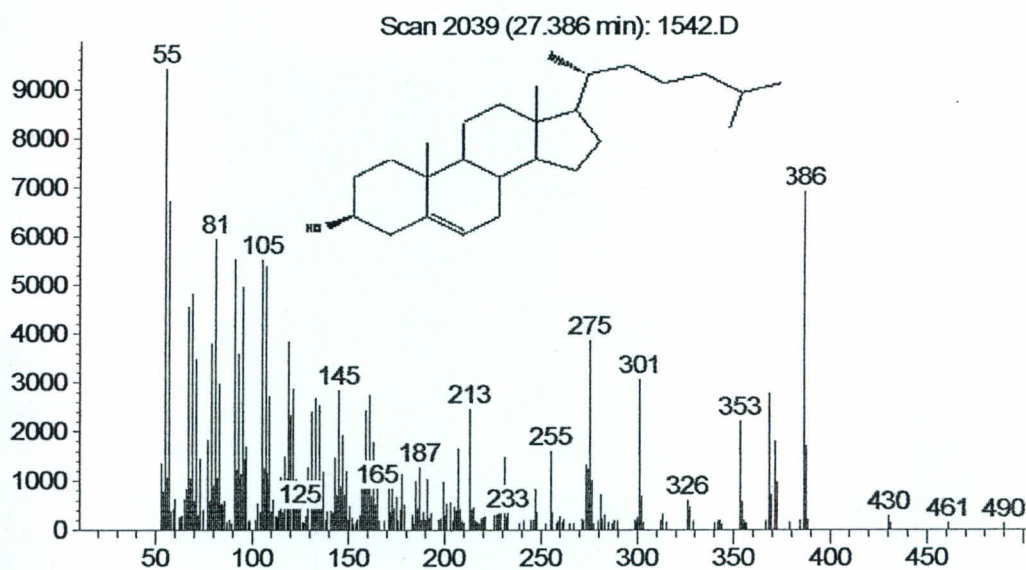
m/z-->
Abundance

m/z-->

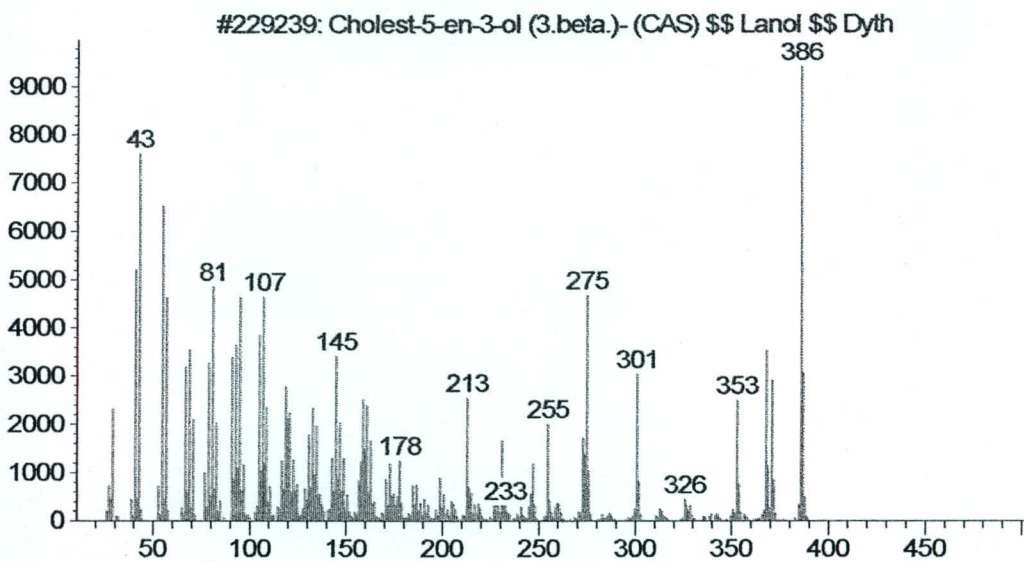
Espectro Base de Datos Wiley 275.1

Colesta - 5 - eno - 3 β - ol
ESPECTRO E. caribaeorum

Abundance



m/z →
 Abundance

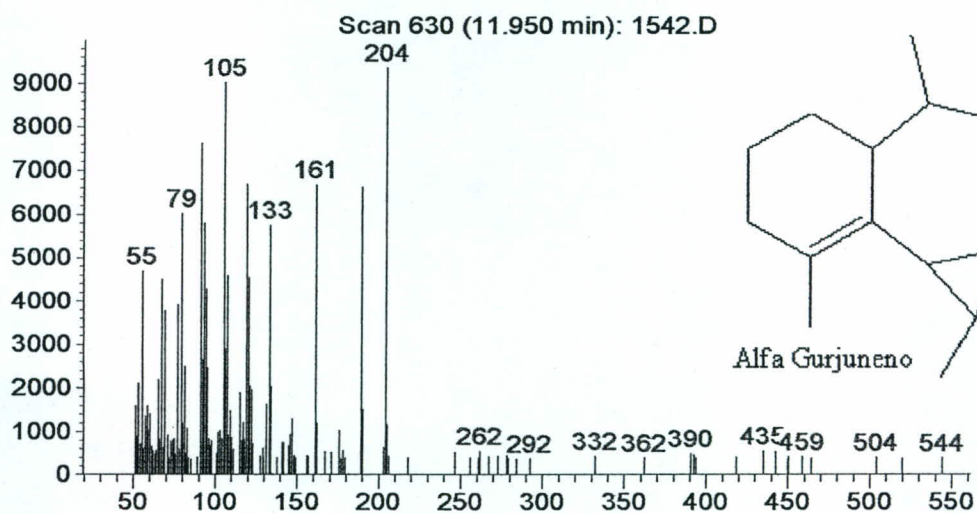
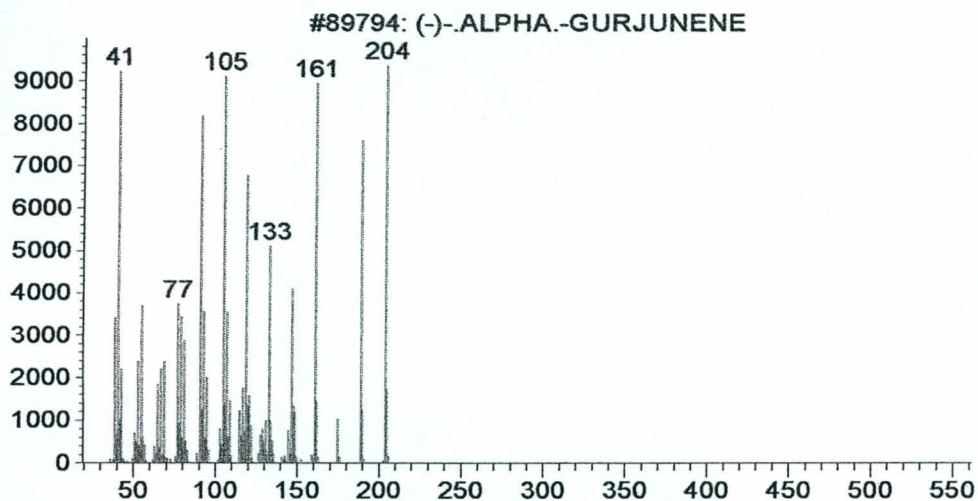


m/z →

Espectro Base de Datos Wiley 275.1

α - GurjunenoESPECTRO *E. caribaeorum*

Abundance

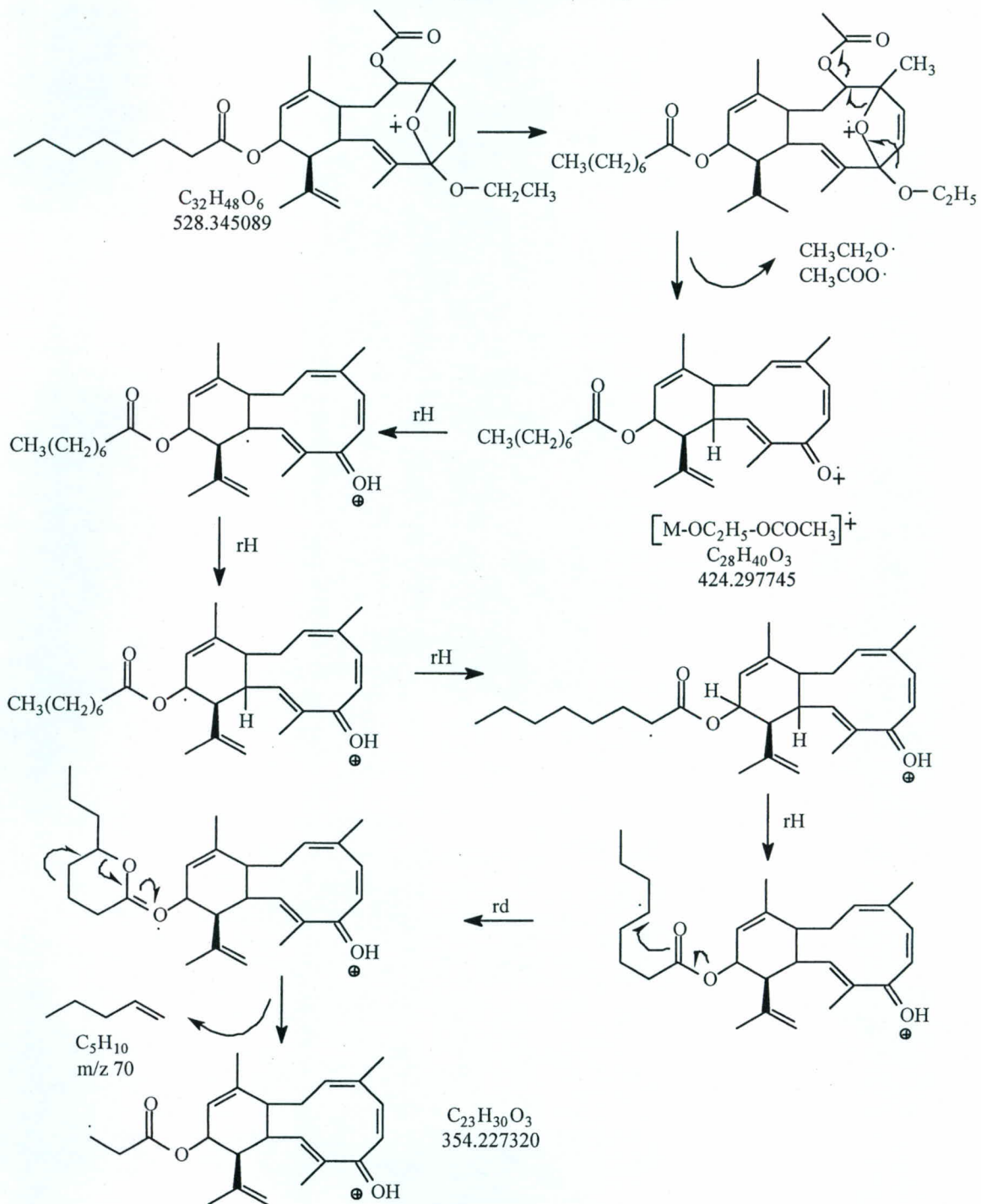
m/z→
Abundance

m/z→

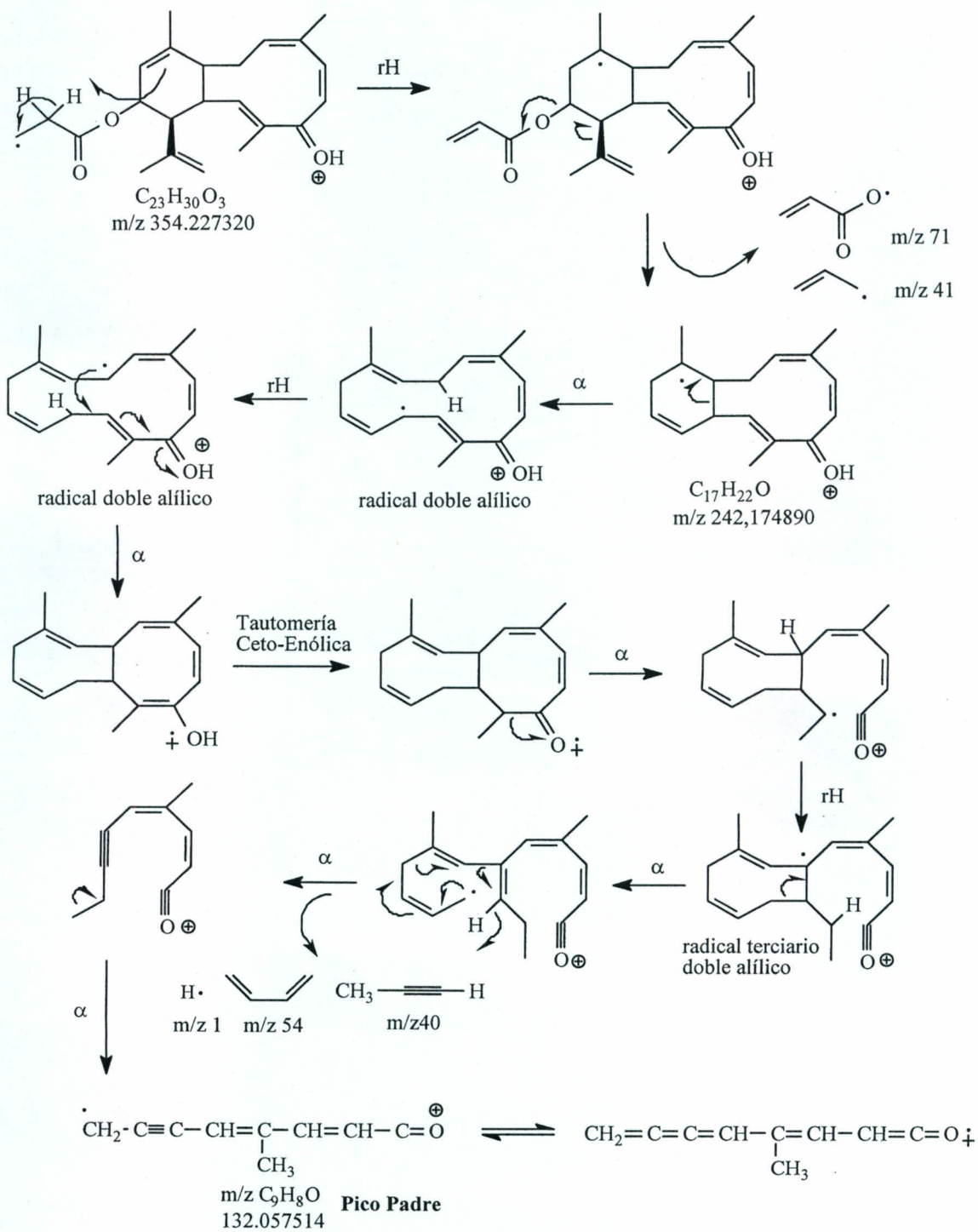
Espectro Base de Datos Wiley 275.1

Anexo 2
Propuesta de Mecanismo de Fragmentación del Espectro de Masa
de Impacto Electrónico de Caribaedictina 1.

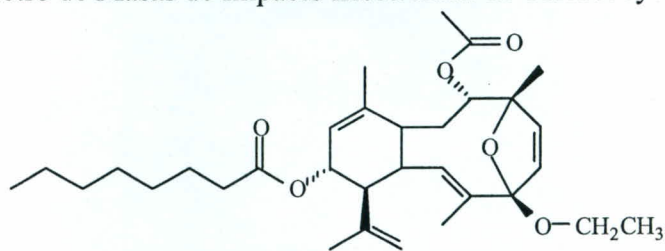
Mecanismo de Fragmentación de Caribaedictina 1
 Formación de Fragmentos a m/z 424 y m/z 354



Mecanismo de Fragmentación de Caribaedictina 1
Formación de Fragmentos a m/z 242 y m/z 132

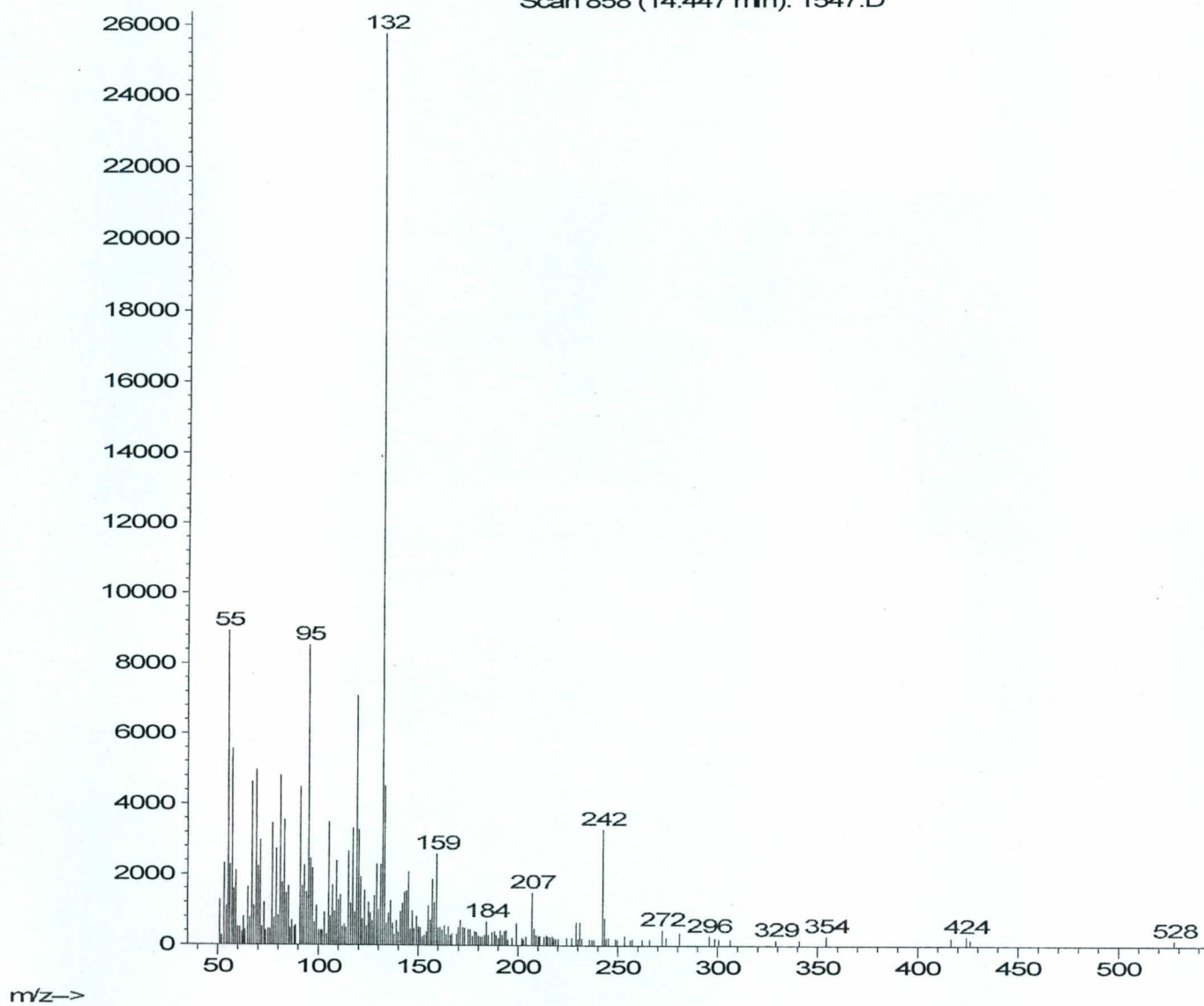


Espectro de Masas de Impacto Electrónico de Caribaedictina 1



Abundance

Scan 858 (14.447 min): 1547.D



Intensidad de los Picos en el Espectro de Masas de Caribaedictina 1

Pico No.	% de intensidad
132	100
159	15.52
207	5.59
242	18.01
354	7.58
424	7.45
528	6.83

Mecanismo de Fragmentación

El ion molecular de Caribaedictina 1 calculado en 528 umas e intensidad de 6.8% se descompone vía una reacción alfa en cascada en tres etapas para formar el catión-radical a m/z 424 (7.6%), correspondiente a la fragmentación $[M-OC_2H_5-OCOCH_3]$. Este tipo de reacciones es muy común en compuestos orgánicos al eliminarse los radicales libres estables etóxido y acetiloxi.

El ion-radical a m/z 424, sufre cuatro rearrreglos de Hidrógeno (rH) sucesivos, hasta formarse un catión-radical distónico, en el que el electrón libre se ubica en posición delta del grupo carboxilo del éster octanoico, formando una especie típica de ésteres alifáticos, en la que se prepara la molécula para una reacción de desplazamiento (rd), en la que se elimina una molécula neutra insaturada de C_5H_{10} .

Las especies formada vía los rearrreglos de Hidrógeno, son un radical alílico terciario, uno secundario alílico estabilizado por Oxígeno y uno alfa-carbonilo, especies cuya estabilidad *justifican su formación*.

El desplazamiento de Hidrógeno que sufre la especie distónica del carbonilo a m/z 424, se encuentra bien documentada (Lavanchy *et. al.* 1979 en la referencia 20), en la que se reorganiza el éster para formar un heterociclo oxigenado estable de 6 átomos, que se fragmenta vía típica reacción de desplazamiento alfa en cascada para generar el fragmento a m/z 354 (7.6%) para una composición de $C_{23}H_{30}O_3$.

Este catión-radical distónico, sufre reorganización de Hidrógeno con posterior reacción alfa en cascada, produciendo la eliminación de dos radicales libres estables; propenilo (C_3H_5 de m/z 41) y propenoxilo ($C_3H_3O_2$ de m/z 71), para formar un radical terciario a m/z 242 (18%) correspondiente a una composición de $C_{17}H_{22}O$.

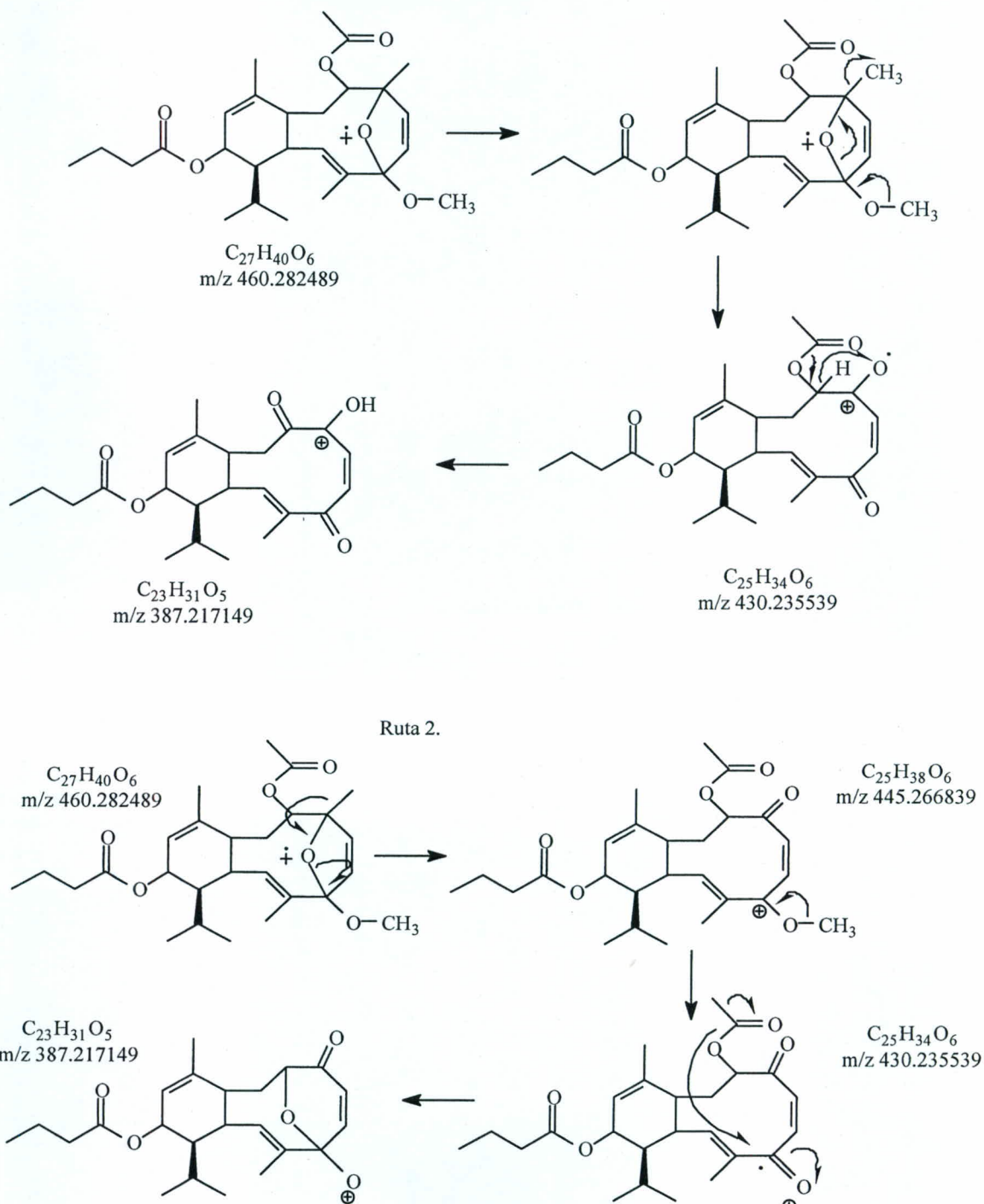
Este catión-radical distónico sufre una serie de descomposiciones hasta generar el pico base del espectro (100%), las que pueden resumirse así:

- Reacción alfa y reorganización de Hidrógeno para formar un radical doblemente alílico, que posteriormente sufre una reacción alfa y tautomería ceto-enólica para formar un catión-radical oxigenado.
- Este catión-radical sufre tres reacciones alfa sucesivas, en las que se genera un muy estable catión acilio doblemente conjugado, que luego de posterior reorganización de Hidrógeno, forma un radical terciario y doblemente alílico (además del catión alílico conjugado).
- Este catión-radical distónico sufre dos reacciones alfa sucesivas y pérdida de una molécula de 1,3-butadieno (C_4H_6 de m/z 54), una molécula de n-propino (C_3H_4 de m/z 40) y un radical de Hidrógeno (m/z 1) para formar el pico base (pico padre) del espectro (100%) de m/z 132 y composición C_9H_8O .

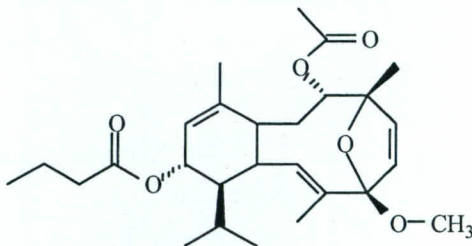
Anexo 3

Propuesta de Mecanismo de Fragmentación del Espectro de
Masa de Impacto Electrónico de Caribaedictina 2.

Mecanismo de Fragmentación de Caribaedictina 2
Formación de Fragmentos a m/z 445 y m/z 387

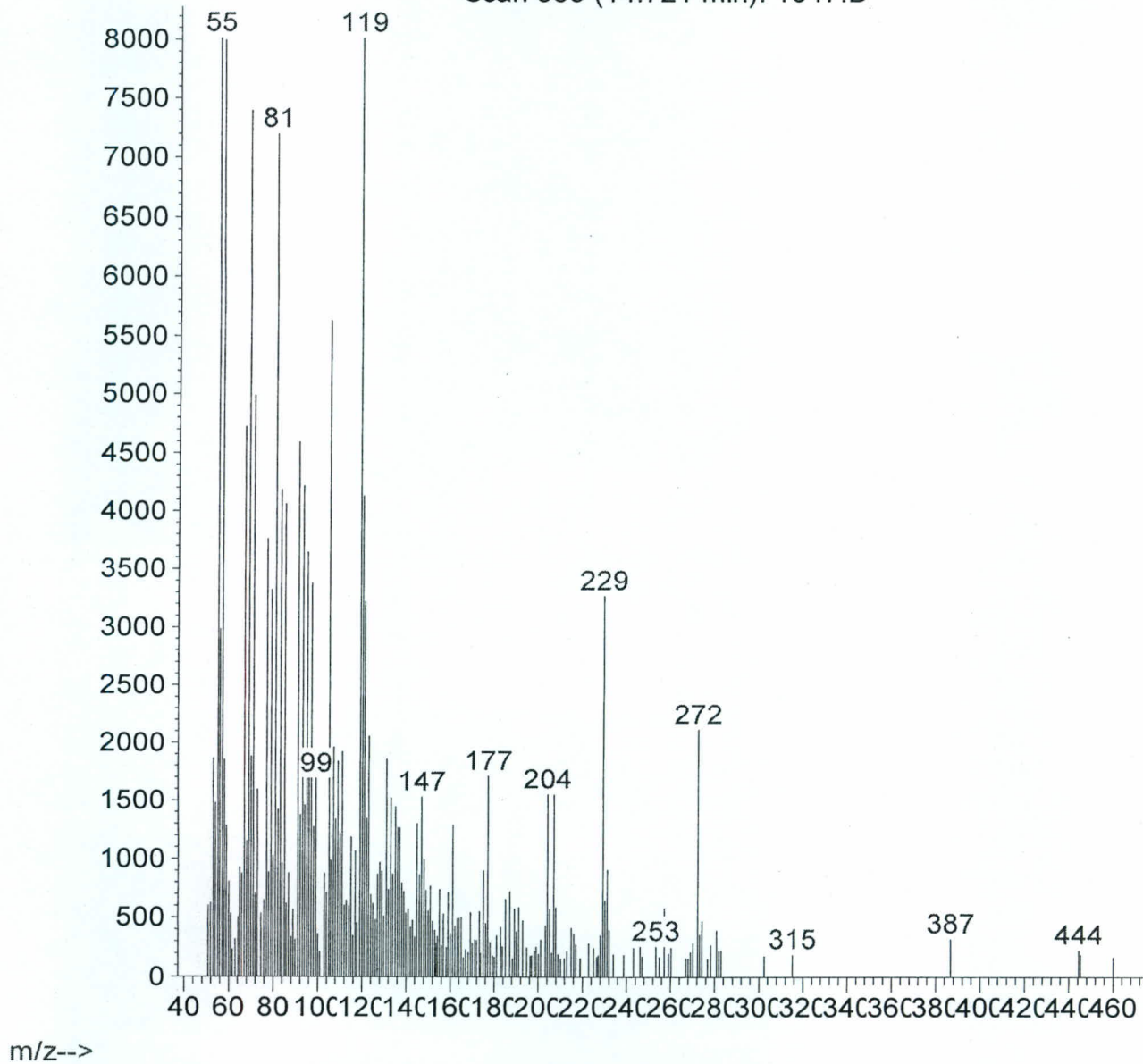


Espectro de Masas de Impacto Electrónico de Caribaedictina 2



Abundance

Scan 883 (14.721 min): 1547.D



Intensidad de los Picos en el Espectro de Masas de Caribaedictina 2

Pico No.	% de intensidad
99	42.15
119	100
147	19.35
177	21.29
204	19.35
229	40.64
272	26.45
315	2.74
387	3.87
444	2.58
445	1.95
460	1.93

Mecanismo de Fragmentación

Se proponen dos rutas de fragmentación del ion molecular de Caribaedictina 2 (460 umas e intensidad de 2%).

En la primera, se descompone vía una reacción alfa en cascada en dos etapas, para formar el catión-radical a m/z 430 (no observado), correspondiente a la fragmentación $[M-2CH_3]$.

La eliminación de este tipo de fragmentos estables es muy común en compuestos orgánicos y sucede muy rápidamente, por lo que puede explicarse el no observarse el fragmento a m/z 430, aunado al hecho de que el ion molecular es de muy baja intensidad.

Este fragmento sufre una posterior eliminación de un radical acilio (C_2H_3O de m/z 43), para generar el fragmento de fórmula $C_{23}H_{31}O_5$ de m/z 387 (4%), que es un carbocatión secundario alílico, estabilizado por Oxígeno y alfa a un grupo carbonilo.

En la segunda ruta de fragmentación propuesta, el ion molecular sufre una pérdida de metilo $[M-CH_3]$ vía dos reacciones alfa consecutivas para generar un carbocatión secundario, doblemente alílico y estabilizado por oxígeno con m/z 445 (2%) y fórmula molecular $C_{25}H_{38}O_6$.

La formación de este fragmento está fundamentada por los estudios de Zohorsky en 1982 (Referencia No. 20, pag 862).

Este fragmento sufre una posterior pérdida de un radical metilo para generar una cetona doblemente alfa-beta insaturada, quien mediante reacciones tres alfa en cascada genera el fragmento de m/z 387 (4%) de composición $C_{23}H_{31}O_5$ por pérdida de un grupo acilio.

De otros picos del Espectro de Masas, puede proponerse su origen como se muestra en la tabla siguiente:

m/z e intensidad	Origen
272 (26.5%)	$[315-C_2H_3O]$ Pérdida de acetato.
272 (26.5%)	$[387-C_2H_3O-C_4H_7O-H]$ Pérdida de acetato, butirato e Hidrógeno.
229 (40.6%)	$[272-C_3H_7]$ Pérdida de isopropilo.
229 (40.6%)	$[315-C_2H_3O]$ Pérdida de acetato.
177 (21.3%)	$[119+C_2H_3O+CH_3]$ Fragmento con la estructura del pico padre + el grupo acetilo y un grupo metilo.
119 (100%)	C_8H_7O Típico de cetonas cíclicas sustituidas.
99 (42%)	$[229-C_3H_7-C_4H_7O_2]$ Pérdida de acetato y butirato.

De esta tabla puede deducirse que la presencia de los grupos éster acetato y butirato es muy probable y que la estructura del pico padre es congruente con los fragmentos esperados en este tipo de metabolitos secundarios.



Leslie Patricia Velásquez López
Autora



Ph. D. Oscar Manuel Cobar Pinto
Asesor



Lcdá. Sully Margot Cruz Velásquez
Revisora



Licda. Lilian Irving Antillón, M.A.
Directora



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano