

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL ALGA *Penicillus capitatus Lamarck* Y EVALUACIÓN
DE SU POSIBLE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el Br. Alberto César Herrera
Hermoso, para optar al título de
Licenciado en Química.

Caracas, abril de 2009

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "**Estudio fitoquímico del alga *Penicillus capitatus Lamarck* y evaluación de su posible actividad antiinflamatoria**", presentado por el Br. Alberto César Herrera Hermoso, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Prof. Reinaldo Compagnone
(Director)

Prof. Carlos Márquez
(Jurado)

Prof. Dilsia Canelón
(Jurado)

RESUMEN

Se realizó el estudio fotoquímico del alga verde *Penicillus capitatus Lamarck*, y la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios aislados.

Las técnicas de separación utilizadas fueron la cromatografía en capa fina y cromatografía en columna (utilizando sílica gel y C₁₈ como fases estacionarias). Para la identificación de los metabolitos se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear de ¹H, ¹³C, DEPT, COSY y HSQC; espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojo. A partir del extracto de hexano se lograron aislar, purificar e identificar 3 compuestos. Dos de ellos tipo sulfoquinovosil diacil glicerol (con cadenas lipídicas saturadas de 16 y 18 átomos de carbono), no reportados para algas verdes, y un compuesto nuevo tipo digalactoglicerólípido. Del extracto hidrometanólico se lograron aislar 2 compuestos: uno de tipo amino éster, y otro cuya data espectroscópica coincidió con los compuestos 3-hidroxi-propanoato de etilo y el ácido 3-etoxi-propanóico.

El compuesto tipo sulfoquinovosil diacil glicerol con dos cadenas saturadas de 18 átomos de carbono, presentó una mayor actividad antiinflamatoria (IC₅₀ = 43.62 µg/mL) debido a que inhibió la producción de NO sin ser citotóxico.

AGRADECIMIENTOS

A la naturaleza, que ha permitido su estudio para buscar mejores caminos en el encuentro de soluciones a los problemas del hombre.

A mis padres, Julio Herrera y Mariela Hermoso, los artífices de la mayoría de mis éxitos, a ellos no sólo les debo la vida biológica, sino mi vida más sublime y espiritual, llena de una educación integral que me ha hecho un buen ser humano. Su formación ha sido indispensable. A mi familia, que con su amor y cariño, además de la inculcación de ideales del hombre nuevo; han hecho de mi un ser amante de la vida y solidario.

Al Profe Reinaldo Compagnone, que me permitió llegar a su laboratorio y hacer un trabajo arduo en la realización de esta tesis; permitiéndome hacer nuevos planteamientos, y así contrubuir a la búsqueda de nuevos horizontes en cuanto al estudio de la química se refiere.

A Jacqueline, que con su más profundo amor llenó mi vida de nuevos colores y me apoyó en los momentos más difíciles y más alegres. A mis hermanos de la vida Joseph, Alberto, Benjamín y Eloy; con su ayuda y apoyo hicieron posible la realización de este trabajo.

A mis amigos: Maria Alejandra, Fabiola, Janeth, Neydher, Jessica, Jesús, Ana Javier, Héctor; que siempre fueron apoyo y prestaron sus manos (izquierda y derecha) en el momento oportuno.

A los profesores: Pedro Sojo, Alírica Suárez, Beth, Dilsia Canelón, Ledezma (José Jiménez), María Rodríguez, Carlos Márquez; y demás profesores que tuvieron una influencia en mi y que serán ejemplo del comportamiento profesional.

A la música, la mayor y mejor de las artes, que me enseñó, enseña y enseñará a ver el mundo de distintas formas, siempre moldeando en mi un pensamiento sensible y hasta sublime que me ha hecho comprender parte de la vida del ser humano.

A todos muchas gracias! Espero seguir cosechando éxitos, como los que he logrado hasta ahora.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1. Las Algas	1
I.2. Clasificación de Algas	2
I.2.1. Bacilarofitas	3
I.2.2. Crisofitas	3
I.2.3. Feofitas	3
I.2.4. Rodofitas	4
I.2.5. Clorofitas	4
I.3. Metabolitos secundarios de algas marinas	6
I.3.1. Bromo-fenoles	6
I.3.2. Heterociclos con Nitrógeno	7
I.3.3. Esteroles	7
I.3.4. Polisacáridos	9
I.4. Otros metabolitos secundarios aislados de organismos marinos	10
I.5. Especie <i>Penicillus capitatus</i>	13
I.5.1. Descripción de la especie	13
I.6. Metabolitos Secundarios del Género <i>Penicillus</i>	14
I.7. Inflamación	17
I.7.1. Fases de la Inflamación	17
I.7.1.1. Fase 1: Liberación de los mediadores	17
I.7.1.2. Fase 2: Efecto de los mediadores	18
I.7.1.3. Fase 3: Llegada de las moléculas y células	
inmunes al foco inflamatorio	19
I.7.1.4. Fase 4: Regulación de la respuesta antiinflamatoria	21
I.7.1.5. Fase 5: Reparación	22

I.8. Metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria, extraídos de algas marinas	24
I.8.1. Polisacáridos	25
I.8.2. Ácidos Grasos	26
I.8.3. Fenoles	28
I.8.4. Péptidos	29
I.9. Justificación	30
I.10. Objetivos	31
I.10.1. Objetivo General	31
I.10.2. Objetivos Específicos	31
II.- PARTE EXPERIMENTAL	32
II.1. Materiales, reactivos y equipos	32
II.1.1. Soportes cromatográficos	32
II.1.2. Solventes y reactivos	32
II.1.3. Equipos	33
II.2. Recolección e identificación del alga <i>Penicillus capitatus</i>	34
II.3. Procedimiento experimental	35
II.3.1. Obtención de los extractos del alga <i>Penicillus capitatus</i> .	34
II.3.1.1. Extracto de Hexano Pch	38
II.3.1.1.1. Purificación de la fracción Pch0	40
II.3.1.1.2. Estudio de la fracción Pch10	40
II.3.1.1.3. Estudio de la fracción Pch11	41
II.3.1.2. Extracto Hidrometanólico	42
II.3.1.2.1. Estudio de la fracción PcAM1	43
II.3.1.2.2. Estudio de las fracciones PcAM3 y PcAM4	43
II.4. Ensayos biológicos	45
II.4.1 Ensayo para medir la inhibición de la producción de oxido nítrico en cultivo celular de Macrófagos Murinos RAW 264.7	45

II.4.2 Ensayo de viabilidad sobre cultivos celulares de Macrófagos Murinos RAW 264.7 (Método de MTT)	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
III.1. Elucidación del Compuesto 1	53
III.2. Elucidación del Compuesto 2	57
III.3. Elucidación del Compuesto 3	60
III.4. Elucidación del Compuesto 4	62
III.5. Elucidación del Compuesto 5	65
III.6. Resultados y discusión de las pruebas biológicas	68
IV. CONCLUSIONES	73
V. RECOMENDACIONES	74
VI. BIBLIOGRAFÍA	75
VII. ANEXOS	80
VIII. GLOSARIO DE TÉRMINOS	106

I.- INTRODUCCIÓN.

Desde el principio de la humanidad, el hombre ha descubierto la capacidad que tienen algunos metabolitos de plantas y animales, de ser agentes terapéuticos. Gracias al empleo del conocimiento de las propiedades de los productos naturales, se encontraron los primeros sedantes, antidiarreicos, antipiréticos, entre otros.

Los productos naturales marinos han atraído la atención de biólogos y químicos del mundo por más de 5 décadas. Hasta la fecha se han aislado aproximadamente 16.000 productos a partir de organismos marinos, y se han reportado en cerca de 6.800 publicaciones. En adición a éstas, existen otras publicaciones que cubren síntesis, revisiones, estudios de actividad biológica, estudios ecológicos, etc., en el tema de productos naturales marinos ^[1].

I.1. Las algas ^{[2], [3]}

Las algas son organismos acuáticos de carácter autótrofos, que incluyen un amplio grupo de especies de vida acuática, que capturan energía solar a través de la fotosíntesis, usándola para convertir sustancias inorgánicas en materia orgánica. Las algas, en general, tienen una estructura relativamente simple; pueden ser unicelulares, un filamento de células, una placa de células o un cuerpo sólido que puede comenzar a aproximarse a la complejidad del cuerpo de una planta. Las algas macroscópicas a pesar de su variedad presentan características morfológicas comunes:

1. Todas parecen fijadas al sustrato por medio de rizoides, similares a las raíces de las plantas, pero cuya función es únicamente fijar la planta ya que no toman nutrientes. En ocasiones estos rizoides son sustituidos por un disco basal de fijación, como es el caso del sargazo.

2. Tras la estructura de fijación hay una estirpe más o menos larga que puede medir desde unos pocos milímetros hasta alcanzar un par de metros de longitud en las laminarias.
3. La parte más visible del alga es la lámina, que puede adoptar diversas formas: filamentosa, hueca, comprimidas y delgadas, gruesas, incrustantes no calcificadas e incrustantes calcificadas.

Si bien la mayor parte de las algas son fotosintéticas como las plantas, no se le consideran plantas porque carecen de muchas estructuras vegetales como raíces, tallos, hojas especializadas y vascularidad.

Las algas macroscópicas presentan adaptaciones que les permiten vivir en aguas poco profundas a lo largo de las costas, donde se acumulan, habitualmente, muchos nutrientes; también sobreviven en estanques de agua dulce, lagos, ríos, manantiales de aguas termales, hielo polar, suelo húmedo, entre otros.

I.2. Clasificación de las algas ^[3]

Las algas pertenecen al reino protista, que se define como el reino que involucra todos aquellos organismos eucariotas que no son vegetales, ni animales ni hongos.

En principio, los nombres de algunas divisiones de algas derivaban de los colores de los pigmentos dominantes, que enmascaran al verde brillante de las clorofilas. Al aumentar el número de las divisiones, otros caracteres fueron usados para darles su nombre. La gran variedad de pigmentos que se encuentran en los cloroplastos de las distintas divisiones de algas, sugiere que antes del desarrollo de las células eucariotas existían diferentes tipos de procariotas productores de oxígeno. Luego, las distintas divisiones de algas podrían haber evolucionado como resultado de las relaciones simbióticas con los diferentes procariotas fotosintéticos, los que posteriormente habrían originado los actuales cloroplastos.

Las algas no constituyen un grupo natural dentro de los protistas sino que son un grupo polifilético. A continuación se describen las características fundamentales de los principales grupos de algas:

I.2.1. Bacilariofitas:

Las diatomeas son algas unicelulares, aunque a veces forman filamentos simples o colonias. En sus cloroplastos contienen *clorofila A y C*, *beta-caroteno* y *xantofilas*, los cuales le confieren una coloración pardo-dorada. Todas almacenan sus reservas como *crisolaminarina* (un carbohidrato) y aceites. Son un componente muy importante del fitoplancton oceánico y constituyen una fuente importante de alimento para los animales marinos.

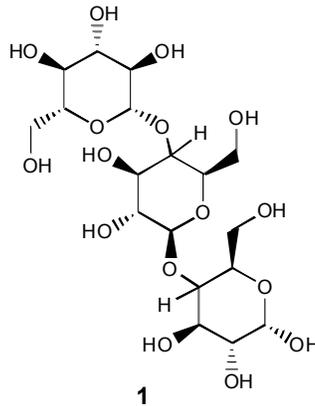
I.2.2. Crisofitas:

Entre los protistas unicelulares, las algas doradas son las que muestran una mayor tendencia a formar colonias multicelulares. Sin embargo, a pesar de la complejidad que estas colonias puedan alcanzar, cada una de sus células mantiene las características típicas del grupo que permite identificarlas fácilmente. Entre estas características se puede mencionar: pueden o no tener flagelos; sus cloroplastos contienen *clorofilas A y B*, pero su color verde está enmascarado por la fucoxantina que le da su característica tonalidad dorada.

I.2.3. Feofitas:

La mayoría de las algas marinas de las regiones templadas y de las costas rocosas de las regiones más frías del mundo pertenecen a este grupo, en el que muy pocas son de agua dulce. Las algas pardas o feofitas contienen clorofilas A y C, y flucoxantina que, al igual que en las crisofitas, es el principal derivado carotenoide que les da su color. En general, almacenan como sustancia de reserva un polisacárido

inusual llamado lamiranina (**1**), y a veces aceites, pero nunca almacenan almidón, como lo hacen algunas algas verdes y las plantas. Sus paredes celulares contienen celulosa.



I.2.4. Rodofitas:

La mayoría de las algas marinas son de color rojo. Se encuentran más comúnmente en las aguas cálidas y menos del 2% de las especies habitan aguas continentales. Habitualmente crecen adheridas a rocas o a otras algas. Su color indica que absorben la luz azul, la luz con más penetración en el agua. Esto le permite vivir a mayores profundidades que otras algas. Las algas rojas contienen diferentes pigmentos: clorofila A, carotenoides, y también ficobiliproteínas, la azulada ficocianina y la rojiza ficoeritrina, que les dan colores distintivos. El producto de la fotosíntesis es un polisacárido sólido llamado almidón florideo.

I.2.5. Clorofitas:

Constituyen uno de los grupos de algas más diversos. Aunque la mayoría son acuáticas, algunas aparecen en una gran variedad de hábitat, incluyendo la superficie de la nieve y los troncos de los árboles; también se encuentran como simbioentes en distintos organismos. Existen algas verdes unicelulares y microscópicas 15 y 20 μm , y otras de mayor tamaño que van de 25 cm a 8 m. Estas algas contienen clorofilas A y B

y beta-caroteno como pigmentos fotosintéticos y almacenan alimento en forma de almidón.

Cerca de 30.000 especies de algas se han encontrado alrededor del mundo en sitios donde sólo se necesita luz y humedad. Las algas, junto con las plantas, son las encargadas de dar oxígeno a la biosfera, son una fuente de alimento, y se han encontrado usos medicinales y como fertilizantes. En la tabla 1 se puede observar la clasificación de algunas algas de interés.

Tabla 1. Clasificación de las Algas

Reino	Phylum	Algunas clases de interés
Procariota	Cyanobacterias	Cyanophyta (Algas verde azuladas)
	Chloroxybacterias	
Eucariota	Glaucophyta	
	Rodophyta	Rodophyta (Algas rojas)
	Heterokontophyta	Chrysophyceae (algas doradas) y Phaeophyceae (algas pardas)
	Haptophyta	
	Cryptophyta	
	Dinophyta	
	Euglenophyta	
	Chlotatachniophyta	
	Chlorophyta	Chlorophyta (algas verdes)

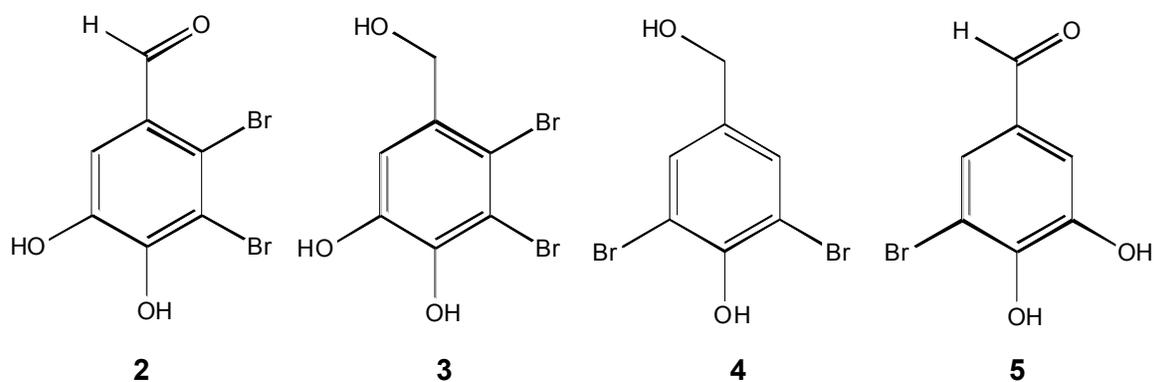
A continuación se presentan algunos metabolitos secundarios importantes aislados de algas marinas:

I.3. Metabolitos secundarios de las algas marinas ^[1]

Se han realizado muchos trabajos sobre los metabolitos secundarios de las algas marinas. Existen reportados trabajos sobre: aminoácidos, derivados de guanidina, fenoles, carotenoides, diterpenoides, polímeros bioactivos, compuestos halogenados y biosíntesis de los metabolitos.

I.3.1. Bromo-fenoles:

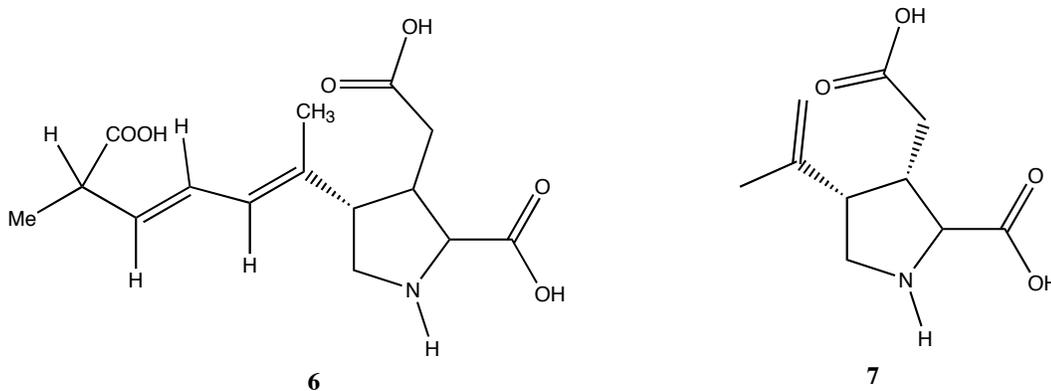
Las algas verdes, rojas y pardas; han sido analizadas extensivamente para detectar actividad antibacteriana y fungicida. Los compuestos activos aislados de *Symphocladia gracilis*, *Rhodomela larix* y *Polysiphonia lanosa* fueron: 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibenzaldehído (**2**), alcohol 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibencílico (**3**), alcohol 3,5-dibromo-p-hidroxibencílico (**4**) y el 5-bromo-3,4-dihidroxibenzaldehído (**5**).



No mucho se sabe sobre el mecanismo de biosíntesis, pero se presume que los bromofenoles se forman a través de la vía del shikimato. Su actividad biológica indica que pueden tener un rol importante en la regulación de los epifitos y los endofitos.

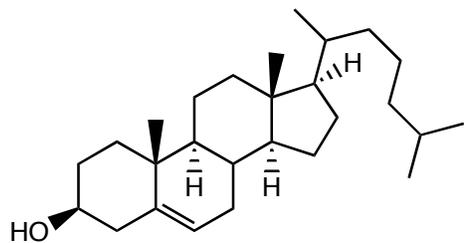
I.3.2. Heterociclos con Nitrógeno:

De las algas marinas se han obtenido compuestos que contienen nitrógeno formando un heterociclo. De estos, los más interesantes, debido a su potente actividad frente a la ascariasis y su novedosa estructura química, son el ácido domóico (**6**), aislado del alga *Chondria armata* y el ácido kaínico (**7**), aislado del alga *Digenea simplex*.

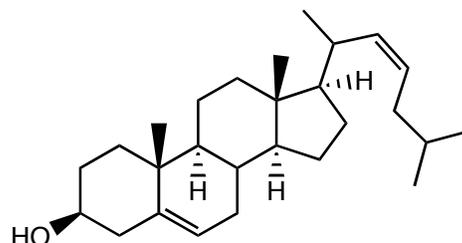


I.3.3. Esteroles:

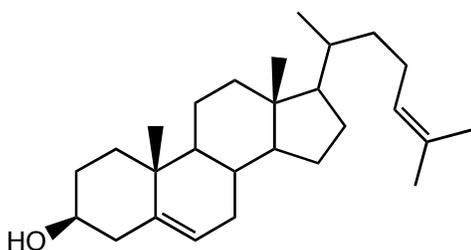
Se han encontrado varios esteroles en algas, como *Rhodymenia palmata*, *Porphyra purpurea*, *P. umbilicalis* y *Halosaccion ramentaceum*. Entre los más importantes están el colesterol (**8**), el 22-deshidrocolesterol (**9**), el demosterol (**10**), el fucosterol (**11**), el condilasterol (**12**) y el poriferasterol (**13**)



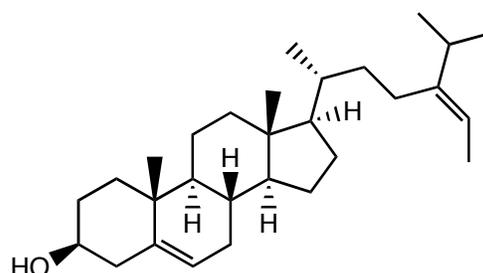
8



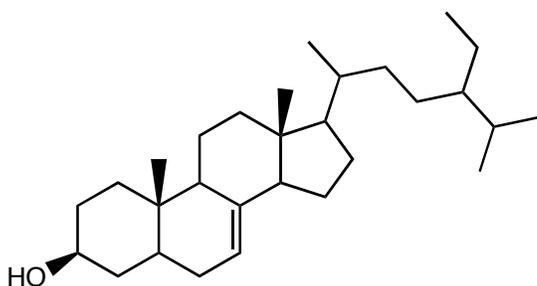
9



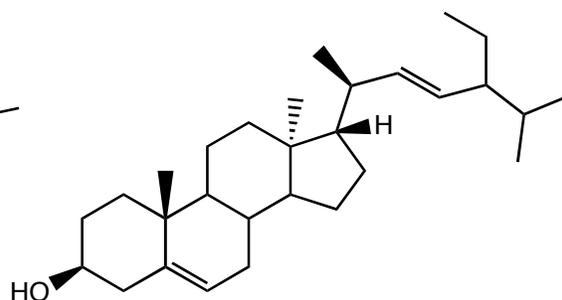
10



11



12



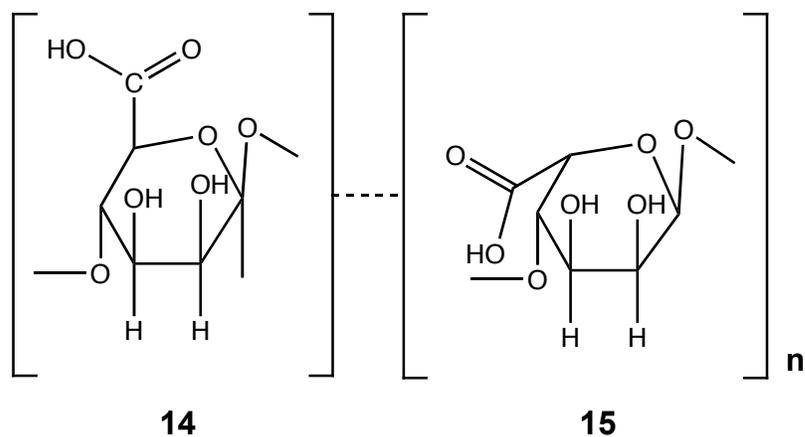
13

Reportes de los esteroides indican que, generalmente, tienen una baja toxicidad y tienen la habilidad de reducir el nivel de colesterol en la sangre. También se reporta que reduce la tendencia a formar deposiciones de grasa en el corazón ^[4].

I.3.4. Polisacáridos:

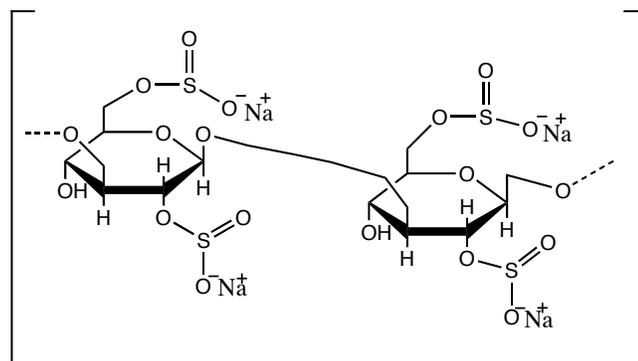
Este tipo de compuestos obtenidos a partir de algas, son económicamente uno de los más importantes debido a su extenso uso en alimentos y en medicina.

Entre los más importantes se tiene el ácido algínico, obtenido de algas pardas, a partir de las generos de *Fucus* y *Macrocystis*. Está conformado por dos monómeros: ácido d-manurónico (**14**) y el ácido l-gulurónico (**15**). Están enlazados a través de una cadena β -1,4-glicosídica.



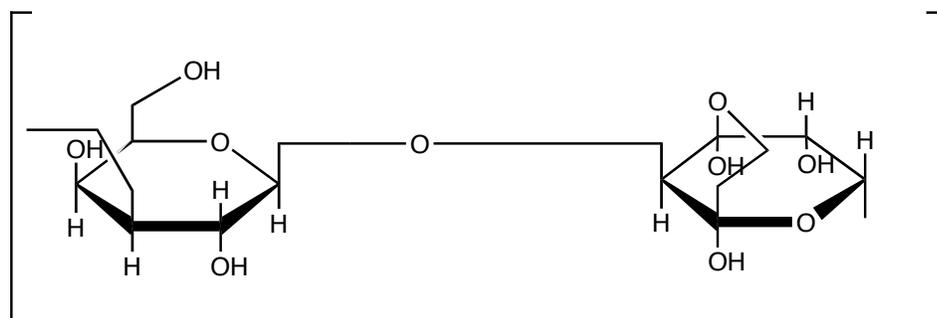
La propiedad más importante de este compuesto es la habilidad de remover estroncio (contaminante), sin comprometer la cantidad de Ca, Na o K en el cuerpo.

Existen otros polisacáridos como el sulfato de laminarin (**16**), aislado del alga *Laminaria clustoni*, que tienen una gran estabilidad y una muy buena actividad anticoagulante.



16

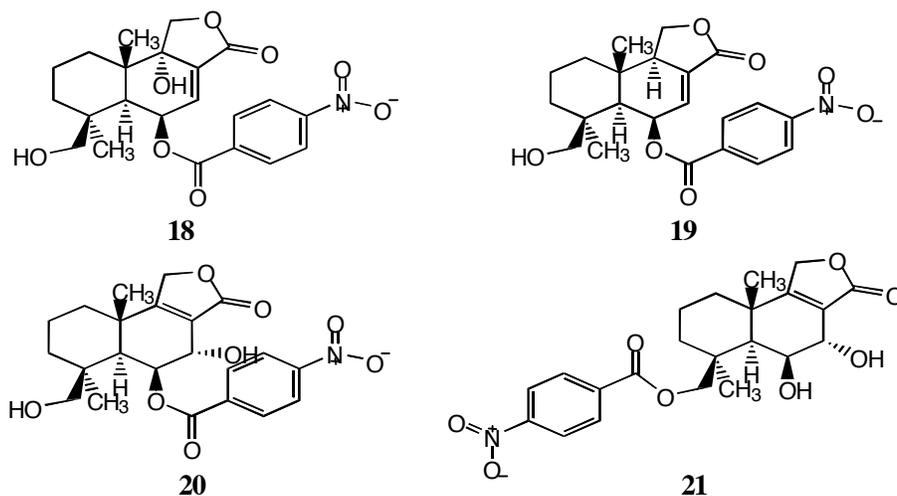
Las algas rojas son fuente importante de agarosa (**17**), cuyo uso es muy importante en estudios biomédicos y en inmunología.



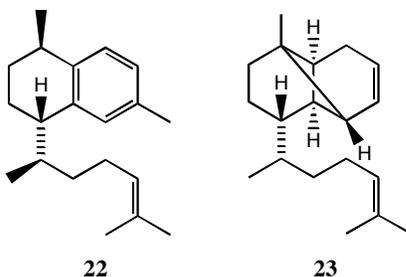
17

I.4. Otros Metabolitos Secundarios aislados de organismos marinos:

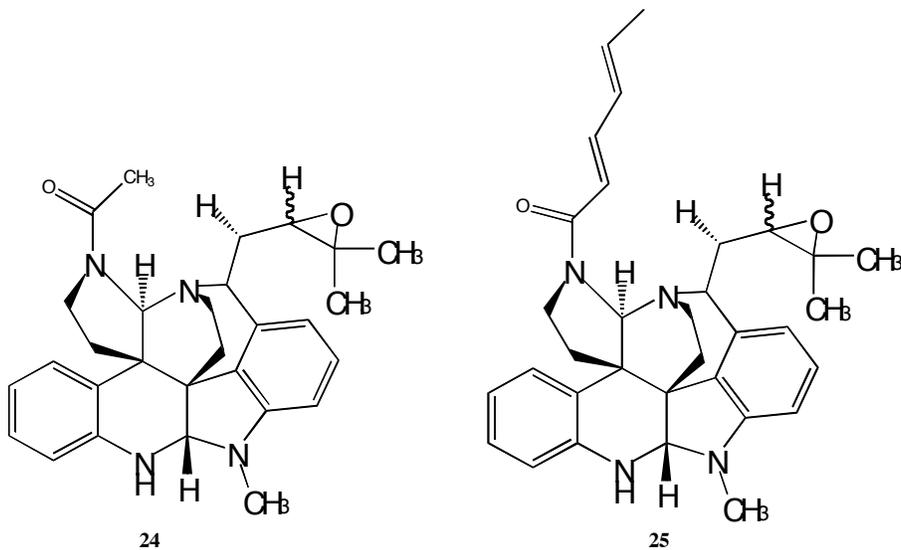
Cuatro nuevos sesquiterpenoides del tipo éster nitrobenzoilo (**18**, **19**, **20** y **21**), se aislaron de extractos orgánicos del cultivo del hongo *Aspergillus versicolor*, aislado de la superficie del alga *Penicillus capitatus*. Presentaron una citotoxicidad significativa en células HCT – 116, de cancer de colon en humanos.^[5]



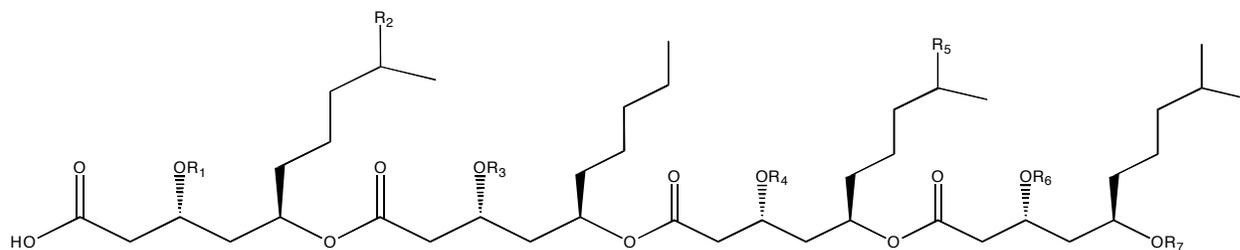
Se obtuvieron 2 nuevos compuestos tipo Diterpenoide: ent-erogorgiaene (**22**) y el (+)-1,5-ciclo-5,8,9,10-tetrahydroerogorgiaene (**23**), a partir del alga parda *Dictyota dichotoma*. En adición, se obtuvo el pentadecano por primera vez encontrado en esta alga. Se probó la citotoxicidad frente a células cancerígenas humanas de varios tipos, y en células epiteliales en ratones JB6 Cl 41. Los compuestos mostraron una moderada actividad frente distintas células cancerígenas y una actividad significativamente menor frente a las células de ratón.^[6]



Se encontraron metabolitos citotóxicos, communesinas A (**24**) y B (**25**), activos contra el cultivo de células tipo P-388; del hongo *Penicillium sp.* a partir del alga marina *Enteromorpha intestinalis*.^[7]



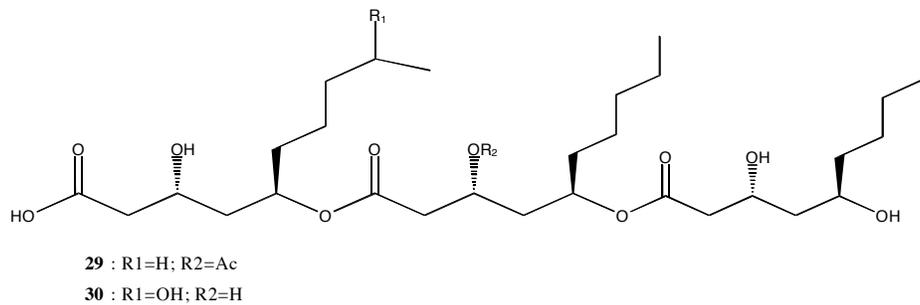
También se han encontrado sustancias antimacroalga producidas por los hongos *Fusarium sp.* y *Acremonium sp.* Ambos hongos fueron extraídos del alga marina *Halymenia dilatata* y produjeron los compuestos halimecinas A (**26**), B (**27**), C (**29**); para el hongo *Fusarium sp.* y halimecinas D (**28**) y E (**30**) para el hongo *Acremonium sp.*^[8]



26 : R1=H; R2=H; R3=Ac; R4=H; R5=H; R6=H; R7=H

27 : R1=H; R2=H; R3=Ac; R4=H; R5=H; R6= β -D-manosil; R7=H

28 : R1=H; R2=OH; R3=H; R4=H; R5=OH; R6=H; R7=H



Las algas marinas del orden de las Caulerpales son miembros importantes del hábitat de los arrecifes tropicales, y se ha demostrado que son de muy baja preferencia en la dieta de los herbívoros que habitan junto a ellas^{[9],[10]}. Investigaciones previas proveen evidencia de que algas de este grupo producen metabolitos secundarios biológicamente activos^{[11] - [20]}. Un ejemplo de este tipo de algas es la especie *Penicillus capitatus*

I.5. Especie *Penicillus capitatus*^[21]

Penicillus es un género de las algas marinas muy común en las aguas del caribe. Se encuentran en camas de grama de mar y arena junto con Halimedas y Udoteas. *Penicillus* pertenece a la familia de las Udoteaceae, y al orden de las Caulerpales

I.5.1 Descripción de la especie:

Está formada por un cuerpo erecto de alrededor de 15 cm, que consiste de las siguientes partes principalmente: un talo de 10 cm; una especie de cabeza de flor, llamada capitulum, de unos 5 cm que parece estar incrustada en el talo; y unos rizoides largos y bulbosos de sífonos con arena adherente. Las paredes de los sífonos están compuestas principalmente de β - 1,3 xilano, en vez de celulosa. El capitulum se produce por sucesivas uniones de di-(tri)-chotomias que se dan en diferentes planos;

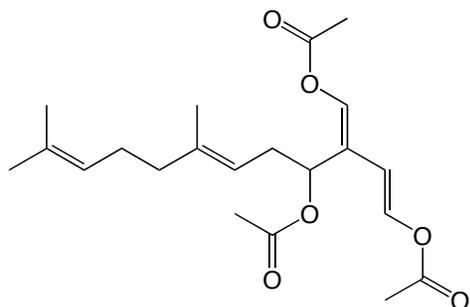
en algunas especies los sifones capitulares están regularmente comprimidos. Los sifones de la base del capitulum, delimitan, por el desarrollo de pequeñas ramas radiales, un grupo de sifones medulares y una corteza simple. En la Figura 1, se muestra una fotografía del hábitat del alga *Penicillus capitatus*.



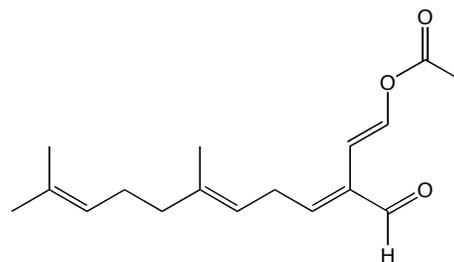
Figura 1: Fotografía del alga marina *Penicillus capitatus*

I.6 Metabolitos Secundarios del género *Penicillus*:

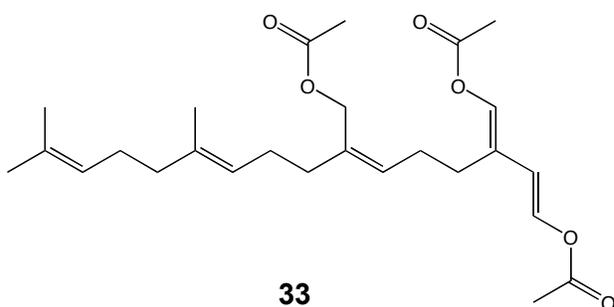
Se han encontrado los siguientes metabolitos secundarios tipo terpenoides lineales, biológicamente activos (inhibidores de actividad microbiana) ^[22] para el género *Penicillus*: un triacetato (**31**) y un aldehído (**32**) para la especie *Penicillus capitatus*; y un diterpeno triacetato (**33**), dihidroudoteal (**34**) y diterpenoides (**35 y 36**) para la especie *Penicillus dumetosus*.



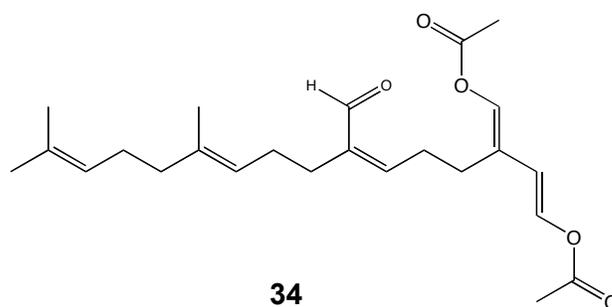
31



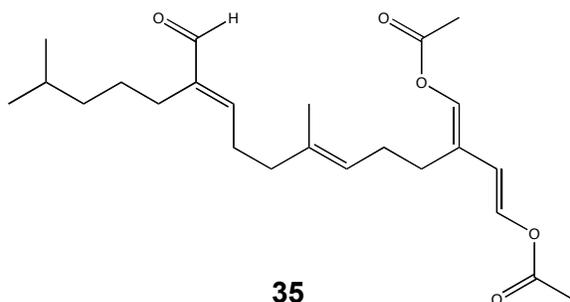
32



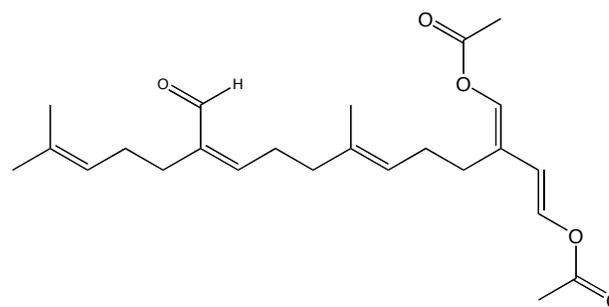
33



34

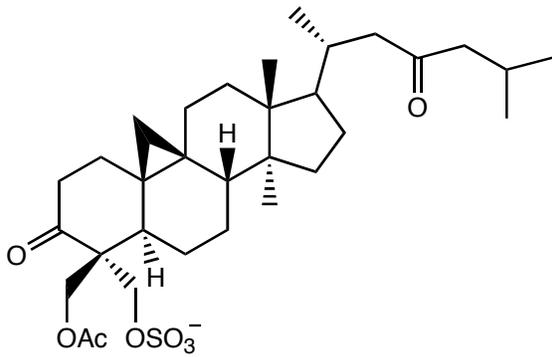


35

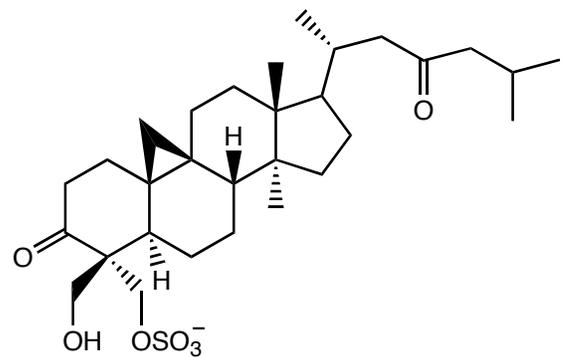


36

Otros metabolitos secundarios, como las capisteronas A (**37**) y B (**38**) se han aislado del alga *Penicillus capitatus*. Se demostró que dichos metabolitos secundarios tienen una potente inhibición del patógeno marino *Lindra thalassiae*^[23]. Otro estudio indicó una buena actividad como inhibidoras de excreción celular lo que hace más eficiente la acción antimicótica del fluconazol.^[24]



37



38

También se aisló la enzima bromoperoxidasa del alga marina *Penicillus capitatus*. Se ha propuesto que esta enzima juega un importante papel en la formación de metabolitos halogenados^{[25],[26]} y en la catálisis de la formación de nitrilos en el ambiente marino^[27].

Los estudios anteriormente mencionados muestran una actividad importante de los metabolitos hallados a partir del alga marina *Penicillus capitatus*, pero ninguno refleja la actividad antiinflamatoria de alguno de esos metabolitos; por esto se estudiará la posible actividad antiinflamatoria de los metabolitos aislados de los extractos de esta alga.

El alga *Penicillus capitatus* pertenece al orden de las Caulerpales familia de las Udoteaceae y al phylum de las Clorofita. Con el fin de realizar el análisis fotoquímico y medir su actividad antiinflamatoria, se estudiará dicha alga verde debido a los pocos antecedentes encontrados, su presencia en las costas venezolanas y su potencial actividad biológica.

I.7. Inflamación

La inflamación es un proceso inmunológico que se caracteriza por la presencia de una serie de *síntomas cardinales*. Se trata de una respuesta inespecífica frente a agresiones externas, y esta es generada por los agentes inflamatorios. El mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirija erróneamente hacia agentes no dañinos u órganos sanos, de manera que provoque lesión en tejidos ^{[28]-[31]}

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. Como se verá posteriormente, el calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y cúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor ^[32].

I.7.1. Fases de la inflamación ^[31]

I.7.1.1. Fase 1: Liberación de los mediadores

En esta primera fase de la inflamación se liberan moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos. Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito. Esta es una célula inmune inespecífica que procede de la médula ósea, aunque los mecanismos de su diferenciación no son bien conocidos. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados. Los mastocitos se detectan en casi todos los tejidos, siendo localizados principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados.

Los mecanismos bioquímicos que llevan a cabo este proceso no son aún bien conocidos. Se cree que el proceso se inicia en la membrana con activación de

adenilato-ciclasa y de fosfolipasa A2. La adenilato-ciclasa determina un incremento inicial de la concentración intracitoplasmática de cAMP, mientras que la fosfolipasa ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico. También aumenta la permeabilidad de membrana al Ca^{2+} , con lo que se incrementa la concentración de este ión en el citoplasma. El aumento de la concentración de Ca^{2+} y el del cAMP determinan la formación de microtúbulos en el mastocito, así como el movimiento de gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular, produciéndose posteriormente la fusión de los gránulos con ésta y la liberación de mediadores al espacio extracelular. Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A, eosinophil chemotactic factor), factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF, neutrophil chemotactic factor) y heparina.

El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclo-oxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT). Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación.

I.7.1.2. Fase 2: Efecto de los mediadores

En esta segunda fase se liberan los mediadores, provocando alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de las moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.

Entre los mediadores se pueden distinguir dos tipos: los preformados y los sintetizados *de novo*. Entre los del primer grupo se encuentra la histamina, las enzimas proteolíticas, los factores quimiotácticos y la heparina. La histamina es un mediador que produce vasodilatación e incremento de permeabilidad actuando en los receptores H1.

La más importante de las enzimas proteolíticas es la kininogenasa, que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre, produciendo su ruptura en péptidos más pequeñas llamados kininas. Estas últimas producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.

Los factores quimiotácticos son moléculas de alto peso molecular, capaces de activar los eosinófilos y neutrófilos.

La heparina inhibe la coagulación, favoreciendo la llegada al foco inflamatorio de moléculas y células desde la sangre.

En el grupo de los sintetizados "*in novo*" están los siguientes mediadores: PGE₂, LTB₄ y el factor activador de plaquetas. La PGE₂ es la prostaglandina más importante en el proceso inflamatorio, produciendo vasodilatación y dolor. El LTB₄ es un factor quimiotáctico para eosinófilos, mastocitos y macrófagos. Por último, el factor activador de plaquetas activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Produce también, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.

I.7.1.3. Fase 3: Llegada de las moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Los mediadores de la inflamación producen dos efectos. En una primera fase, alteraciones vasculares que facilitan el trasvase de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En la segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedente de la sangre y de los tejidos circundantes. A continuación se describe más detalladamente el proceso de la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.

- **Fase inicial. Llegada de moléculas**

En esta primera etapa llegan las inmunoglobinas (Ig), que son anticuerpos que al unirse bloquean el germen y sus toxinas. La función de las inmunoglobinas es activar una célula denominada complemento y a su vez potenciar la fagocitosis, al unirse a los receptores que presentan los fagocitos.

La activación del complemento también puede ocurrir por otra vía, debido a los productos liberados directamente por el germen. Los factores del complemento C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis.

- **Fase tardía. Llegada de células**

Entre las células que llegan en esta fase está el basófilo que, junto con el mastocito, contribuye a la liberación de los mediadores.

Por otro lado, el neutrófilo es de las primeras células en llegar al foco inflamatorio, eliminando al germen mediante la fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos.

Más tardíamente, llegan el monocito y macrófago, procedente de la sangre y de los tejidos cercanos, respectivamente. El monocito presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo.

El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la interleucina 1 (IL-1), que es una auténtica hormona del sistema inmune, ya que pasando a la sangre produce efectos sobre distintas partes del organismo. Determina la aparición de fiebre, probablemente

induciendo la síntesis de PGE en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la PGE actúa sobre el centro termorregulador.

Los linfocitos T y B, potenciados por el macrófago, inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan inmunoglobinas, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada.

I.7.1.4. Fase 4: Regulación de la respuesta inflamatoria

Como la gran mayoría de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando una respuesta exagerada o perjudicial. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, logrando un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria.

Entre los factores que intervienen en esta regulación esta la histamina, actuando sobre los receptores H₂, induce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores, inhibe la actividad del neutrófilo, inhibe la quimiotaxis y activa las células T supresoras. La PGE produce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores y sobre los linfocitos una inhibición de la proliferación y diferenciación. Otro factor es la heparina que también inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento. Por último está el eosinófilo, que acude al foco inflamatorio donde libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciándose de la inflamación.

I.7.1.5. Fase 5: Reparación

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida.

No se conocen bien los mediadores responsables de estos fenómenos, parece ser que la IL-1 (una citocina denominada interleucina-1) es la responsable de la activación de los fibroblastos. En la figura 2 se observa la biosíntesis del óxido nítrico como parte del proceso de liberación de mediadores en el proceso inflamatorio.

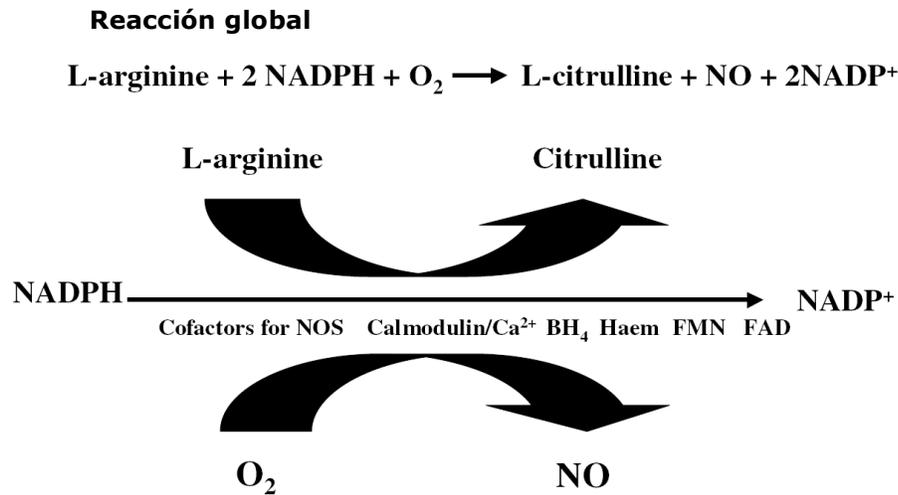


Figura 2. Biosíntesis del óxido nítrico

En la tabla 2 se describen otros mediadores involucrados en el proceso inflamatorio, y el efecto que tienen en el organismo.

Tabla 2. Algunos mediadores presentes del proceso inflamatorio

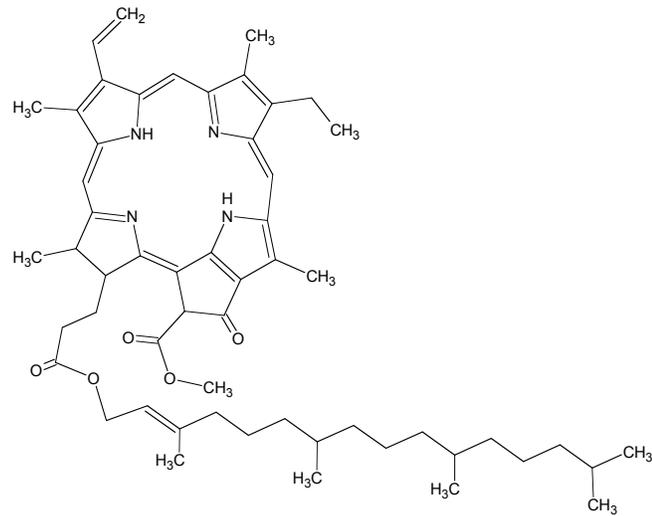
Mediador	Efecto
<i>Histamina</i>	Es un mediador ampliamente distribuido por el organismo. Actuando sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Cuando actúa sobre los receptores H2 (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación.
<i>Enzimas proteolíticas</i>	La más interesante es la quininogenasas que actúa sobre algunas proteínas de la sangre para producir quininas. Las quininas inducen la vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y produce dolor.
<i>Heparina</i>	Inhiben la coagulación y la activación de los factores del complemento.
<i>Leucotrieno B4 (LTB4)</i>	Factor quimiotáctico para eosinófilo, neutrófilos, mastocitos y macrófagos.
<i>Prostaglandina E2 (PGE2)</i>	Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a y LTB4 aumenta la permeabilidad
<i>Factor activante de plaquetas (PAF)</i>	Activa las plaquetas determinando su agregación. Produce vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular.
<i>Inmunoglobulinas</i>	Se unen y bloquean al germen y sus toxinas.
<i>Proteínas de la fase aguda</i>	Tienen la capacidad de fijar determinados gérmenes y activan el complemento por la vía clásica.
<i>Tromboxanos A2</i>	Producen agregación plaquetaria y vasoconstricción
<i>Interleuquina 1(IL-1)</i>	Activa la proliferación y diferenciación de las células T y B, contribuyendo a la respuesta específica. Activan la proliferación de fibroblastos y colágeno.

Radicales Libres de Oxígeno	A bajas concentraciones activan quimiocinas, citocinas y moléculas de adhesión leucocitaria endotelial: aumenta la respuesta inflamatoria.
Óxido Nítrico	Se produce gracias a las interleuquinas. Cuando se libera en cantidades incontroladas se produce vasodilatación periférica y necrosis tisular.

I.8. Metabolitos Secundarios con actividad Antiinflamatoria, extraídos de algas marinas

Entre algunos ejemplos de compuestos aislados se tiene, por ejemplo; el feofitín A (**39**), aislada del alga verde *Enteromorpha prolifera*, colectada en Japón, que presentó acción supresora en la producción del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ en ratón, inducido por TPA. El Feofitín A mostró actividad en quimiotaxis de humano PMN por fMLP, presentando una acción antiinflamatoria dependiente de la cantidad administrada, y exhibió una supresión significativa en algunas reacciones presentes en cuadros inflamatorios, estas inducidas por TPA, tales como la formación de edema en oreja de ratón ^[32].

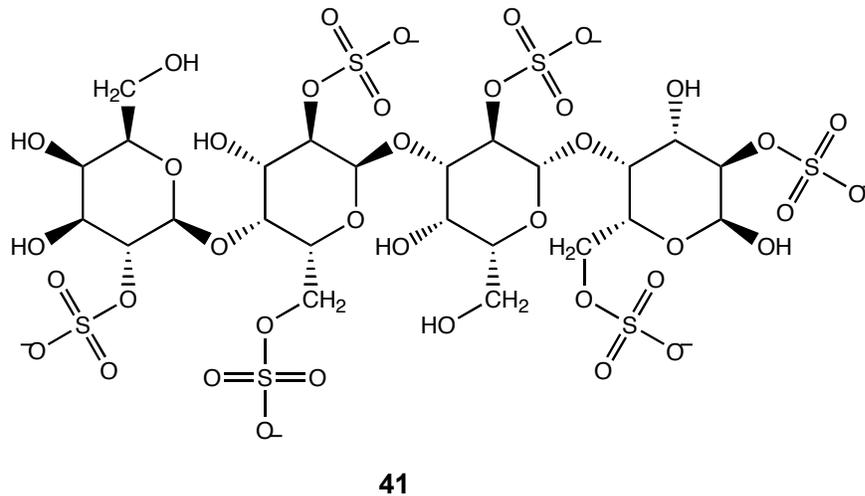
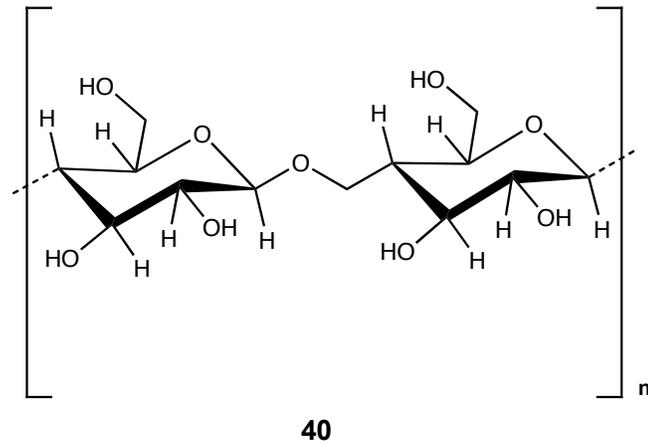
El extracto acuoso del alga *Lonicera japonica* mostró actividad antiinflamatoria a bajas concentraciones (100 mg/Kg) sobre edema en pata de ratón, permeabilidad vascular e infiltración de neutrófilo. Es importante destacar que a concentraciones más altas el efecto antiinflamatorio desaparece y puede exhibir un efecto proinflamatorio, posiblemente por la presencia de algún compuesto que ejerza esta acción. El efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *Lonicera japonica* puede deberse a la inhibición de la producción de citocinas^[33].



39

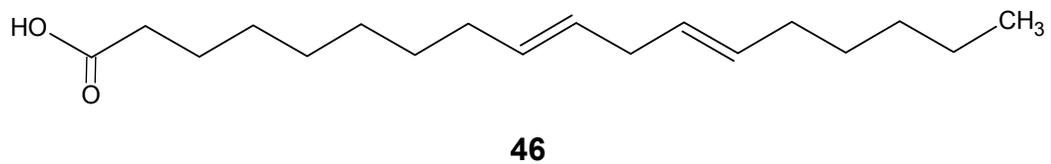
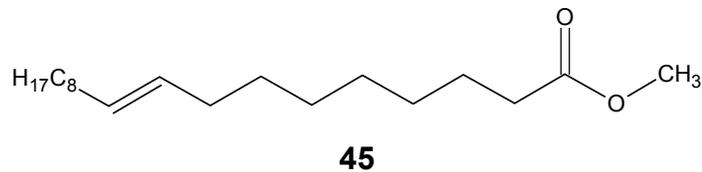
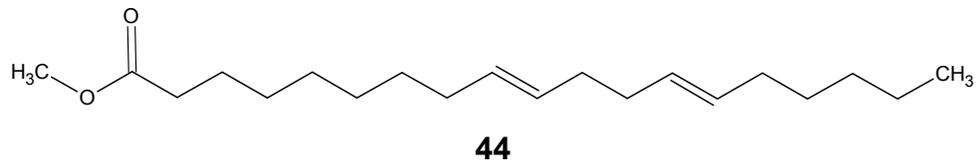
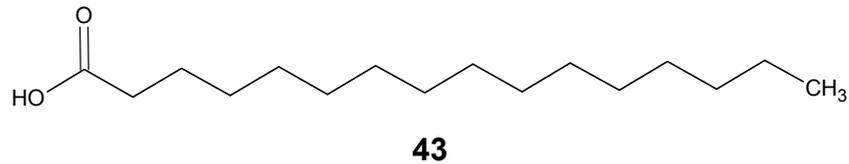
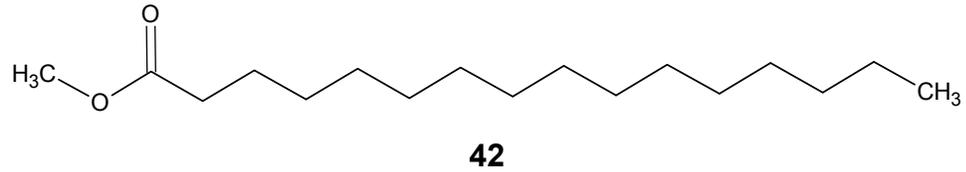
I.8.1. Polisacáridos

Se estudió una serie de polisacáridos extraídos de algas marrones de la bahía oriental de Japón. Entre ellos, fucoidanos y laminaranos extraídos de unas especies de *Laminaria japonica*, *Laminaria cichoroides* y *Fucus evanescens*, laminaranos de *Laminaria gurjanoave*, otros β-D-glucanos (**40**) y λ-carragenina (**41**) de *Chondrus armatus*. Todos estos compuestos mostraron actividad inhibidora de la activación del complemento. Presentando una mayor actividad los α-L- fucanos sulfatados de la *L. cichoroides*, mientras que los fucoidanos de *Laminaria japonica* tuvieron un efecto moderado. Es importante destacar que los polisacáridos obtenidos de la *Laminaria japonica* mostraron efecto sobre la actividad fagocítica de macrófagos contra *Staphylococcus aureus*, producción de anticuerpo policlonal (IgM e IgG) de células del bazo e interleucina 1α y producción de factor de necrosis tumoral α (TNF-α) en macrófagos [34].



I.8.2. Ácidos grasos

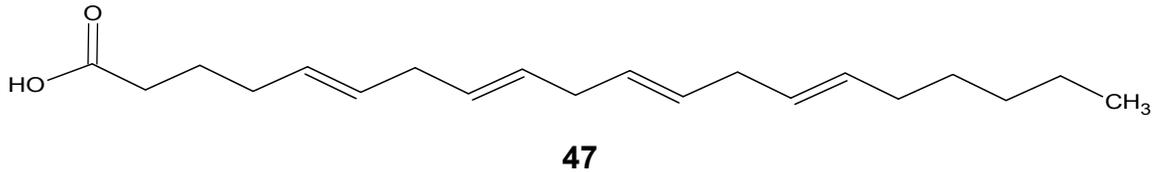
Al estudiar el extracto metanólico de *Zostera japonica*, se encontró actividad antiinflamatoria en una de sus subfracciones de hexano. La actividad antiinflamatoria se basó en la inhibición de TNF- α inducido por LPS, IL-1 β y IL-6 en una cantidad dependiente de la dosis, sugiriendo que esta subfracción es bioactiva como antiinflamatorio en ensayos *in vitro*. Esta subfracción incluyó ácido palmítico metil éster (**42**) (21,5%), ácido palmítico (**43**) (24,02%), ácido linoléico metil éster (**44**) (13,09%), ácido oleico metil éster (**45**) (8,41%) y ácido linoleico (**46**) (7,93%)^[35].



Se demostró que el ácido γ - linoleico (18:3 n-6) reduce la producción de IL-1 inducido por TNF. Además, se demostró en otros ensayos que el ácido linoleico tiene la capacidad para inhibir IL-1 y IL-6 en macrófagos. Se ha demostrado que el ácido linoleico conjugado (CLA) puede inhibir algunos mediadores inflamatorios inducidos por LPS, tales como; iNOS y COX-2 en células RAW264.7 en macrófago^[36].

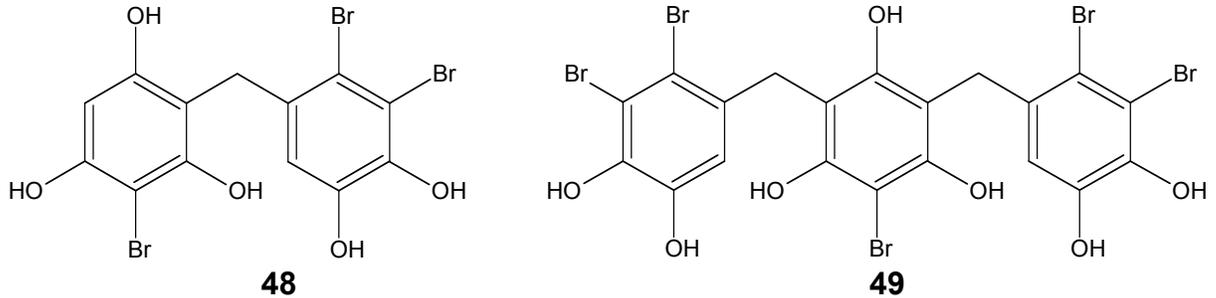
Se observó que la fracción sulfoglicolipídica obtenida del alga roja *Porphydium cruentum*, la cual posee capacidad para inhibir, la producción de aniones superóxidos *in vitro* desmostraron que esta fracción logra una buena capacidad antiinflamatoria y evita la proliferación de células en panel de líneas de cáncer. Los resultados demostraron que esta fracción contenía gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs),

entre otros; ácido hexadecánico (26,1%), ácido araquidónico (**47**) (36,8%), entre otros^[37].

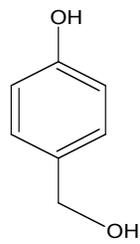
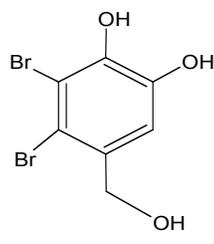
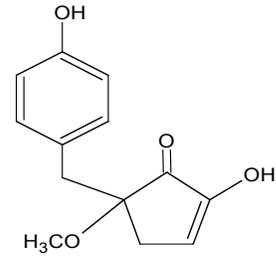


I.8.3. Fenoles

A partir de estudios químicos realizados al alga roja *Vidalia obtusaloba* se lograron aislar dos metabolitos bromofenólicos: vidadol A (**48**) y vidadol B (**49**). Ambos mostraron actividad antiinflamatoria inhibiendo la fosfolipasa A₂^[38].

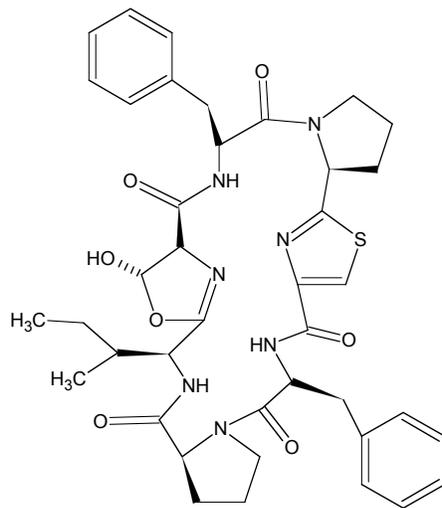
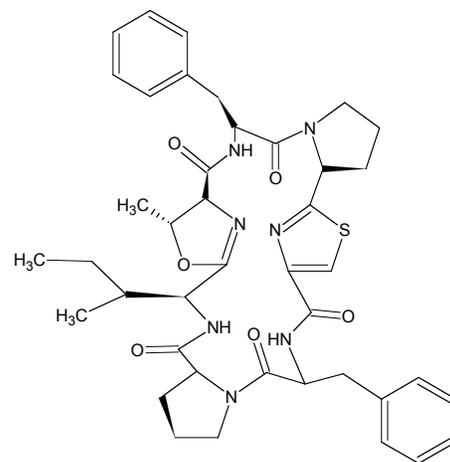


A partir del alga roja *Vidalia sp.* fueron identificados tres compuestos fenólicos, el alcohol p-hidroxibencílico (**50**), el etilanosol (**51**) y vidalenonola (**52**). En la realización de este estudio se observó que el extracto lipídico tiene una importante actividad en ensayos anticancerígenos^[39].

**50****51****52**

I.8.4. Péptidos

Dos conformeros estables de un heptapéptido cíclico cis,cis- (**53**) y trans,trans- ceratospongamida (**54**) fueron aislados de la microalga roja *Ceratodictyon spongiosum* y la esponja *Sigmadocia symbiotica*, las cuales existen en una relación simbiótica inusual. La actividad antiinflamatoria de ambos fue examinada midiendo la inhibición de sPLA2 por carcinoma, en células hepatocelular estimuladas con la citosina IL-1 β pro - inflamatoria ^[40].

**51****52**

I.9. Justificación

El estudio fitoquímico y biológico realizado al alga *Penicillus capitatus* se basa en la importancia biológica y química que tienen los metabolitos secundarios hallados a partir de productos naturales marinos. Éste es el primero realizado a la especie venezolana, ya que sólo existen algunos antecedentes de estudios hechos a la especie colectada en Las Bahamas.

Es importante destacar que este estudio forma parte de un proyecto conjunto entre las Facultades de: Farmacia (Laboratorio de Productos Naturales), Ciencias (Laboratorio de Síntesis Orgánica) y Medicina (Instituto de Inmunología), en el cual se evalúa la fitoquímica y actividad antiinflamatoria de un grupo de algas colectadas en las costas Venezolanas.

I.10. Objetivos

I.10.1. Objetivo General

Realizar el estudio fitoquímico del alga *Penicillus capitatus* y evaluar la posible actividad antiinflamatoria de los extractos y/o metabolitos secundarios mayoritarios presentes.

I.10.2. Objetivos Específicos

- Separar y purificar los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos obtenidos del alga *Penicillus capitatus*, por medio de la cromatografía en columna.
- Determinar la estructura de los compuestos por medio del empleo de técnicas espectroscópicas modernas (Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas y Espectrometría de Infrarrojo).
- Determinar la posible actividad antiinflamatoria de los extractos mediante bioensayos asociados con inflamación, tales como: medición de óxido nítrico y anión superóxido; y evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos puros, mediante el método de MTT.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios ya caracterizados, mediante bioensayos asociados con inflamación, tales como: medición de óxido nítrico y anión superóxido; y evaluar la actividad antiproliferativa de los compuestos puros, mediante el método de MTT.

II.- PARTE EXPERIMENTAL

II.1. Materiales, reactivos y equipos:

II.1.1. Soportes cromatográficos

- Para la realización de cromatografía de capa fina fase normal, se emplearon placas de silica gel Alugram ® de dimensiones 20 x 20 cm, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄.
- En la realización de cromatografía en columna de fase normal, se utilizó silica gel 60, con las siguientes especificaciones: 0,063-0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM.
- Para cromatografía de capa fina fase reversa, se utilizaron placas RP-18 soportadas en aluminio, de longitud 5 x 7,5 cm.
- En separaciones cromatográficas de tipo fase reversa, se utilizaron columnas Sep-Pak® Vac 35 cc y 12 cc C₁₈.

II.1.2. Solventes y reactivos

- Hexano
- Diclorometano
- Acetato de etilo
- Metanol
- Acetonitrilo
- Etanol
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Agua destilada
- Revelador de p-anisaldehído
- Revelador de timol
- Revelador de nihidrina

- BSTFA (N,O-bis(trimetilsil)trifluoroacetamida)

Todos los solventes usados en la realización de este trabajo fueron de grado técnico, previamente destilados. El DMSO se utilizó sin previo tratamiento.

II.1.3. Equipos

- Espectrómetro de masas HP 5971A acoplado a un cromatógrafo de gases HP 5890, con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) de 70 eV (ubicado en el Departamento de Química de la Universidad Simón Bolívar).
- Equipo de resonancia magnética nuclear JEOL, modelo Eclipse + de 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , con detección por cuadratura (ubicado en el Departamento de Química de la Universidad Simón Bolívar).
- Espectrofotómetro de Infrarrojo BRUKER, Modelo Tensor FT-IR (ubicado en el Departamento de Química de la Universidad Simón Bolívar).
- Espectrómetro de masas Thermo – Finnigan, con detector de trampa de iones (ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC.)
- Espectrómetro de masas Varian Saturno 2000 con Trampa de Iones Lineal 3200 QTRAP (*Applied Biosystem*), y fuente de ionización “Turbo Ion Spray” en modo positivo. Voltaje de IonSpray: 5500 V, “declustering potencial” de 70 V y energía de colisión de 10 V. (Ubicado en el Instituto de Medicina Tropical, Dr. Félix Pifano, UCV)
- En la realización de este trabajo se usaron los rotaevaporadores Büchi R-114 y Büchi RE 120.

- Se utilizó la lámpara de UV-Visible marca Entela, Modelo UV GL-25, con dos longitudes de onda disponibles: 254 y 365 nm.

II.2. Colección e identificación del alga *Penicillus capitatus*.

El alga verde *Penicillus capitatus*, fue colectada manualmente a una profundidad de 1 metro en Ocumare de la Costa, estado Aragua, el 10 de marzo del año 2007 y fue identificada por los Doctores: Mayra García (Instituto Jardín Botánico Tobías Laser) y Santiago Gómez (Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV).

II.3. Procedimiento experimental.

Los pasos realizados en el tratamiento del alga *Penicillus capitatus* se describen en el Esquema 1.

II.3.1 Obtención de los extractos del alga *Penicillus capitatus*

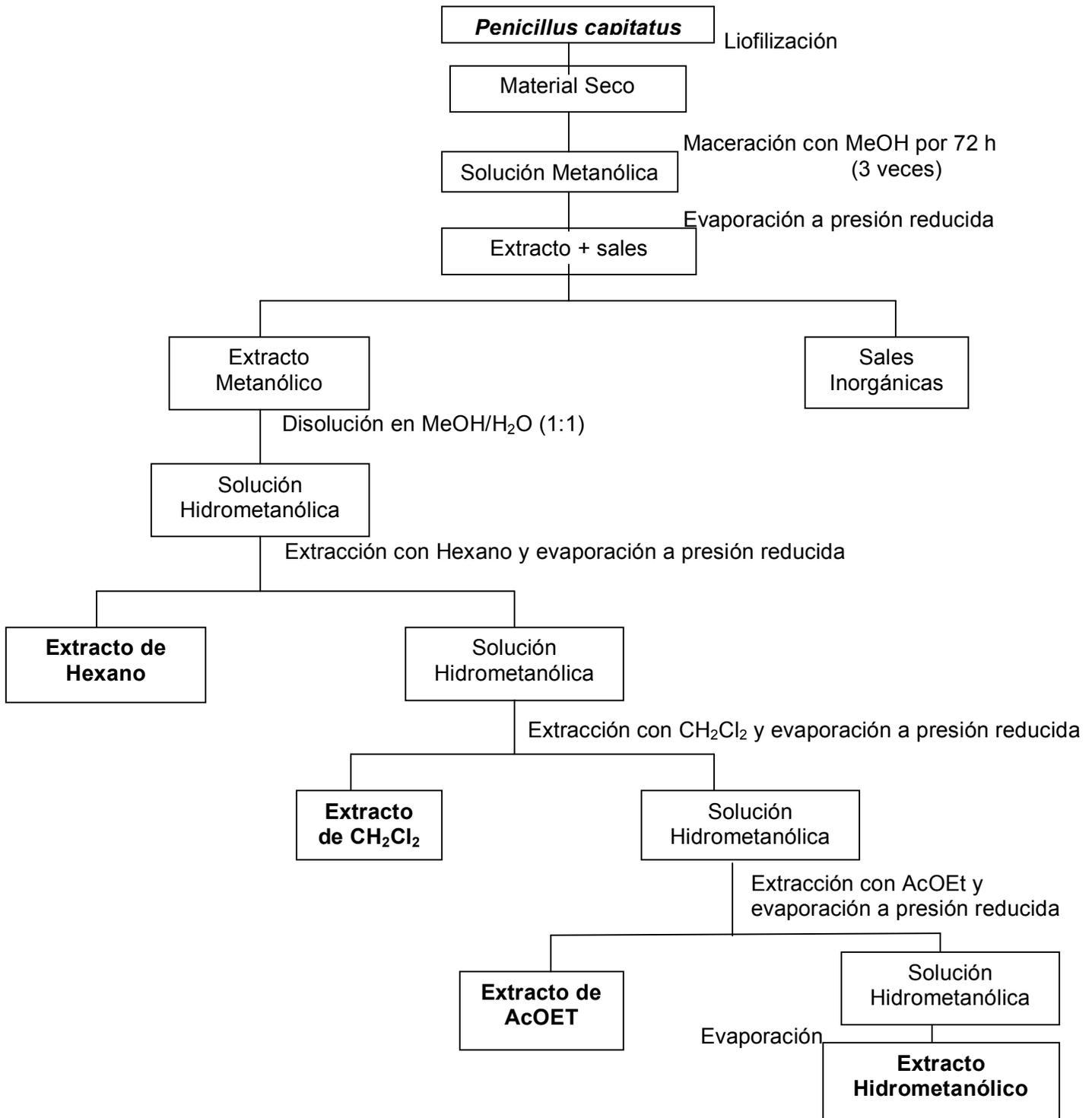
Para la extracción del material seco se sumergió el alga liofilizada y triturada en 2 L de metanol, por tres días. Después de realizar este procedimiento tres veces, la mezcla se filtró y se concentró al vacío hasta sequedad, el peso fue 218,25 g. Este sólido fue tratado con metanol y se realizó un proceso de filtración, del cual se obtuvieron unos cristales insolubles en metanol, que luego de hacer pruebas de solubilidad y medición del punto de fusión, se determinó que consistía de sales inorgánicas. Lo que permaneció disuelto en metanol, se llamó *extracto crudo* del alga. Se evaporó al vacío el metanol, y se obtuvo un peso de 9,68 g

El *extracto crudo* fue disuelto en 100 mL de solución MeOH/H₂O, con una relación aproximada de 1/1 (solución hidrometanólica), y fue particionada con hexano, diclorometano y acetato de etilo (en ese orden) con 3 volúmenes de solvente; 2 veces 100mL y el último volumen con 50 mL. Se obtuvieron 4 extractos: extracto de hexano (PcH), extracto de diclorometano (PcD), extracto de acetato de etilo (PcAc) y extracto hidrometanólico (PcAM). En la tabla 3 se muestran las cantidades de extracto obtenido luego de la partición.

Tabla 3: Pesos de los extractos obtenidos

Extracto	Peso del Extracto
Hexano (PcH)	1,7365 g
Diclorometano (PcD)	0,3600 g
Acetato de Etilo (PcAc)	0,0568 mg
Hidrometanólico (PcAM)	7,0740 g

Esquema 1



Luego de obtener los diferentes extractos, se procedió a la separación y purificación de compuestos mediante técnicas cromatográficas, y se realizó la caracterización de los compuestos por medio de técnicas espectroscópicas. En la Figura 3 se muestra un esquema básico del procedimiento y la información obtenida con cada técnica.

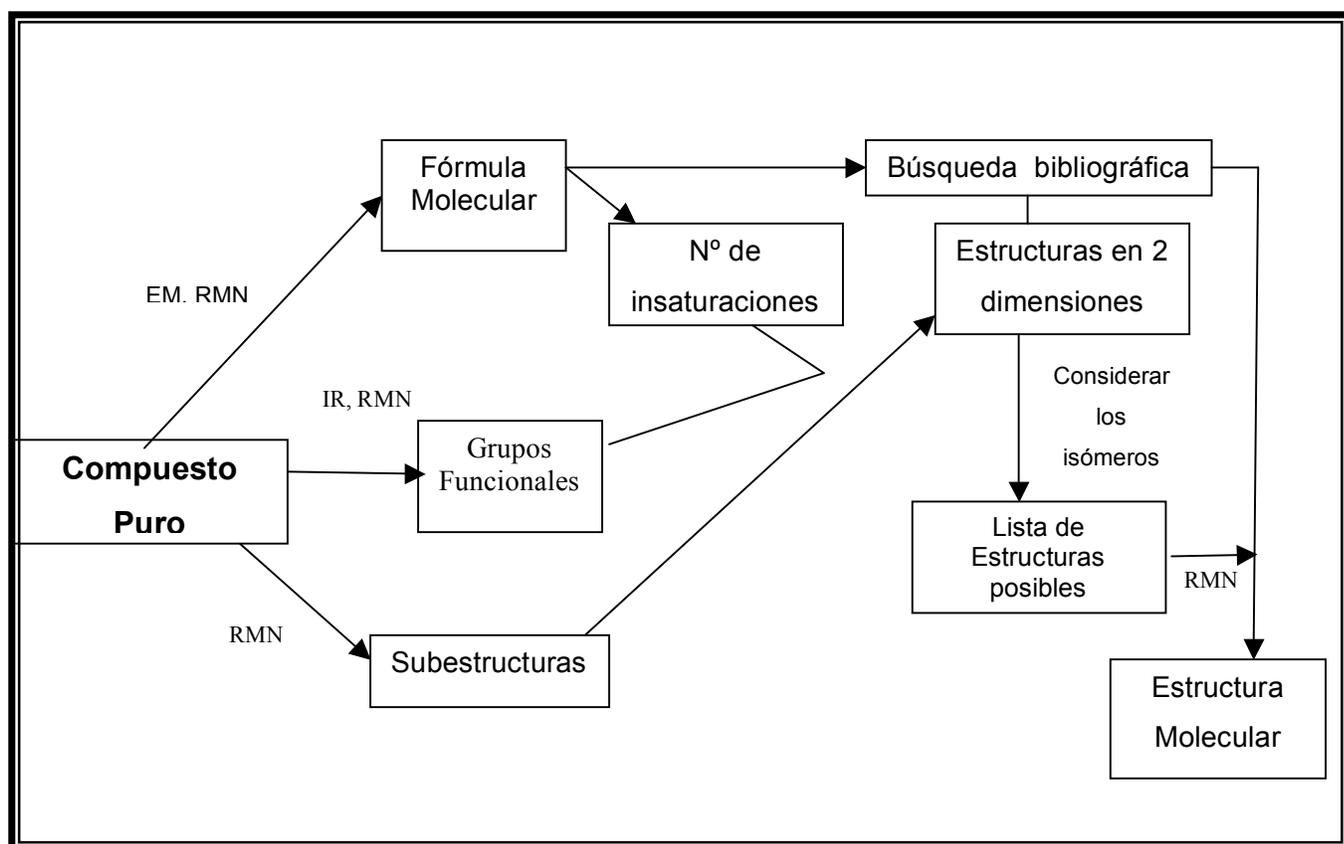


Figura 3: Estrategia para establecer la estructura molecular

II.3.1.1 Extracto de Hexano (PcH)

A partir del extracto de hexano (PcH), se procedió a realizar una cromatografía de columna en Silica-gel (150 g) luego de hacer el estudio analítico del comportamiento de la mezcla en placas de cromatografía de capa fina. Al disolver en la mezcla de solventes 9:1 diclorometano – acetato de etilo, se observó la formación de un precipitado de color blanco, que se logró aislar de la solución. A este precipitado se le llamó **PcH0**. Luego, se eluyó la columna utilizando un gradiente de polaridad en un sistema de mezcla de solventes de diclorometano, acetato de etilo y metanol. Se recogieron 32 fracciones y se unieron de acuerdo a la comparación de los factores de retención observados en la cromatografía de capa fina. Se usaron 5 mezclas de solvente de 200 mL cada una. En la tabla 4 se muestran las distintas fases móviles utilizadas en el proceso de separación cromatográfica para el extracto de hexano

Tabla 4: Mezcla de solvente utilizada en la separación cromatográfica del extracto de hexano PcH.

Mezcla de Solvente	Fracciones Obtenidas
9:1 CH ₂ Cl ₂ – AcOEt	1 – 6
1:1 CH ₂ Cl ₂ – AcOEt	7 – 12
100% AcOEt	13 – 18
7:3 AcOEt – MeOH	19 – 24
100% MeOH	25 – 32

En la tabla 5 se observan las fracciones unidas, luego de la comparación por cromatografía de capa fina, y la cantidad obtenida.

Tabla 5: Se muestran las fracciones unidas y los distintos pesos de cada una

Fracción	Peso (mg)
PcH0	20.1
PcH1	97.4
PcH2	147.2
PcH3	170.4
PcH4	70.8
PcH5	50.3
PcH6	119.6
PcH7	43.7
PcH8	102.6
PcH9	60.2
PcH10	249.4
PcH11	306.6
PcH12	240.0
PcH13	51.4

Particularmente, parecieron interesantes las fracciones **PcH0**, **PcH10** y **PcH11**; debido a la reacción positiva a la presencia de glicósidos, al revelar con timol (coloración rosada); confirmada con las señales típicas de carbonos oxigenados, observadas en los espectros de RMN de ^{13}C , de las mezclas. Las demás fracciones se estudiaron analíticamente con cromatografía de capa fina y se observaron mezclas complejas, que no valió la pena estudiar debido a la poca cantidad de ellas.

II.3.1.1.1 Purificación de la fracción Pch0

A la fracción Pch0 se le realizó una prueba de solubilidad con los solventes: CH₂Cl₂, CHCl₃, AcOEt, MeOH, acetona, acetonitrilo, piridina y dimetilsulfóxido; siendo soluble sólo en piridina y dimetilsulfóxido.

Se purificó la fracción Pch0, disolviendo en DMSO (dimetilsulfóxido) y utilizando cromatografía en fase reversa, en un cartucho de C₁₈ con un V₀ de 1 mL. Se realizó un gradiente de polaridad desde 100 % H₂O hasta 100 % MeOH en incrementos de 10 % en MeOH. Cada fase móvil consistió de 1 mL. El compuesto se obtuvo en la última fase móvil. Se obtuvieron 10 mg del **compuesto 1** (0.0046 % de rendimiento).

II.3.1.1.2 Estudio de la fracción Pch10

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico en la cromatografía de capa fina, donde se observó una mancha mayoritaria de color rosado al revelar con timol (típica de glicósidos); la fracción Pch10 fue fraccionada en una columna de sílica gel (25 g), con las siguientes condiciones: la muestra introdujo en la columna, disuelta en AcOEt y se eluyó en un sistema AcOEt – MeOH utilizando 50 mL de V₀, en cada fase móvil. En la tabla 6 se citan las fases móviles utilizadas para la separación de la fracción Pch10, y la cantidad obtenida luego de dicha separación.

Tabla 6: Fases móviles y pesos de las fracciones obtenidas.

Fracción	Fase Móvil	Peso (mg)
PcH10.1	100 % AcOEt	26,9
PcH10.2	9:1 AcOEt – MeOH	51,2
PcH10.3	1:1 AcOEt – MeOH	40,2
PcH10.4	100% MeOH	47,6

Se purificó la fracción PcH10.4, disolviendo en agua y utilizando cromatografía en fase reversa, en un cartucho de C₁₈ con un V₀ de 5 mL. Se sembró la muestra en agua, y se realizó un gradiente de polaridad desde 50 % MeOH en H₂O hasta 100 % MeOH en incrementos de 10 % en MeOH. El compuesto se obtuvo con una fase móvil de 70 % MeOH en H₂O. Se obtuvieron 10,1 mg del **compuesto 2** (0.0046 % de rendimiento).

II.3.1.1.3 Estudio de la fracción PcH11

Se estudió la solubilidad de la fracción en distintos solventes, y se encontró que en AcOEt, se disolvía una parte, y otra quedaba como un precipitado muy fino. Este precipitado se logró separar mediante centrifugación, obteniéndose 28,2 mg de sólido. A este sólido se le llamó PcH11.2.

Se purificó la fracción PcH11.2, disolviendo en DMSO y utilizando cromatografía en fase reversa, en un cartucho de C₁₈ con un V₀ de 5 mL. Se introdujo la muestra, disuelta en DMSO, en la columna, y se realizó un gradiente de polaridad desde 50 % MeOH en H₂O hasta 100 % MeOH en incrementos de 25 % en MeOH. El compuesto se obtuvo con una fase móvil de 100 % MeOH, al segundo V₀ que se pasó por la columna. Se realizó una cromatografía de capa fina analítica y ésta reveló impurezas en

la muestra. A esta nueva fracción se denominó PcH11.2.5. Luego, se realizó una purificación más minuciosa, de la misma forma, pero haciendo un gradiente en incrementos de 5 % en MeOH, a partir de 75 % MeOH en H₂O hasta 100 % MeOH. El compuesto puro se obtuvo en la fracción 6 (100 % MeOH). Se obtuvieron 6,4 mg del **compuesto 3** (0.003 % de rendimiento)

II.3.1.2 Extracto Hidrometanólico (PcAM)

Debido a la sospecha de la presencia de compuestos de alta polaridad en este extracto por su solubilidad en la mezcla de solventes altamente polares (H₂O – MeOH); se procedió a su estudio analítico mediante la cromatografía de capa fina en fase reversa. Luego se procedió a realizar una cromatografía de presión media, en fase reversa con una columna de sílica de C₁₈ (54,5 g) utilizando presión de nitrógeno. Se recogieron 6 fracciones utilizando un gradiente de 5 fases móviles y un V₀ igual a 50 mL: 100 % H₂O, 70 % H₂O (7:3 H₂O – MeOH), 50 % H₂O (1:1 H₂O – MeOH), 30 % H₂O (3:7 H₂O – MeOH) y 100 % MeOH (3V₀). En la tabla 7 se representan las fracciones, con la fase móvil utilizada y la cantidad de fracción obtenida.

Tabla 7: Fracciones obtenidas, fases móviles utilizadas y peso obtenido.

Fracción	Mezcla de Solvente
PcAM1	70 % H ₂ O (7:3 H ₂ O – MeOH)
PcAM2	50 % H ₂ O (1:1 H ₂ O – MeOH)
PcAM3	30 % H ₂ O (3:7 H ₂ O – MeOH)
PcAM4	100 % MeOH (1V ₀)
PcAM5	100 % MeOH (1V ₀)
PcAM6	100 % MeOH (1V ₀)

Se trabajaron las fracciones PcAM1, PcAM3 y PcAM4.

II.3.1.2.1 Estudio de la fracción PcAM1:

El análisis de la cromatografía de capa fina en C₁₈ y en sílica gel, mostró la mezcla de 2 compuestos muy polares, que se comportaron igual frente a distintas condiciones de separación; por lo que se separó la mezcla de compuestos mediante precipitación con cambio de solvente.

La mezcla se disolvió en una pequeña cantidad de MeOH, y al agregar AcOEt, se formaron dos tipos de precipitado: uno denso que bajó hasta el fondo del frasco (**PcAM1.1**) y otro bastante fino que quedó suspendido en la mezcla de solventes (**PcAM1.2**). Seguidamente, se separaron mecánicamente los sólidos mediante la extracción de la mezcla de solventes junto con el sólido fino con una pipeta pasteur, y se lavó varias veces con AcOEt; dejando el sólido más denso en el fondo del frasco. Luego, se realizó cromatografía de capa fina comparativa, donde se observó una mejor separación de los componentes de la mezcla, sin embargo, no se pudo separar en ninguna condición cromatográfica debido a su comportamiento similar. Se presentó el compuesto como una mezcla de metabolitos en una relación cercana al 3:1.

Se obtuvieron 153,3 mg del **compuesto 4** (0.07 % de rendimiento)

II.3.1.2.2 Estudio de la fracción PcAM3 y PcAM4.

Se realizó el estudio analítico de ambas fracciones, comparativamente, en cromatografía de capa fina en sílica gel; y se observaron manchas de igual color y con el mismo factor de retención (R_f), al revelar con p-anisaldehído; por lo que se unieron dichas fracciones, debido a que se trató de la misma mezcla de compuestos.

Se observó una mezcla de 2 compuestos principales, uno que reveló azul con p-anisaldehído y fue menos polar debido a que tuvo factores de retención mayores que el otro compuesto, que reveló verde, en distintas fases móviles.

Se separaron los compuestos mediante el uso de una placa de cromatografía de capa fina preparativa, utilizando AcOEt como fase móvil. Se raspó la sílica de la placa de vidrio en la franja donde se obtuvo el compuesto mayoritario (el menos polar), y se trasvasó a una fiola; seguidamente, se extrajo el compuesto con MeOH y se filtró para eliminar la sílica y obtener el compuesto en solución. Se eliminó el solvente y se obtuvo un sólido amarillento que fue soluble en MeOH.

Se obtuvieron 7,2 mg del **compuesto 5** (0.003 % de rendimiento)

II.4 Ensayos biológicos

La acción antiinflamatoria se midió a través de la capacidad inhibidora de óxido nítrico (radical que eleva su concentración celular durante el proceso inflamatorio) de los compuestos 1, 2, 3, 5 y un compuesto puro, aislado del extracto hidrometanólico, pero no caracterizado (compuesto NC). De igual manera se midió la actividad antiproliferativa de los compuestos 1, 2, 3, 5 y el compuesto NC sobre cierto cultivo celular de macrófagos RAW 264.7, por el método del MTT. No se midió la capacidad captadora de radicales nitritos y capacidad antioxidante, para poder verificar la posible acción antiinflamatoria; debido a la poca cantidad obtenida.

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, se cultivó en frascos de cultivo plástico de 25 cm² en medio Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, una mezcla de antibiótico antimicótico (100 unidades/mL de penicilina G, y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) y 2 mM de glutamina, a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

Todos los ensayos biológicos fueron realizados en el Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina, U.C.V. Bajo la dirección de los profesores Juan De Sanctis y Michael Mijares.

II.4.1 Ensayo para medir la inhibición de la producción de óxido nítrico en cultivo celular de Macrófagos Murinos RAW 264.7 (Método de Griess)

El óxido nítrico es un gas simple, liberado por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina, por acción de la enzima sintetasa de óxido nítrico, la cual tiene una amplia distribución en el organismo.

En las enfermedades inflamatorias aumenta la concentración de óxido nítrico presente, debido a que los macrófagos activados secretan este y otros mediadores como respuesta en el proceso inflamatorio. Este hecho resulta en la formación de peroxinitritos y/o radicales OH (especies altamente citotóxicas) que son consideradas dañinas para el ser humano. Esto se confirma con los niveles elevados de óxido nítrico

en diferentes enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoidea ^[41].

Para medir la concentración de óxido nítrico se utilizó el sistema del reactivo de Griess que está basado en una reacción de diazotación, la cual usa sulfanilamida y dihidrocloruro de *N*-(1-naftil)etilendiamina (NED) bajo condiciones ácidas (ácido fosfórico). Este sistema detecta NO_2^- en una gran variedad de matrices líquidas biológicas y experimentales tales como plasma, suero, orina y medio de cultivos.

El reactivo de Griess está compuesto de una mezcla de sulfanilamida 1% m/v (en ácido fosfórico al 2,5%) y *N*-(1-naftil) etilendiamina 0.1% m/v (solución acuosa). El primer compuesto reacciona con el nitrito en la muestra para formar una sal de diazonio de color amarilla, la cual reacciona con el naftil-etilendiamina, para dar un producto azo de color púrpura, con una longitud de máxima absorción a 543 nm ^[42]. En la figura 4, se observa la reacción para formar el azo compuesto.

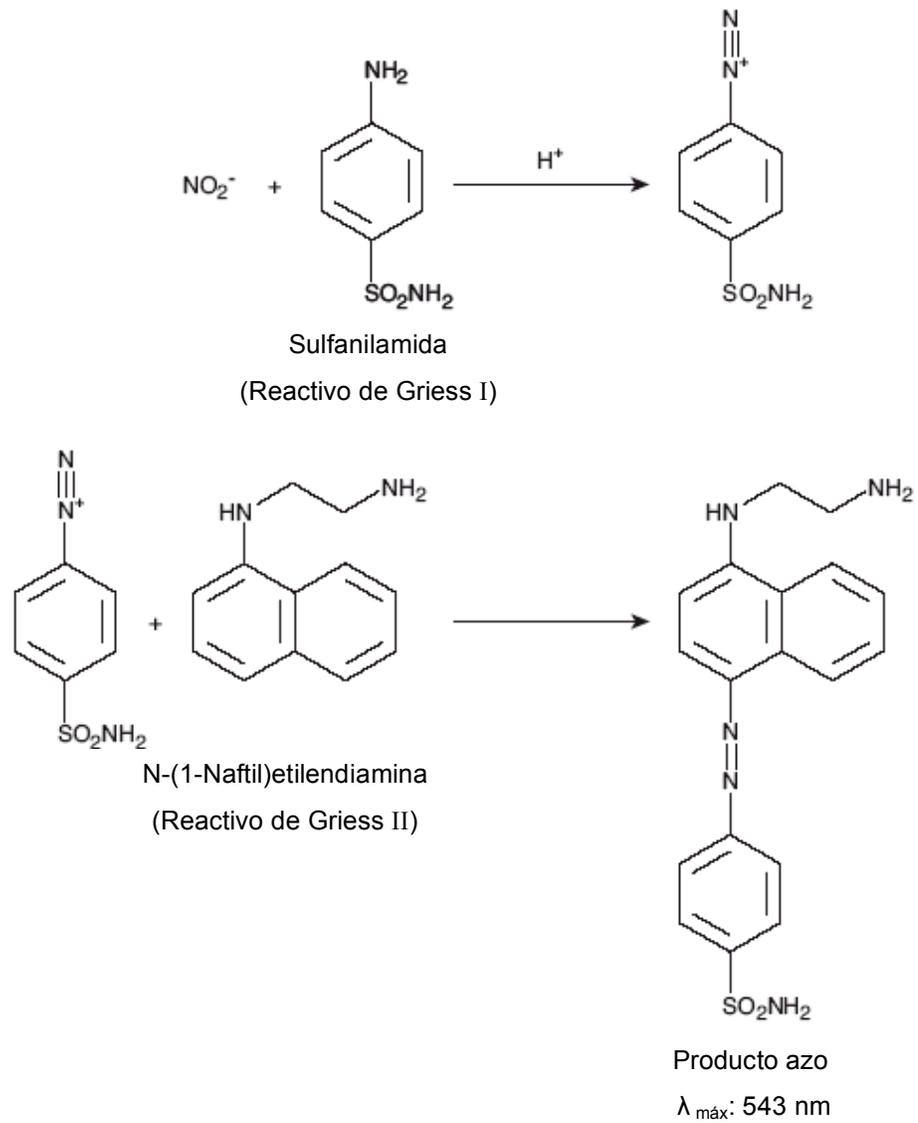


Figura 4: Reacción de la formación del producto azo, cuya concentración es proporcional a la cantidad de NO producido en la respuesta inflamatoria.

Procedimiento:

- Se tomó una placa Elisa de 96 pozos con tapa.
- Se agregó 20 μL de cada una de las soluciones a las que se iba a probar actividad en orden ascendente de concentración (4 réplicas).
- Se agregó 180 μL de suspensión de células de macrófago murino RAW 264.7 en DULBECO a una concentración de 50000 células por pozo.

En la misma placa se colocaron tres tipos de controles y un blanco:

- **Control DMSO:** Se colocó en 4 pozos vacíos 20 μL de DMSO 1% y 180 μL de suspensión de células RAW 264.7 (50000 células por pozo)
- **Control Estimulado:** Se colocó en 6 pozos 20 μL de H_2O , 180 μL de suspensión de células RAW 264.7 (50000 células por pozo)
- **Control no Estimulado:** Se colocó en 6 pozos 20 μL de H_2O , 180 μL de suspensión de células RAW 264.7 (50000 células por pozo)
- **Blanco:** Se colocó en 3 pozos 20 μL de H_2O , 180 μL de DULBECO.

Luego de 1 hora de incubación a 37 °C y 5% de CO_2 :

- Se agregó: a los pozos con solución de extracto, a los controles estimulados y a los blancos, 50 μL de LPS (lipopolisacárido: agente estimulante) a 5000 ng/mL en DULBECO.
- Se agregó a los pozos de control no estimulado 50 μL de DULBECO.

Se introdujo nuevamente la placa en la incubadora a 37 °C y 5% de CO_2 por 72 horas.

- Se centrifugó la placa a 1200 RPM por 10min.
- Se trasvasaron 120 μL de cada pozo a su pozo correspondiente en otra placa ELISA sin tapa de 96 pozos.
- Se agregó 60 μL de Sulfanilamida al 1% en H_3PO_3 2.5%.

- Se agregó 60µL de diclorohidrato de naftiletildiamina al 1% en H₂O.
- La placa fue colocada en un espectrofotómetro marca Labsystems Multiskan MCC/340, con agitación de 60 s.
- Se midió la absorbancia a 540 nm.
- La aminoguanidina (AG) se utilizó como control positivo.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la expresión:

$$\% \text{Inhibición de NO}^{\cdot} = (1 - (\text{Abs compuestos} / \text{Abs control estimulado})) \times 100$$

Abs compuestos: Absorbancia promedio de pozos con solución de extractos.

Abs control estimulado: Absorbancia promedio de pozos control estimulado

Nota: a ambos valores de absorbancia se le restó el valor de absorbancia del blanco, previo al cálculo de porcentaje de inhibición.

II.4.2 Ensayo de viabilidad sobre cultivos celulares de Macrófagos Murinos RAW 264.7 (Método de MTT)

Con este ensayo se puede concluir si la disminución en el parámetro que se mide (óxido nítrico) se debe a un efecto posiblemente antiinflamatorio o a una disminución en el número de células vivas presentes.

La viabilidad de los compuestos se evaluó por medio del método colorimétrico MTT. La sal de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por la enzima deshidrogenasa presente en las mitocondrias activas (de células vivas) produciendo cristales de formazan [1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan] de color azul oscuro insolubles en medio acuoso. Este método permite cuantificar en forma de densidad óptica ($\lambda = 570 \text{ nm}$) las células viables (células vivas) después de la aplicación del extracto o compuesto puro. Es de hacer notar que la

cantidad de formazan es directamente proporcional al número de células sobre un rango definido, usando una población celular homogénea ^[43]. En la figura 5 se observa la reacción de conversión del MTT al formazán.

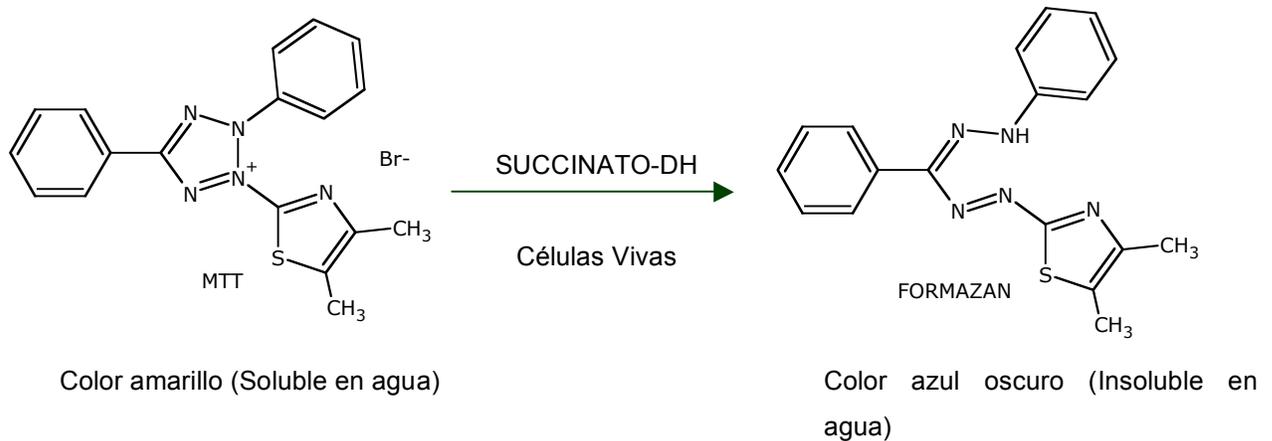


Figura 5: Reacción del MTT a formazán en presencia de células vivas y enzimas succinato-DH

Procedimiento:

Se siguió el procedimiento empleado en la determinación de la inhibición del óxido nítrico mediante el Método de Griess, con las siguientes diferencias:

Después de introducir nuevamente la placa en la incubadora a 37 °C y 5% de CO₂ por 72 horas.

- Se retiró cuidadosamente el sobrenadante de cada uno de los pozos.
- Se lavó los pozos una vez con 250 µL de PBS.
- Se centrifugó la placa a 1200 RPM por 10 min.

- Se retiró cuidadosamente el sobrenadante de cada uno de los pozos.
- Se agregó a cada pozo 50 μ L de solución de MTT (0.4 mg/mL en PBS)
- Se colocó la placa en el incubador a 37 °C y 5% de CO₂ por 4 horas.
- Se centrifugó la placa a 1600 RPM por 10 min.
- Se descartó el sobrenadante.
- Se agregó a cada pozo 100 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazan.
- Se midió la absorbancia a 540 nm.
- La viabilidad se cuantificó por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = (Abs \text{ compuestos}/Abs \text{ control}) \times 100$$

Abs compuestos: Absorbancia promedio de pozos con solución de extractos.

Abs control: Absorbancia promedio de pozos control.

Nota: a ambos valores de absorbancia, se le restó el valor de absorbancia del blanco previo al cálculo de porcentaje de inhibición.

III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación y caracterización de los compuestos aislados a partir del alga verde *Penicillus capitatus* se llevó a cabo por medio de diferentes técnicas espectrométricas: espectrofotometría de infrarrojo, espectrometría de resonancia magnética nuclear RMN de ^1H y ^{13}C , RMN de dos dimensiones (HMQC, HMBC, HSQC, COSY, DEPT 135) y espectrometría de masas. Al final de la descripción de cada uno de los compuestos, se muestran las comparaciones respectivas con los datos espectroscópicos reportados en la literatura. Los espectros de cada compuesto aislado se encuentran en la sección de anexos.

El alga *Penicillus capitatus* se colectó en La Ciénaga (Estado Aragua) en Marzo de 2007. Después de congelado el material se sometió a un proceso de liofilización para luego realizar una extracción de los metabolitos presentes en el alga, con metanol. El crudo obtenido después de la evaporación del solvente, se disolvió en metanol y luego se filtro para separar las sales. Posteriormente, se realizaron los procesos partición líquido/líquido con los solventes hexano, diclorometano y acetato de etilo; previa disolución en una mezcla metanol – agua (1:1), para obtener los distintos extractos.

En el estudio sobre los metabolitos secundarios se examinaron los extractos obtenidos del alga verde *Penicillus capitatus*, encontrándose:

- Del extracto de hexano se pudieron aislar, purificar e identificar tres (3) compuestos tipo glicolípidos, dos de ellos unidos a un grupo sulfonato en el carbono 6' del azúcar y el otro como un disacárido.
- En el extracto hidrometanólico se pudieron aislar e identificar dos (2) compuestos. Uno con una estructura tipo éster con una amina y otro cuya interpretación de la data espectroscópica no diferenció entre el ácido 3-etoxipropanóico y el 3-hidroxi propanoato de etilo.

III.1 Elucidación del Compuesto 1.

El compuesto **1** se presentó como un sólido amorfo de color blanco. Éste presentó un pseudo ion molecular a m/z 839 ($M - H + 2Na$)⁺, tomado por espectrometría de masas ESI (ion positivo) (Anexo 1); lo cual fue consistente con una fórmula molecular de $C_{41}H_{78}O_{12}S$. Esta fórmula fue comprobada mediante espectrometría de masas ESI (ion negativo) (Anexo 2) al observarse un pseudo ión molecular a m/z 793 ($M - H$)⁻.

El análisis del espectro de infrarrojo (Anexo 8) reveló la presencia de 3 grupos funcionales. La banda de absorción ancha y grande a 3396 cm^{-1} , característica del estiramiento O–H indicó la presencia del grupo hidroxilo en la molécula. Los dos picos que se observan a 1742 cm^{-1} y 1729 cm^{-1} , debidos al estiramiento C=O; se asignaron a dos grupos carbonilos tipo carboxílicos^[45]. Por último, la banda mediana observada a 1038 cm^{-1} y la banda intensa a 1169 cm^{-1} , características del estiramiento S–O; junto con las bandas pequeñas a 719 cm^{-1} y 769 cm^{-1} ; se interpretaron como la presencia de un grupo sulfonato^[46].

El análisis de la data de los espectros de RMN (DMSO – d_6) de ^{13}C (Anexo 3) y 1H (Anexo 5) (en DMSO) guiado por los espectros de RMN: DEPT (Anexo 4), HSQC (Anexo 6) y $^1H - ^1H$ COSY (Anexo 7), permitió la asignación de todas las señales de 1H y ^{13}C como un sistema de tres spines (ver tabla 8).

El primer sistema de espín fue asignado como una fracción tipo glicerol (δ_H 4.34 y 4.13, δ_C 63.2; δ_H 5.12, δ_C 70.3; δ_H 3.91 y 3.39, δ_C 65.2); el segundo grupo de señales se atribuyeron a dos cadenas largas saturadas de ácidos grasos, mientras que el tercer sistema de espín, indicó la presencia de un grupo tipo glicósido; así, al usar el protón anomérico a δ_H 4,57 (δ_C 98.81) como punto de partida en el análisis de los espectros de dos dimensiones COSY y HSQC, una secuencia de cinco oximetinos y un metileno desapantallado fueron identificados (δ_H 3.19, δ_C 72.2; δ_H 3.33, δ_C 73.5; δ_H 2.92, δ_C 74.8; δ_H 3.78, δ_C 69.1; δ_H 2.89 y 2.55, δ_C 55.0). El valor relativamente pequeño de la

constante de acoplamiento del protón anomérico: H-1'/H-2' ($J = 3.68$), que señaló la forma axial del protón vecino (H-2'), junto con las demás señales de obtenidas en los espectros de ^{13}C y DEPT; indicaron la presencia de una azúcar tipo α - glucopiranososa.

Las señales de desplazamiento químico relativamente a campo alto de los protones H-6'a y H-6'b (δ_{H} 2.89 y 2.55) y la resonancia del C-6' (δ_{C} 55.0); junto con el análisis del ión molecular y del espectro de IR; indicaron la presencia de un grupo -SO₃H.

El residuo correspondiente al grupo α - glucopiranososa debió estar unido al resto de la estructura por el C-3 del glicerol, debido a que los desplazamientos químicos del C-1 y C-3 son distintos, lo que implica la presencia de dos ambientes químicos distintos para los carbonos señalados.

A este compuesto no se le tomó el espectro de masas por impacto electrónico, por lo que no se observó la fragmentación de la molécula.

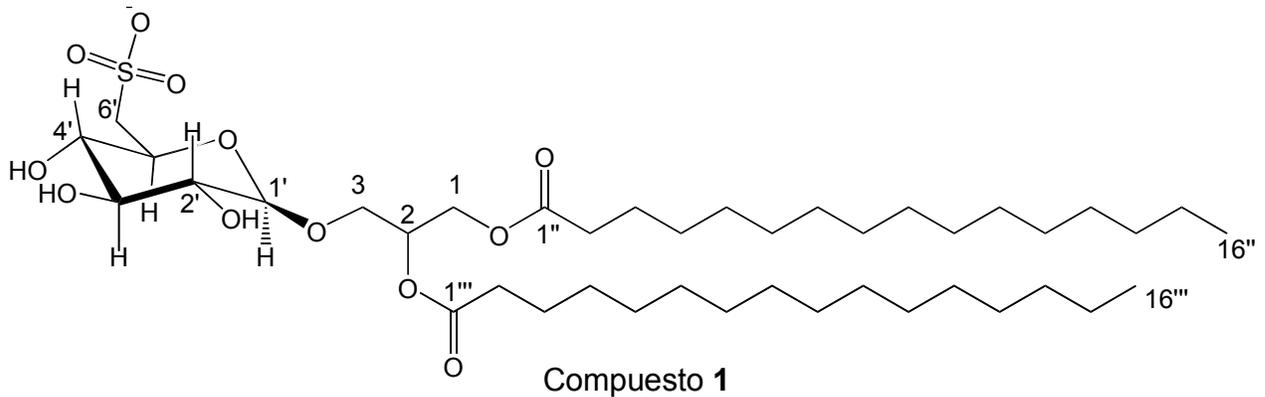
Tabla 8: Desplazamientos químicos y correlaciones observadas en los espectros de RMN del compuesto 1

Posición	δ_C (mult.) ^a	δ_H (int, mult., J en Hz)	COSY
1a 1b	63,2 (t)	4,34 (1H, dd, 12.03, 1.96) 4,13 (1H, dd, 12.27, 7.85)	2
2	70,3 (d)	5,12 (1H, m)	3a, 3b
3a 3b	65,2 (t)	3,91 (1H, dd, 10.55, 5.64) 3,39 (1H, dd)	-
1'	98,8 (d)	4,57 (1H, d, 3.68)	2'
2'	72,1 (d)	3,19 (1H)*	3'
3'	73,5 (d)	3,33 (1H)*	4'
4'	74,8 (d)	2,92 (1H)*	5'
5'	69,1 (d)	3,78 (1H, m)	6'a, 6'b
6'a 6'b	55,0 (t)	2,89 (1H, m) 2,55 (1H, m)	-
1''	172,9 (s)	-	-
1'''	173,1 (s)	-	-
2'' – 2'''	34,1 (t)	2,27 (4H, m)	3'', 3'''
3'' – 3'''	25,0 (t)	1,48 (4H, m)	-
4''' – 13''	29,0 – 29,6 (t)	1,22 (48H, m)	
4'' – 13'''			
14'' – 14'''	31,9 (t)		
15'' – 15'''	22,6 (t)		
16'' – 16'''	14,5 (q)		0,84 (6H, t, 6.38)

^aMultiplicidad encontrada con el experimento DEPT.

*Solapada con señal de H₂O

La estructura propuesta del compuesto **1** se presenta a continuación:



Las asignaciones anteriormente realizadas, coincidieron con resultados previamente publicados para un grupo de compuestos llamados Sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG).^[47]

Estudios previos han indicado la presencia de este tipo de compuestos en otras algas rojas como *Glacilaria verrucosa*, *G. textorii*, *Gelidium amansii*, *Chondrus ocellatus* y *Chondria crassicaulis*. Estos SQDG fueron de cadena corta, aunque para el alga *G. verrucosa*, se encontró el mismo compuesto propuesto en este trabajo^[48]. De acuerdo a la revisión bibliográfica, no se han encontrado esta clase de compuestos en algas verdes, lo que no significa que no se encuentren presentes en dichas algas.

Los Sulfátidos naturales, así como muchos glicolípidos sulfonatados, han mostrado capacidad de enlazarse a los receptores tipo selectinas. Dichos receptores son de la familia de las moléculas de adhesión celular (CAMs), y están involucrados en el proceso inflamatorio. *In vivo*, los sulfátidos bolquean significativamente la actividad dependiente de las selectinas en las respuestas antiinflamatorias^[49].

III.2 Elucidación del compuesto 2.

El compuesto **2** se presentó como un sólido amorfo de color amarillo. Éste presentó un pseudo ion molecular a m/z 793 ($M - H$)⁻, tomado por espectrometría de masas ESI (ion negativo) (Anexo 9), el cual fue consistente con la fórmula $C_{40}H_{74}O_{15}$.

La data de los espectros de RMN (DMSO – d_6) de ^{13}C y DEPT (Anexo 10), obtenida para este compuesto, mostró un patrón casi idéntico al obtenido para el compuesto **1**, excepto por la presencia de carbonos de una azúcar adicional y la ausencia de la señal a δ_C 54,4 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C . La asignación de los 1H y los ^{13}C se realizó con la información obtenida a partir de los espectros de 2 dimensiones de HSQC (Anexo 12) y $^1H - ^1H$ COSY (Anexo 13) como se muestra en la tabla 9. Las señales del metileno a δ_C 56.58 y δ_H 3.4 (q), junto con las señales del metilo 19.09 y δ_H 1.0 (t); se interpretaron como una impureza de etanol en la muestra.

Tabla 9: Desplazamientos químicos y correlaciones observadas en los espectros de RMN del compuesto 2

Posición	δ_C (mult.) ^a	δ_H (Int., mult., J en Hz)	COSY
1a	62.0 (t)	4,29 (1H, m)	1b, 2
1b		4,14 (1H, m)	1a, 2
2	70.5 (d)	5,10 (1H, m)	1a, 1b, 2, 3a, 3b
3a	67.2 (t)	3,81 (1H, m)	3b, 2
3b		3,62 (1H, m)	3 ^a , 2
1'	104.2 (d)	4,11 (1H, d)**	2'
2'	70.9 (d)	3,29 (1H, m)*	-
3'	69.4 (d)	3,70 (1H, m)	2'
4'	68.5 (d)	3.29 – 3.60*	-
5'	73.7 (d)	3,29 (1H, m)*	-

6'a 6'b	67.0 (t)	3,56 (1H, m)*	-
1''	100.0 (d)	4,68 (1H, d, 2,72)	-
2''	73.5 (d)	3,56 (1H, m)*	-
3''	69.0 (d)	3.29 – 3.60*	-
4''	70.2 (d)	3.29 – 3.60*	-
5''	71.8 (d)	3.61 (1H, m)	6''a
6''a 6''b	61.1 (t)	3.43 (1H, m) 3.52 (1H, m)	5''
1'''	172.9 (s)	-	-
1''''	173.1 (s)	-	-
2'''	34.1 (t)	2.26 (2H, m)	3'''
2''''	33.9 (t)	2.17 (2H, m)	3''''
3''' – 3''''	25.0 (t)	1.50 (4H, m)	4''' – 4''''
4''' – 11''''	29.4 (t)	2.23 (32H, m)	-
4'''' – 10''''			-
12'''' – 11''''	31.8 (t)		13'''' – 12''''
13'''' – 12''''	14.5 (q)	0.85 (6H, t)	-

* Solapado con otras señales de protones. ** Señal Ancha.

^aMultiplicidad encontrada con el experimento DEPT.

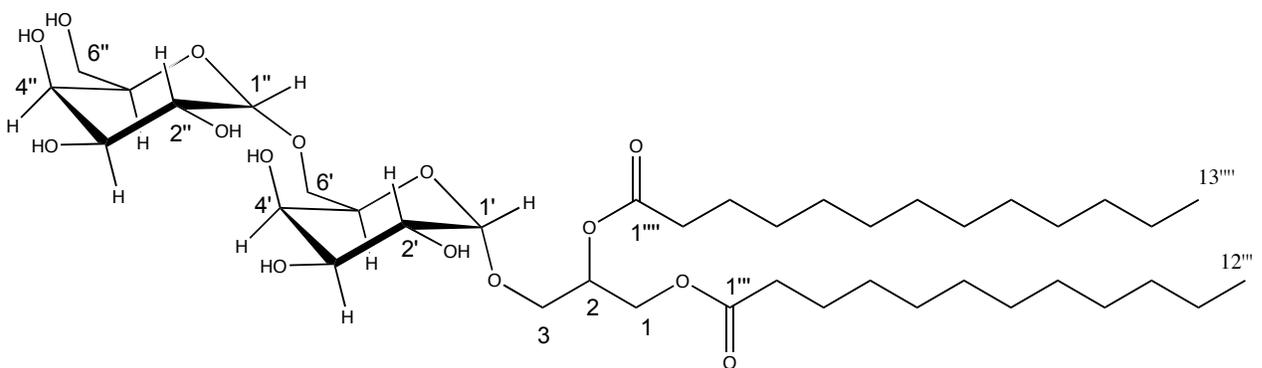
Dos señales de carbonos anoméricos se mostraron a δ_C 104.2 (C-1') y δ_C 100,1 (C-1''), cuyos protones se observaron a δ_H 4,11 y δ_H 4,68 (d, 2.72 Hz), respectivamente, en el espectro de 1H . La señal a campo bajo perteneciente al C-6' (δ_C 67,0), comparada con la señal correspondiente al C-6'' (δ_C 61,1), indicó el enlace glicosídico entre el C-1'' y el C-6', y la constante de acoplamiento de H-1''/H-2'' ($J = 2.72$, axial ecuatorial) indicó un enlace α -glicosídico. Las demás señales de 1H y ^{13}C , pertenecientes a los desplazamientos típicos de azúcar, indicaron una unidad tipo digalactosa^{[50],[51]}.

Otro sistema de spines fue asignado a una unidad tipo glicerol, debido a las señales observadas en los espectros de ^1H y ^{13}C ; además de las correlaciones observadas en los espectros de dos dimensiones de COSY y HSQC (δ_{H} 4.29 y 4.14, δ_{C} 62.0; δ_{H} 5.10, δ_{C} 70.5; δ_{H} 3.81 y 3.62, δ_{C} 67.2).

El resto de las señales en los espectros de RMN se asignaron a dos cadenas saturadas de ésteres de ácidos grasos. De acuerdo al ion molecular obtenido, se determinó que las cadenas debían ser las pertenecientes a los correspondientes dodecanóico y tridecanóico.

Las señales observadas en los espectros coinciden con un compuesto llamado ocimumoside B^[51], pero con la diferencia en el número de metilenos en la cadena saturada de ácidos grasos. De acuerdo a la referencia encontrada, éste compuesto tuvo una actividad biológica como antiestrés; y sirvió de guía para la elucidación del compuesto **2**. Es de notar que la presencia de cadenas de ácidos grasos impares en sistemas biológicos no es común, sin embargo existen reportes de moléculas tipo glicolípidos con cadenas de 15 átomos de carbono aislados de plantas^[52].

A continuación se presenta la estructura propuesta para el compuesto **2**. La estructura propuesta para el compuesto **2** no ha sido reportada en la literatura.



Compuesto **2**

III.3 Elucidación del compuesto 3.

El compuesto **3** se presentó como un sólido amorfo de color beige, soluble sólo en DMSO.

Los datos de los espectros de RMN de ^{13}C (Anexo 14), ^1H (Anexo 15) y DEPT (Anexo 16), en DMSO; revelaron la presencia de señales iguales a las encontradas en los espectros del compuesto **1**, por lo que se pensó en una estructura de las mismas características. En la tabla 10 se muestran las señales asignadas a los distintos carbonos y protones.

Tabla 10: Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN del compuesto 3.

Posición	δ_{C} (mult.) ^a	δ_{H} (int, mult., J en Hz)
1a	63.2 (t)	4.33 (1H, dd, 12.05, 2.14)
1b		4.14 (1H, dd, 12.05, 7.39)
2	70.3 (d)	5.13 (1H, m)
3a	65.2 (t)	3.88 (1H, dd, 16.38, 5.83)
3b		3.30 – 3.40*
1'	98.9 (d)	4.56 (1H, d, 3.69)
2'	72.2 (d)	3.18 (1H, m)
3'	73.5 (d)	3.30 – 3.40*
4'	74.9 (d)	2.92 (1H, m)
5'	69.1 (d)	3.77 (1H, m)
6'a	55.3 (t)	2.88 (1H, m)
6'b		2.56 (1H, m)
1''	172.9 (s)	-
1'''	173.0 (s)	
2'' – 2'''	34.1 – 34.0 (t)	2.26 (4H, m)
3'' – 3'''	31.9 (t)	1.49 (4H, m)

4'' – 17''	29.0 – 29.6 (t)	1.23 (54H, m)
4''' – 17'''		
18'' – 18'''	14.5	0.85 (6H, t, 6.38)

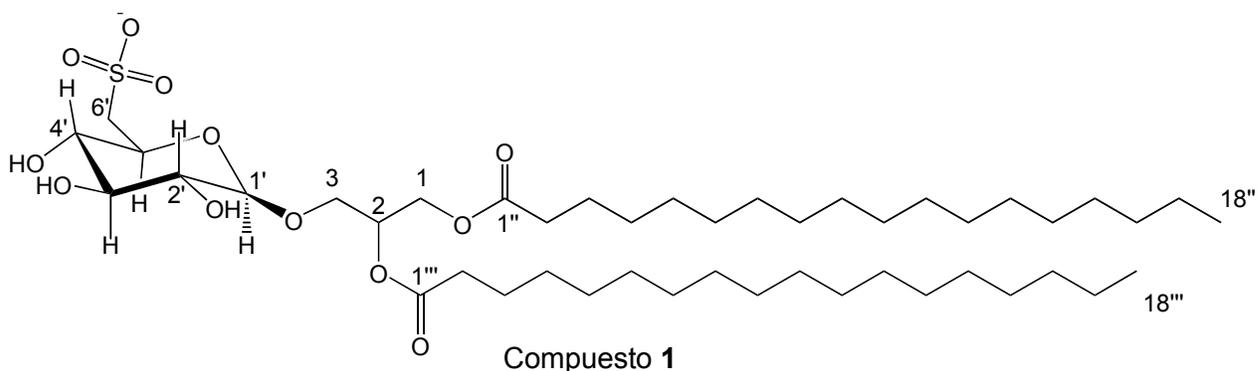
*Solapado con la señal de agua.

^aMultiplicidad encontrada con el experimento DEPT.

De acuerdo al análisis de las integrales del espectro de ¹H, se concluyó que las cadenas saturadas de ésteres de ácidos grasos tenían que ser de distinta longitud, en comparación con las cadenas lipídicas del compuesto **1**. La intensidad de los portones correspondientes a los metilenos de las cadenas saturadas de ésteres de ácidos grasos, calculada con la integral de la señal ancha a δ_H 1.23, fue de 54H; lo que correspondió a dos cadenas de 18 carbonos cada una.

El análisis de las demás señales en los espectros de RMN de ¹³C y ¹H es el mismo realizado en la descripción del compuesto **1**, incluyendo la presencia del grupo sulfonato enlazado al carbono 6' del azúcar (α - glucopiranososa).

La estructura tentativa del compuesto **3** es la siguiente:



La verificación de esta estructura está sujeta a la obtención del ión molecular y un espectro de masas, que permita la determinación inequívoca de la fórmula molecular.

III.4 Elucidación del compuesto 4.

El análisis de la data de los espectros de RMN (MeOH – d_4) de ^{13}C (Anexo 17) y ^1H (Anexo 18), en MeOH; guiado por los espectros DEPT (Anexo 19), ^1H – ^1H COSY (Anexo 20) y HSQC (Anexo 21); permitieron la asignación de todas las señales de protones y carbonos del compuesto mayoritario presente en la mezcla PcAM1.2.

El análisis del espectro de RMN DEPT, permitió la asignación de dos metilos relativamente desapantallados, dos metilenos a campo bajo y un carbonilo tipo carboxílico. La data obtenida en el espectro de dos dimensiones HSQC, permitió la asignación de los protones correspondientes a cada carbono, como se puede observar en la tabla 11.

Tabla 11: Desplazamientos químicos y correlaciones observadas en los espectros de RMN del compuesto 4, presente en la mezcla de la fracción PcAM1.2

Posición	δ_{C} (mult.) ^a	δ_{H} (Int., mult., J en Hz)	COSY
1	179,7 (s)	-	-
2	22,6 (q)	1,91 (3H, s)	-
1'	54,1 (t)	3,44 (2H, t, 6,97)	2'
2'	46,0 (t)	3,25 (2H, t, 7,34)	1'
3'	42,9 (q)	2,81 (3H, s)	-

^aMultiplicidad encontrada con el experimento DEPT.

El desplazamiento químico observado del carbono en la posición 2 (δ_{C} 22,6 ppm) se asignó a un metilo de un grupo acetilo. El acoplamiento observado en el espectro de protones, junto con las correlaciones observadas en el espectro de dos dimensiones COSY, para las señales δ_{H} 3,44 (t) y δ_{H} 3,25 (t); indicaron la proximidad de los

metilenos desapantallados; conformando un sistema X-CH₂-CH₂-X (Donde X representó grupos con ausencia de protones para acoplarse). El desplazamiento químico observado para el metileno en la posición 2' (δ_C 46,0 ppm, δ_H 3,25 (t)), indicó el enlace con un átomo de nitrógeno; mientras que el desplazamiento del metileno en la posición 1' (δ_C 54,1 ppm, δ_H 3,44 (t)) indicó el enlace con un átomo de oxígeno.^[53]

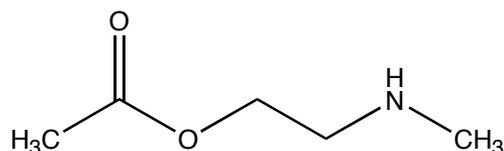
Por último, el desplazamiento químico observado en los espectros de ¹H y ¹³C del carbono en la posición 3' (δ_C 42,89 ppm y δ_H 2,81), se asignó a un metilo enlazado a un átomo de nitrógeno.

Se realizó un análisis de espectrometría de masas, por cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico, previa sililación de la muestra con BSTFA, para evitar descomposición y reacción entre los componentes de la mezcla; y obtener el compuesto persililado con trimetilsilano (TMS).



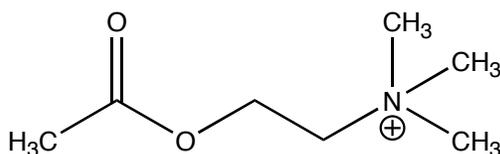
El compuesto mayoritario presentó un espectro de masas (Anexo 22) con dos iones importantes: uno a 190 m/z, que se puede interpretar como la masa del compuesto sililado mas un protón [M+H]⁺; y otro, muy abundante, a 117 m/z que se interpreta como la pérdida del TMS (M+H-TMS)⁺, verificado por la señal a 73 m/z correspondiente al trimetilsilano.

De acuerdo a los datos espectroscópicos, se propuso la siguiente estructura:



Se puede decir que según lo observado en el espectro de masas, que el nitrógeno de la amina tuvo una reacción ácido – base con el HCl producido en la formación del derivado sililado.

En la revisión bibliográfica realizada, no se encontró que este compuesto haya sido aislado como producto natural, sin embargo, existe un compuesto llamado acetilcolina (**53**) (neurtransmisor del sistema nervioso humano) que difiere sólo en la incorporación de 2 metilos enlazados al nitrógeno de la amina, convirtiéndola en una amina cuaternaria.



53

Los valores de desplazamiento químico observados en los espectros calculados con el programa ACD Lab coincidieron bastante con los observados experimentalmente.

III.6 Elucidación del compuesto 5.

El compuesto **5** se presentó como un sólido amorfo amarillento, soluble en solventes polares (AcOEt, MeOH y CH₃CN). El análisis de los espectros de RMN (MeOH *d*₄) de ¹³C (Anexo 23) junto con el análisis DEPT (Anexo 24), reveló la presencia de 3 metilenos desapantallados, un carbono carboxílico y un metilo alifático; como se observa en la tabla **12**.

Tabla 12: Desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN del compuesto 5.

Posición	δ_C	δ_H (mult., J en Hz)
1	179,0	
2	39,8	2,38 (t, 6,84)
3	63,7	3,75 (t, 6,50)
1'	59,1	4,05 (q, 7,18)
2'	14,0	1,27 (t, 7,18)

El acoplamiento observado en el espectro de ¹H (Anexo 25), para las señales de los carbonos 2 (δ_C 39,8 y δ_H 2,38(t)) y 3 (δ_C 63,7 y δ_H 3,75(t)); indicaron la proximidad de los metilenos desapantallados; conformando un sistema X-CH₂-CH₂-X (Donde, al igual que el compuesto **4**, X representó grupos con ausencia de protones para acoplarse). El desplazamiento químico de los protones del carbono 2, indicó la proximidad con un grupo carboxilo, mientras que el desplazamiento de los protones del carbono 3 reveló la proximidad con un átomo de oxígeno.

Luego, el acoplamiento observado entre los protones de los carbonos 1' (δ_C 59,07 y δ_H 4,05(q)) y 2' (δ_C 14,02 y δ_H 1,27(t)), se descifró como un patrón típico de grupos etoxi.^[54]

De acuerdo al análisis de la data de RMN, realizado anteriormente, se pueden proponer 2 estructuras que cumplen con los resultados espectroscópicos: el 3-hidroxi-propanoato de etilo y el ácido 3-etoxi-propanóico (**ver figura 6**).

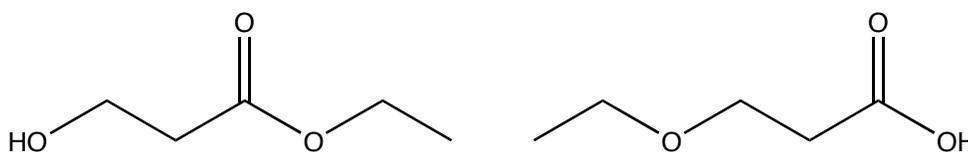


Figura 6: Posibles estructuras del compuesto 5

El análisis del espectro de masas (Anexo 26), realizado por cromatografía de gases acoplada con un espectrómetro de masas con ionización por impacto electrónico, indicó un ion a 100 m/z, que se interpretó como la pérdida de un grupo $-OH$ como H_2O , siendo más probable en alcoholes que en ácidos, aunque se han encontrado ácidos carboxílicos que son capaces de perder el grupo $-OH$ ^[55] de esta forma. Luego, se observó un pico de mayor abundancia a 73 m/z y otro de menor abundancia a 45 m/z, que se pueden interpretar como un fraccionamiento de la siguiente forma (**ver figuras 7 y 8**):

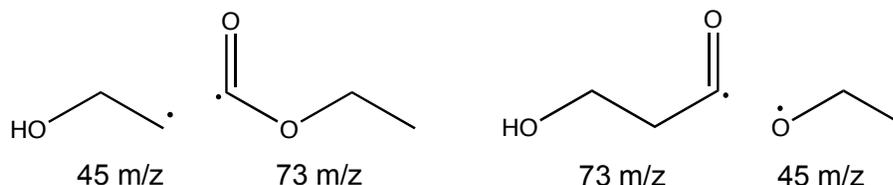


Figura 7: Fraccionamiento del 3-hidroxi-propanoato de etilo

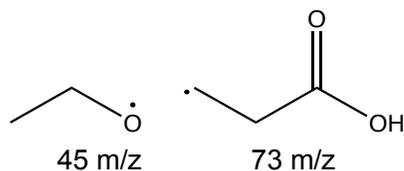


Figura 8: Fraccionamiento del ácido 3-etoxi-propanóico

El fraccionamiento del éster (figura 7) se puede explicar mediante el mecanismo de ruptura o fraccionamiento α al carbonilo: luego de la ionización de la molécula que se ocurre en el oxígeno del carbonilo queda un electrón, no enlazante, desapareado que promueve la ruptura en los enlaces adyacentes al grupo carboxilo^[56], en este caso, ambos iones formados como consecuencia del fraccionamiento α tienen una relación m/z igual a 73; lo que explicaría la alta abundancia del pico. La otra estructura propuesta (el ácido) no posee una ruptura que genere un ión positivo con masa 73 m/z, realizando la primera ionización en los electrones no enlazantes del oxígeno del carbonilo; sino que para que esto suceda, debe haber una ruptura en el enlace sigma entre el carbono 3 y el oxígeno del grupo etoxi; cosa que energéticamente es menos favorecida que el fraccionamiento α .

Debido a lo dicho anteriormente, se puede decir que la estructura del compuesto **5** probablemente sea el 3-hidroxi-propanoato de etilo; sin embargo, la otra estructura (ácido 3-etoxi-propanóico) no se puede descartar del todo, debido a que el desplazamiento químico del carbonilo tipo carboxílico observado en el espectro de RMN de ^{13}C , se asemeja más al valor observado experimentalmente en los ácidos carboxílicos^[57].

No se encontró evidencia de la presencia de los compuestos propuestos en sistemas naturales (productos naturales). Sin embargo, la posibilidad de encontrarlos en la naturaleza no es remota.

III.6 Resultados y discusión de las pruebas biológicas:

En el proceso inflamatorio, la concentración de óxido nítrico aumenta, debido a que los macrófagos activados secretan radicales libres de oxígeno y óxido nítrico. El efecto de los metabolitos secundarios obtenidos del alga verde *Penicillus capitatus*, sobre la producción de NO inducida por el LPS en los macrófagos murinos RAW 264.7, fue investigada a través de la medición del nitrito liberado en el medio de cultivo, por la reacción de Griess.

Los macrófagos juegan un importante rol en las enfermedades inflamatorias a través de la liberación del NO, prostaglandinas, y citocinas como el factor de necrosis tumoral, involucrado en las respuestas inmunes^[58]. La producción de estos mediadores de los macrófagos es vista en muchos tejidos inflamados, siguiendo la exposición a estimulantes inmunes, los que incluyen el lipopolisacárido bacteriano (LPS). Cuando el NO es sintetizado en grandes cantidades por células inflamatorias activadas, el tiene propiedades citotóxicas y puede estar involucrado en la patogénesis de las condiciones inflamatorias agudas y crónicas. La excesiva producción del NO, está involucrada en enfermedades tales como la artritis reumatoide, hepatitis crónica, y fibrosis pulmonar^[59]. Así, la inhibición de los mediadores inflamatorios en respuesta a estímulos inflamatorios podría ser una útil estrategia terapéutica en las enfermedades inflamatorias. Además, la naturaleza de radical libre del NO y su alta reactividad con el anión superóxido para producir peroxinitrito (ONOO^-), hace al NO una potente molécula pro-oxidante, capaz de inducir daño oxidativo, y ser potencialmente perjudicial hacia blancos celulares. Los efectos citotóxicos del NO involucran la inhibición de enzimas mitocondriales^[60] y la activación de la ciclooxigenasa^[61]

En las figuras 9 y 10, se puede observar el efecto de los compuestos 1, 2, 3, 5, el compuesto no caracterizado (Compuesto NC) y apigenina, sobre la síntesis de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Los macrófagos fueron pretratados durante 60 minutos con los compuestos, o vehículo, previó a 72 h de estimulación con

LPS 1 μ g/mL. Los datos representan los valores promedios \pm SD (n= 4). *p<0,05; **p<0,01. Representan un efecto significativo respecto al control estimulado con LPS.

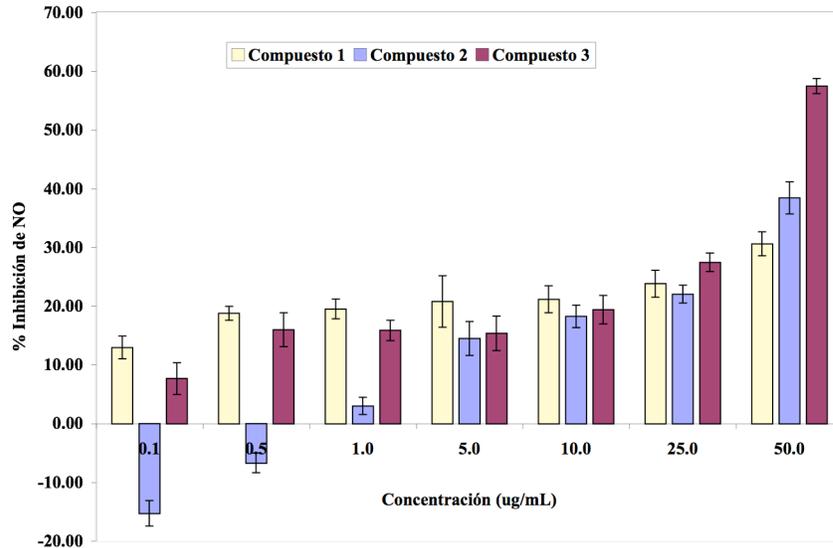


Figura 9

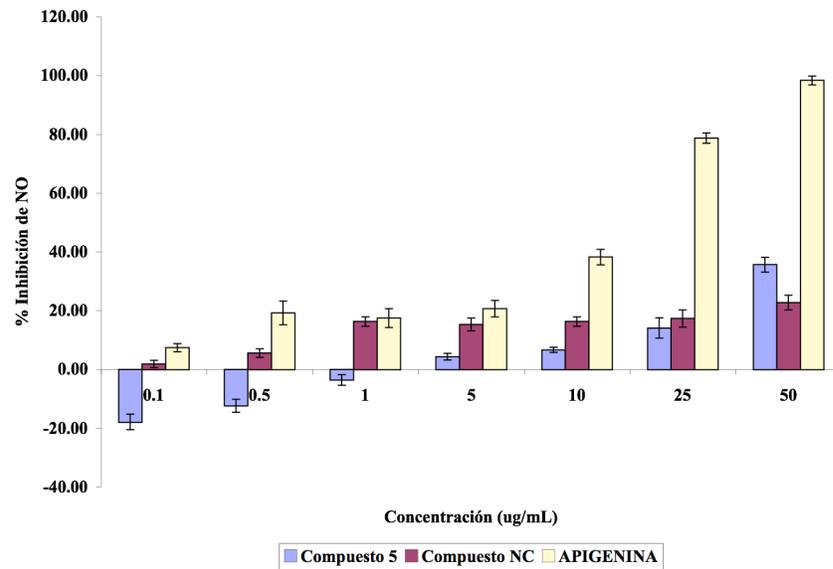


Figura 10

Se observó, en general para todos los compuestos, un aumento en la inhibición del NO a medida que se aumentó la concentración del compuesto. El compuesto más activo y que se le pudo calcular el IC₅₀, fue el compuesto **3 (tabla 13)**. Se pudo decir que la inhibición del NO estuvo relacionada a la cadena lipídica del compuesto; debido a que en comparación al compuesto **1**, que tiene una estructura química similar con diferencias en la cadena lipídica, el compuesto **3** tuvo mucha más inhibición de NO.

Los compuestos 2 y 5 tuvieron un comportamiento dual respecto a la inhibición del NO; a concentraciones bajas se observó que fueron capaces de incrementar la producción del NO, y a concentraciones mayores de 1 µg/mL se observó la inhibición del mismo. Esto fue interesante debido a que existe la posibilidad de tener efectividad respecto a enfermedades que afecten el sistema inmunológico o de respuesta inflamatoria.

Tabla 13: Efecto de los compuestos 1, 2, 3, 5 y el compuesto NC sobre la producción de nitrito en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS

Extracto	IC ₅₀ (µg/mL)
Compuesto 1	>50
Compuesto 2	>50
Compuesto 3	43,62 ± 10,96
Compuesto 5	>50
Compuesto NC	>50
Controles	IC ₅₀ (µM/mL)
Quercetina	7,03± 0,55
Aminoguanidina	9,54± 0,87
Apigenina	10,41±2,92

Los valores de IC₅₀ fueron calculados usando una curva sigmoideal ajustada dosis- respuesta (pendiente variable) con el programa GraphPad Prism versión 4.0. Los valores representan el IC₅₀ en µg/mL ± el intervalo de confianza 95%. o µM para los controles positivos

III.7.2 Viabilidad celular.

Finalmente, cuando fue evaluada la viabilidad celular por el método del MTT en los macrófagos RAW 264.7, se encontró que de los cinco metabolitos marinos estudiados, sólo el compuesto **1** ejerció una inhibición significativa de la proliferación celular a la concentración de 50 µg/mL (ver tabla 14). De estos resultados se desprende que la inhibición de la producción de óxido nítrico observada para los compuestos aislados fue una consecuencia de la inhibición de la expresión o la actividad enzimática de la sintasa inducible del óxido nítrico (NOS-2), o un efecto sobre la captación del radical de óxido nítrico.

Tabla 14: Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre la viabilidad de los macrófagos mūridos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Concentración (µg/mL)	% de Viabilidad celular		
	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
0,1	108,51 ± 3,93	103,50 ± 3,74	105,34 ± 3,44
0,5	97,74 ± 5,87	102,73 ± 2,51	107,20 ± 4,18
1	104,62 ± 2,92	104,54 ± 4,68	103,96 ± 3,91
5	108,33 ± 5,74	102,34 ± 5,21	103,23 ± 7,89
10	92,97 ± 3,85	103,17 ± 3,40	91,65 ± 3,09
25	94,33 ± 12,05	107,70 ± 3,65	101,53 ± 6,35
50	66,38 ± 6,68	96,35 ± 3,04	102,84 ± 4,08

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n \geq 4$. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

Tabla 15: Efecto de los compuestos 5, Compuesto NC y APIGENINA, sobre la viabilidad de los macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% de Viabilidad celular		
	Compuesto 5	Compuesto NC	APIGENINA
0,1	102,64 \pm 4,73	103,44 \pm 4,00	103,46 \pm 4,18
0,5	101,58 \pm 3,01	97,58 \pm 4,48	98,11 \pm 3,84
1	101,44 \pm 6,61	95,50 \pm 4,36	98,37 \pm 4,45
5	96,74 \pm 7,16	101,05 \pm 2,90	99,97 \pm 4,75
10	94,47 \pm 11,20	103,53 \pm 3,65	99,20 \pm 8,37
25	104,07 \pm 8,01	100,57 \pm 4,90	95,73 \pm 3,10
50	102,93 \pm 3,90	105,09 \pm 5,24	92,15 \pm 3,11

Los valores presentados representan los porcentajes relativos al valor control (100%), siendo los promedios \pm SD para un $n \geq 4$. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

En conclusión, el presente estudio mostró que los compuestos 1, 2, 3, 5 y el compuesto NC, presentaron actividad antiinflamatoria *in vitro* como una consecuencia de la inhibición de la producción de NO en macrófagos de ratón activados. El orden de actividad de los compuestos a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ fue: 3>>2>5>NC>1. Con la excepción de compuesto 1 (a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$), todos los metabolitos marinos evaluados no fueron citotóxicos a los macrófagos RAW 264.7. Estudios farmacológicos preclínicos se están llevando en nuestro laboratorio de manera tal de determinar el mecanismo de acción antiinflamatorio de los compuestos evaluados.

IV. CONCLUSIONES

- A partir del extracto de hexano se lograron aislar, purificar e identificar 2 compuestos (**1 y 3**) tipo sulfoquinovosil diacil glicerol, lo cuales no han sido reportados para algas verdes.
- Del extracto de hexano se aisló, purificó e identificó un posible compuesto nuevo tipo digalactolípido (**2**).
- Del extracto hidrometanólico se lograron aislar 2 compuestos: uno de tipo amino éster (compuesto **4**), presentado como una mezcla de metabolitos; y otro cuya data espectroscópica coincidió con el 3-hidroxi-propanoato de etilo y el ácido 3-etoxi-propanóico (compuesto **5**).
- El compuesto 3 presentó una mayor actividad antiinflamatoria ($IC_{50} = 43.62$) debido a que inhibió la producción de NO sin ser citotóxico.
- El compuesto 1 fue citotóxico a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, y se puede decir que parte de la inhibición del NO mostrada por este compuesto, a dicha concentración, fue causada por la muerte celular.

V. RECOMENDACIONES.

- Trabajar con mayores cantidades de material vegetal seco, a fin de estudiar los compuestos minoritarios presentes en los extractos.
- Realizar otras pruebas biológicas a los extractos del alga *Penicillus capitatus* que no fueron solubles en DMSO, para determinar la actividad antiinflamatoria.
- Realizar las pruebas de captación del óxido nítrico y de actividad antioxidante para los metabolitos aislados del alga *Penicillus capitatus*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bhakuni, D. S y Rawat, D. S. "Bioactive Marine Natural Products". Editorial Anamaya Publishers. 1era Edición. **2005**
- [2] Osorio, M. A. "Características Generales de las Algas". Editorial Ilustrados.com. **2005**.
- [3] Curtis, H. y Barnes, S. "Biología". Editorial Médica Panamericana. 6ta Edición. **2001**.
- [4] Reiner, E., Topliff, J., Wood, J. D. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40, 1401. **1962**.
- [5] Belofsky, G. N., Jensen, P. R., Renner, M. K., Fenical, W. *Tetrahedron*. 54, 1715 – 1724. **1998**.
- [6] Kolesnicova, S. A., Kalinovsky, A. I., Fedoroz, S. N., Shubina, L. K., Stolnik, V. A. *Phytochem.* 67, 2115 – 2119. **2006**.
- [7] Numata, A., Takahashi, C., Ito, Y., Tekada, T., Kawai, K., Usami, Y., Matsumura, E., Imachi, M., Ito, T., Hasegawa, T. *Tetrahedron Letters*. 34(14), 2355 – 2358. **1993**.
- [8] Chen, C., Inamura, N., Nishikima, M., Adachi, K., Sakai, M., Sano, H. *J. Antibiot.* 49, 998-1004. **1996**.
- [9] Lobel, P. S. y Ogden J. C. *Marine Biology*. 64, 173. **1981**.
- [10] Hay, M. E. *Acuatic Botany*. 11, 97. **1981**.
- [11] Sun, H. H. y Fenical, W. *Tetrahedron letters*. 685. **1979**.
- [12] Paul, V. J., Sun, H. H. y Fenical, W. *Phytochem.* 21, 468. **1982**.
- [13] Nakatsu, T., Ravi, B. N. y Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* 46, 2435. **1981**.

- [14] Wells, R. J. y Barrow, K. D. *Experimentia*. 35, 1544. **1979**.
- [15] Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fatturoso, E., Magno, S. y Mayol, L. *Tetrahedron Letters*. 19(38), 3593. **1978**.
- [16] Blackman, A. J. y Wells, R. J. *Ibid.* 19(33), 3063. **1978**.
- [17] Capon, R. J., Ghisalberti, E. L. y Jeffries, P. R. *Aust. J. Chem.* 34, 1775. **1981**.
- [18] Paul, V. J. y Fenical, W. *Science*. 221, 747. **1983**.
- [19] Paul, V. J. y Fenical, W. *Tetrahedron Letters*. 23, 5017. **1982**.
- [20] Capon, R. J., Ghisalberti, E. L. y Jeffries, *Phytochem.* 22, 1465. **1983**.
- [21] <http://www.algaebase.org>
- [22] Paul, V. J. y Fenical, *Tetrahedron*. 40, 2913. **1984**.
- [23] Puglisi, M. P., Tan, L. T., Jensen, P. R. y Fenical, W. *Tetrahedron*. 60, 7035. **2004**.
- [24] Li, X. C., Jacob, M. R., Ding, Y., Agarwal, A. K., Smillie, T. J., Khan, S. I., Neagle, D. G., Ferreira D. y Clark, A. M. *J. Nat. Prod.* 69, 542. **2006**.
- [25] Hewson, W. D. y Hager, L. P., *J. Phycol.* 16, 340. **1980**.
- [26] Theiler, R., Cook, J. C. y Hager, L. P., *Science*. 202, 1094. **1978**.
- [27] Nieder, M. y Hager, L., *Arch. Biochem. and Biophys.* 240, 121. **1985**.
- [28] Bordez, R., Martínez, M., García, E. y Guisado Barrilao R., *Revista de Enfermería de la Universidad complutense de Madrid*. 4, 30 – 33. **1994**.
- [29] Punched, N., Whelan, C. y Adcock, T., *J. of Inflammation*. 1 – 4. **2004**.

[30] <http://es.wikipedia.org/wiki/Inflamacion>

[31] Bordés, R., Beltrán, M., García, O. y Barrilao, G., *Revista de Enfermería de la Escuela Universitaria de Enfermería de Albacete*, 4, 30 – 33. **1994**.

[32] Okai, Y. y Higashi-Okai, K., *Inter. J. Inmunopharmac.*, 19(6), 355 – 358. **1997**.

[33] Tae, J., Yoo, JY., Kim, JA. y Kang, OH., *Clinica Chimica Acta*. 330, 165 – 171. **2003**.

[34]. Zviagintseva, T., Shevchenko, N., Nazarova, I., Scobun, A., Lukianov, P. y Elyakova, L. *Comp. Biochemistry and Phys. Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 126(3): 209 – 215. **2000**.

[35] Kuo-Feng, H. *J. Agric. Food Chem.* 56, 304 – 311. **2006**.

[36] Yu, Y., Correll, P. H. y Vandell, J., *J. Biochem. Biophys. Acta*. 1581, 1589-1599. **2002**.

[37] Berge, J., Debiton, E., Dumay, J. y Durand, P., *Barthomeuf, C.* 50, 6227 – 6232. **2002**.

[38] Wiemer, D.F., Idler, D. D. y Fenical, W. *Experientia* 47, 851 – 853. **1991**.

[39] Hye-Dong, Y. y Videlenole. *J. Nat. Prod.* 65(1), 51 – 53. **2002**.

[40] Tan, L.T., Williamson, R.T. y Gerwick, W. H., *J. Org. Chem.* 65, 419-425. **2000**.

[41] Ferrer, D., Fonseca, C. J., García, R. E. y Martínez, P. F. *MEDISAN*, 2(3), 45 – 53. **1998**.

[42] Green, L., Wagner, A., Glogowski, J., Skipper, P., Whisnok, J. y Tannenbaum, S. *Anal. Biochem.*, 126(1), 131 – 138. **1982**.

- [43] Mossmann, T. *J. Immunol. Methods*, 65(1-2), 55 – 63. **1983**.
- [44] Chiang, Y., Chuang, D., Wang, S., Kuo, Y., Tsai, P. y Shyur, L. *J. Ethnopharmacol*, 95(2-3), 409 – 419. **2004**.
- [45] Crews, P., Rodríguez, J. y Jaspars, M., “*Organic Structure Analysis*”, Editorial Oxford. Primera Edición. Pág 333. Estados Unidos de América. **1998**.
- [46] Lepage, M. Daniel, H. y Benson A. *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 157 – 159. (1961).
- [47] Cedergren, R. A. y Hollingsworth, R. I. *J. Lipid Res.* 35, 1452 – 1461. **1994**.
- [48] Araki, S., Sakurai, T., Oohusa, T., Kayama, M. Y Sato, N., *Plant Cell Physiol.* 30(5), 775 – 781. **1989**.
- [49] Marinier, A., Martel, A., Banville, J., Bachand, C., Remillard, R., Lapointe, P., Turmel, B., Menard, M., Harte, W., Wright, J., Todderud, G., Tramposh, K., Bajorath, J., Hollenbaugh, D. Y Aruffo, A. *J. Med. Chem.* 40, 3234 – 3247. **1997**.
- [50] Son, B. W., *Phytochem.*, 29(1), 307 – 309. **1990**.
- [51] Gupta, P., Yadav, D. K., Siripurapu, K. B., Palit, G. y Maurya, R. **2007**.
- [52] Mishra, P., Singh, N., Ahmad, G., Dube A., Maurya, R., *Bioorg. and Med. Chem. Lett.*, 15, 4543 – 4546. **2005**.
- [53] Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. y Simon, W., “*Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*”. Editorial Springer – Verlag. Segunda Edición. Pág: B145, B155, B215, B220. Alemania. **1989**.
- [54] Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J. y Simon, W., “*Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*”. Editorial Springer – Verlag. Segunda Edición. Pág: C170, H55. Alemania. **1989**.

- [55] Silverstein, R., Webster, F. y Kiemle, D., "*Spectrometric Identification of Organic Compounds*". Editorial John Wiley and Sons. Séptima Edición. Pág. 28. **2005**
- [56] McLafferty, F. y Turecek, F., "*Interpretation of Mass Spectra*", Editorial University Sciens Books. Cuarta Edición. Pág. 36. Estados Unidos de América. **1993**.
- [57] Crews, P., Rodríguez, J. y Jaspars, M., "*Organic Structure Analysis*", Editorial Oxford. Primera Edición. Pág 63. Estados Unidos de América. **1998**.
- [58] Adams, D. and Hamilton, T. *Annu. Rev. Immunol.*, 2, 283 – 318. **1984**.
- [59] Cuzzocrea S., Riley, D., Caputi A. and Salvemini, D. *Pharmacol. Rev.* 53(1), 135 – 159. **2001**.
- [60] Nathan, C. *FASEB J.*, 6(12), 3051 – 3064. **1992**.
- [61] Salvemini, D. and Masferrer, J. *Methods Enzymol.*, 269, 12 – 25. **1996**.

VII. ANEXOS

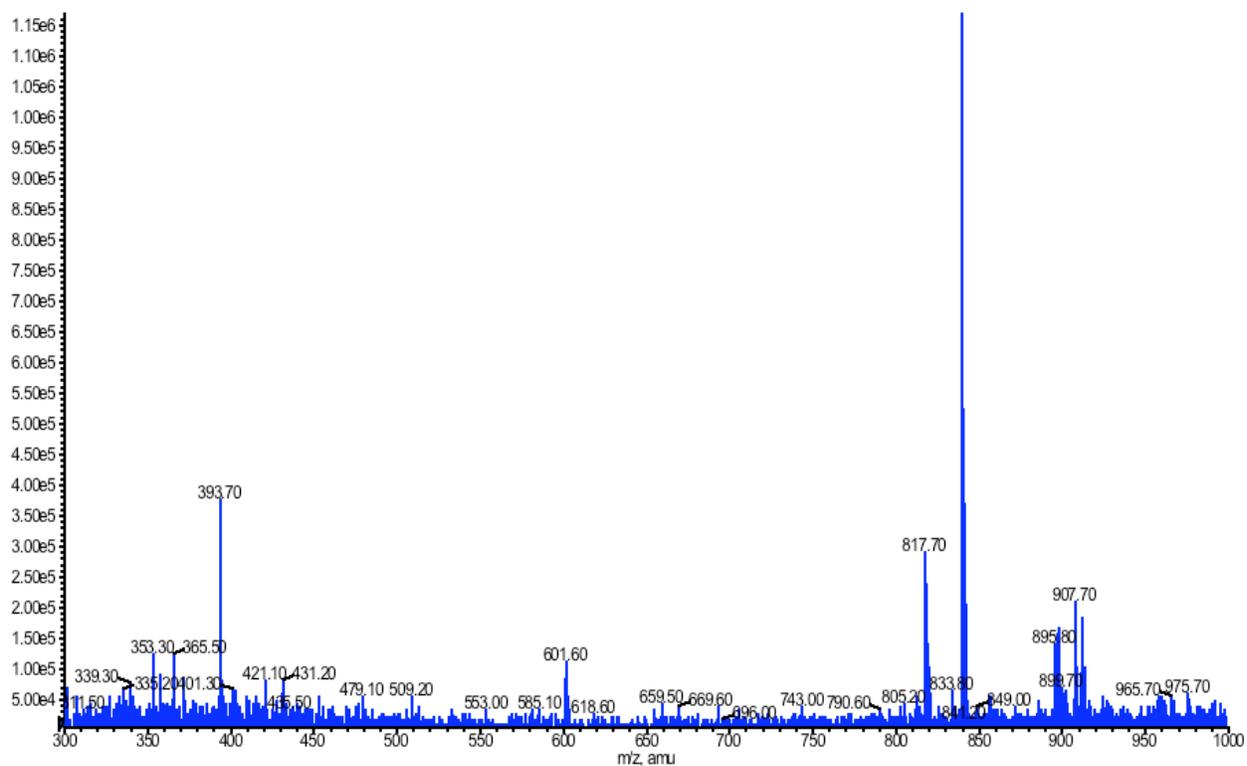
ANEXO 1

Espectro de masas ESI (ión positivo) del Compuesto 1

Sample Name: 2660

■ +Q1: 40 MCA scans from Sample 1 (2660) of PchO Quimca-Compagnone.wiff (Turbo Spray)

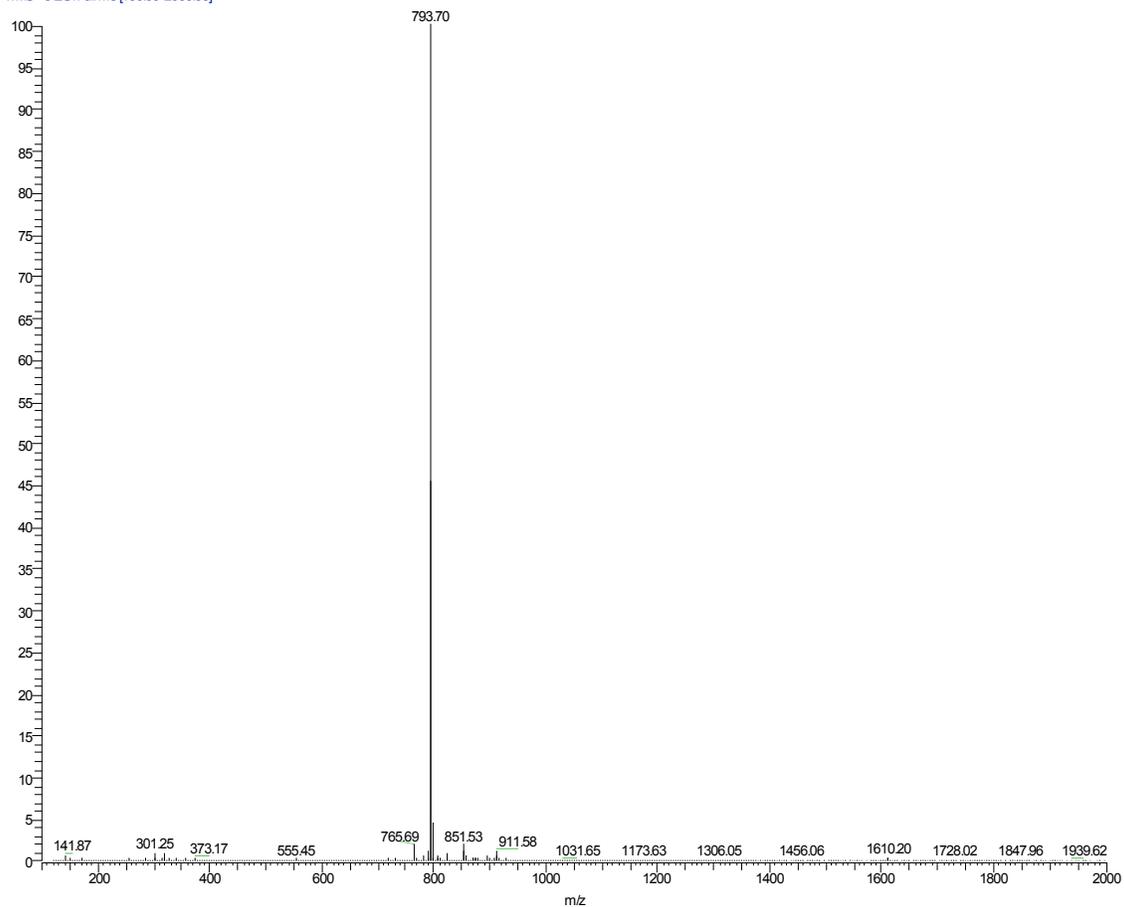
Max. 1.2e6 cps.



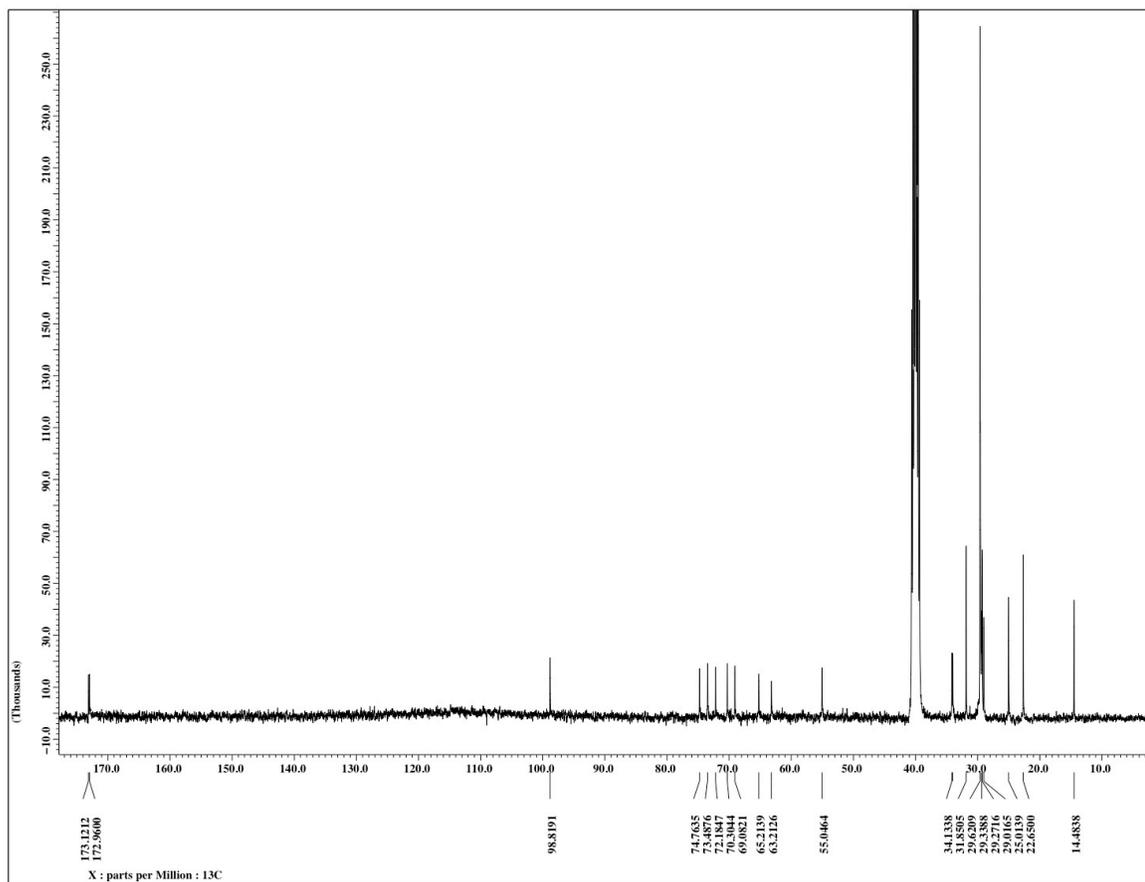
ANEXO 2

Espectro de masas ESI (ión negativo) del compuesto 1.

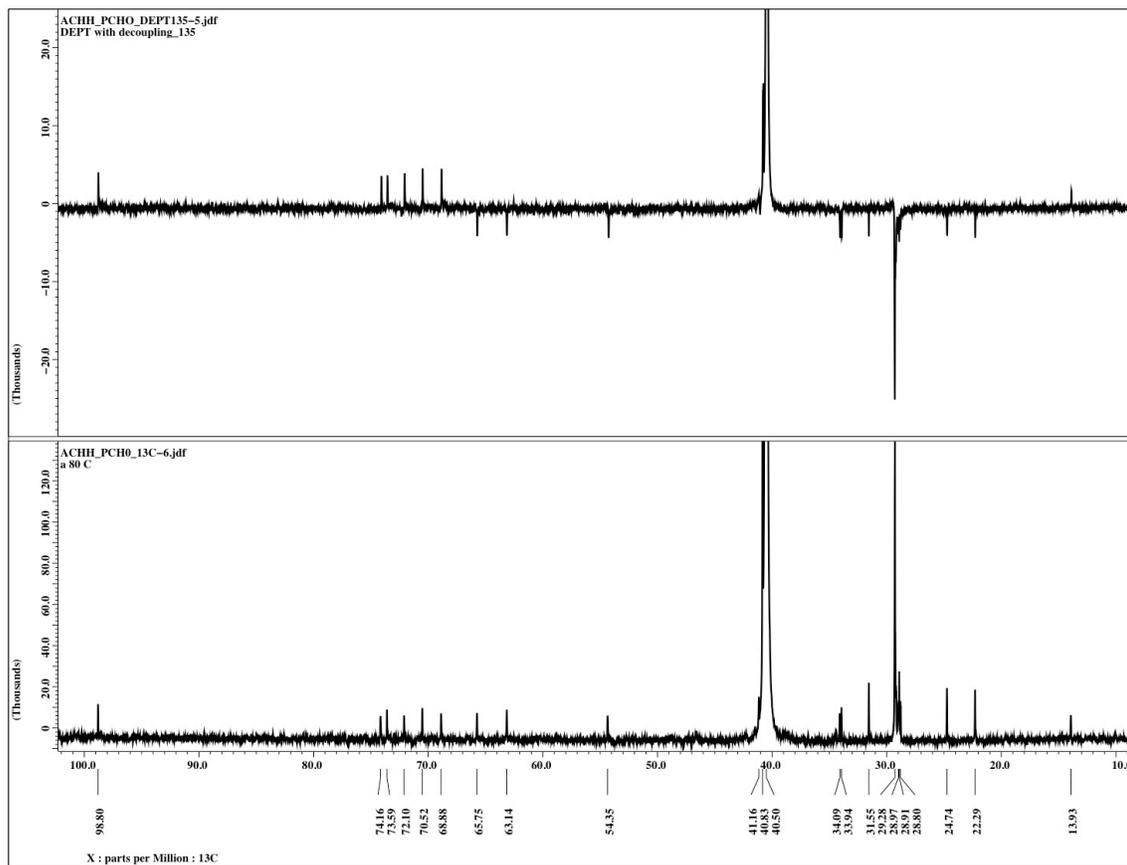
reinaldo_16 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 564E4
T: [MVS - c ESI Full ms [100.00-2000.00]]



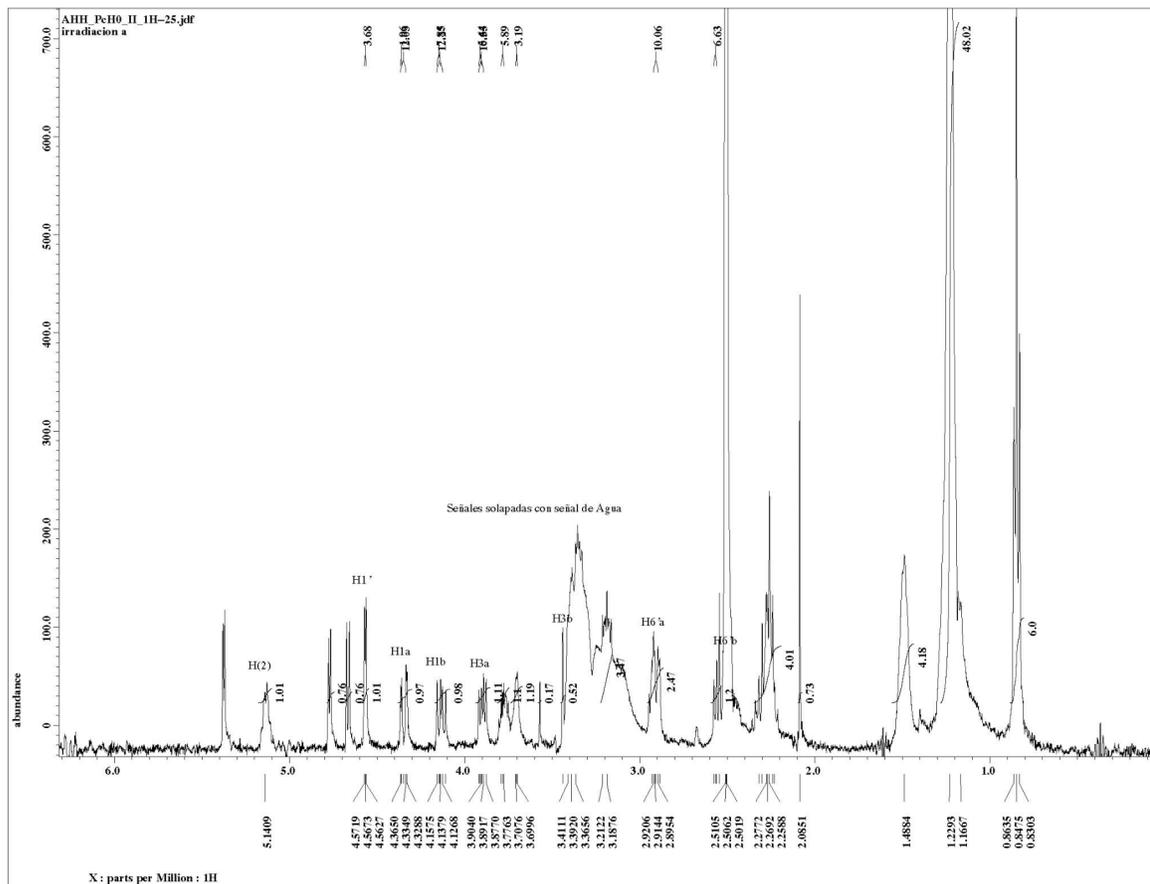
ANEXO 3

Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 1:

ANEXO 4

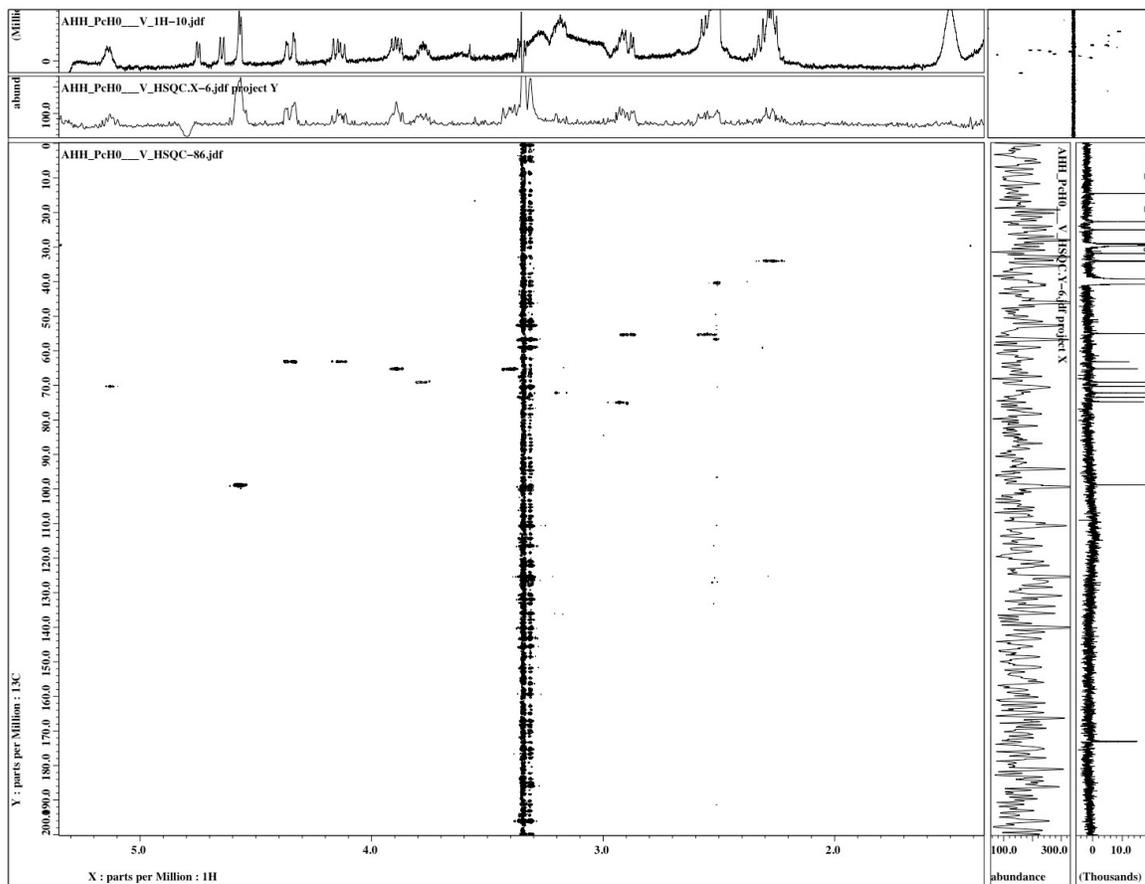
Espectro de RMN DEPT, comparado con el espectro de ^{13}C del compuesto 1

ANEXO 5

Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1

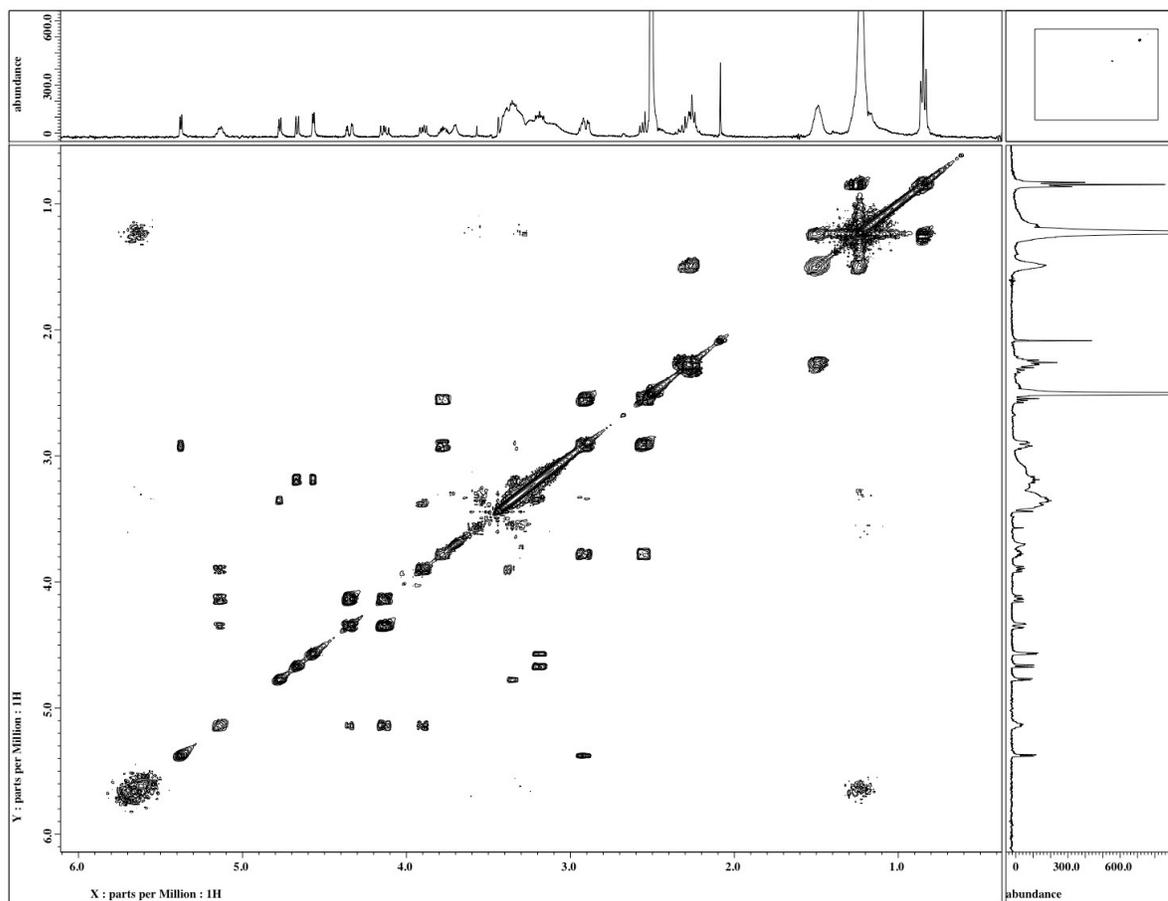
ANEXO 6

Espectros de RMN de dos dimensiones HSQC (para valores de ^1H entre 1,4ppm hasta 5,3ppm) del compuesto 1:



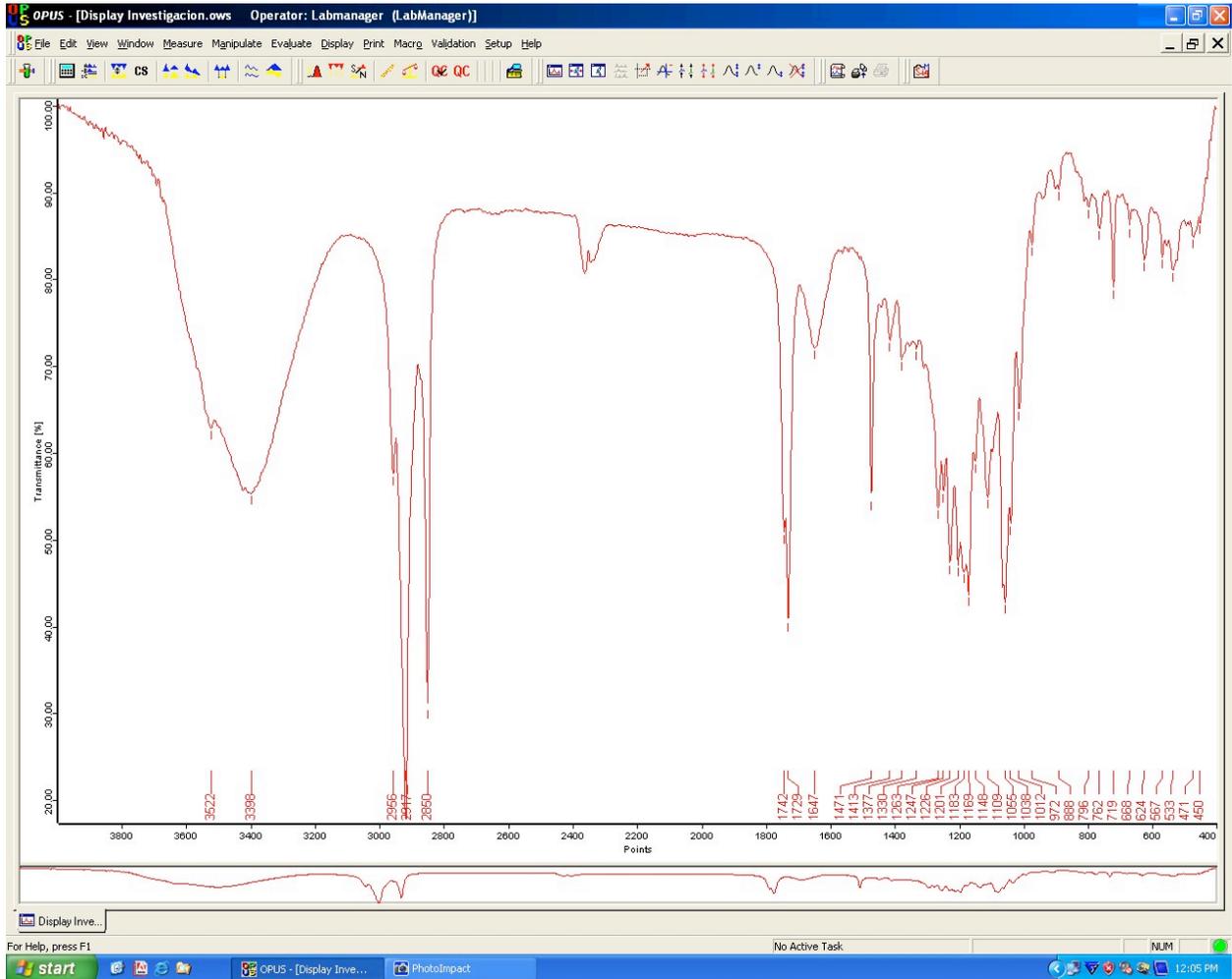
ANEXO 7

Espectro de RMN de dos dimensiones COSY del compuesto 1:



ANEXO 8

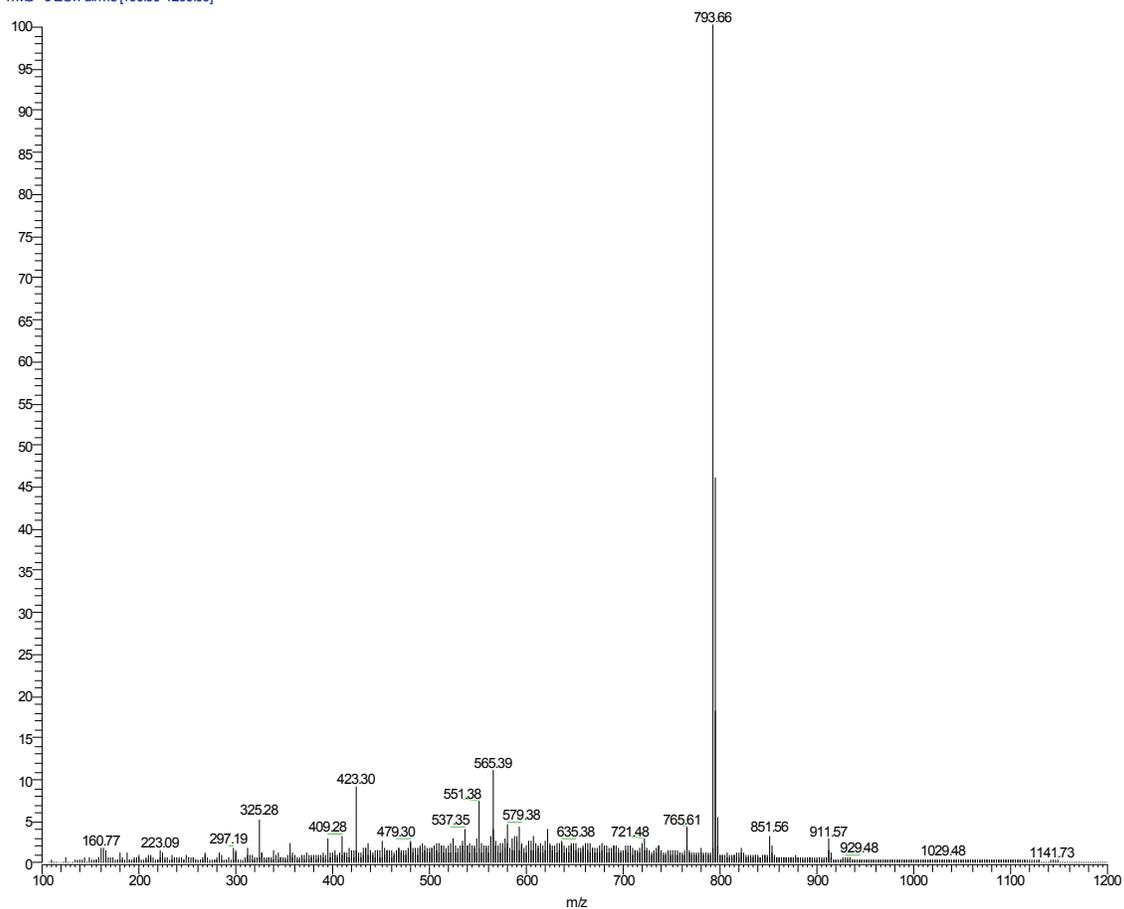
Espectro de Infrarrojo del compuesto 1:



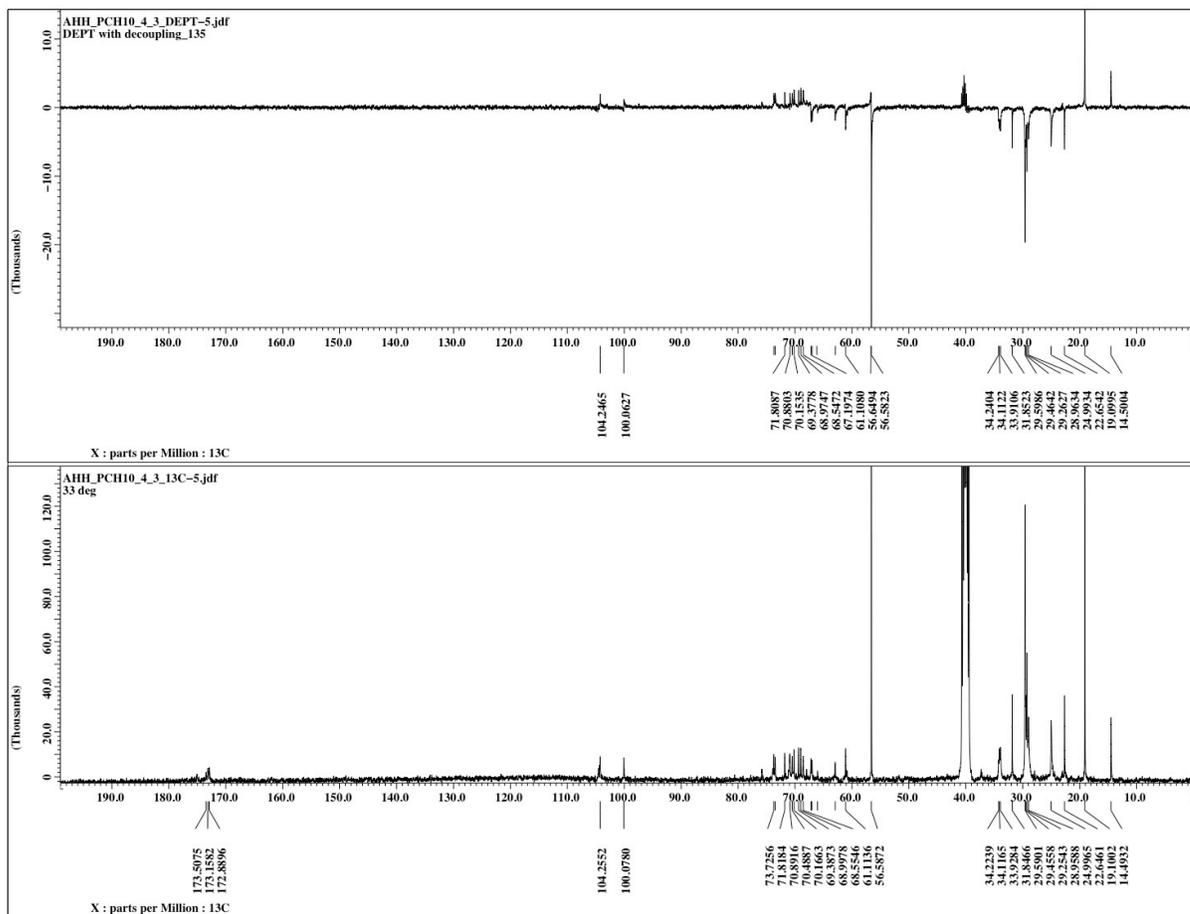
ANEXO 9

Espectro de masas ESI (ión negativo) del compuesto 2:

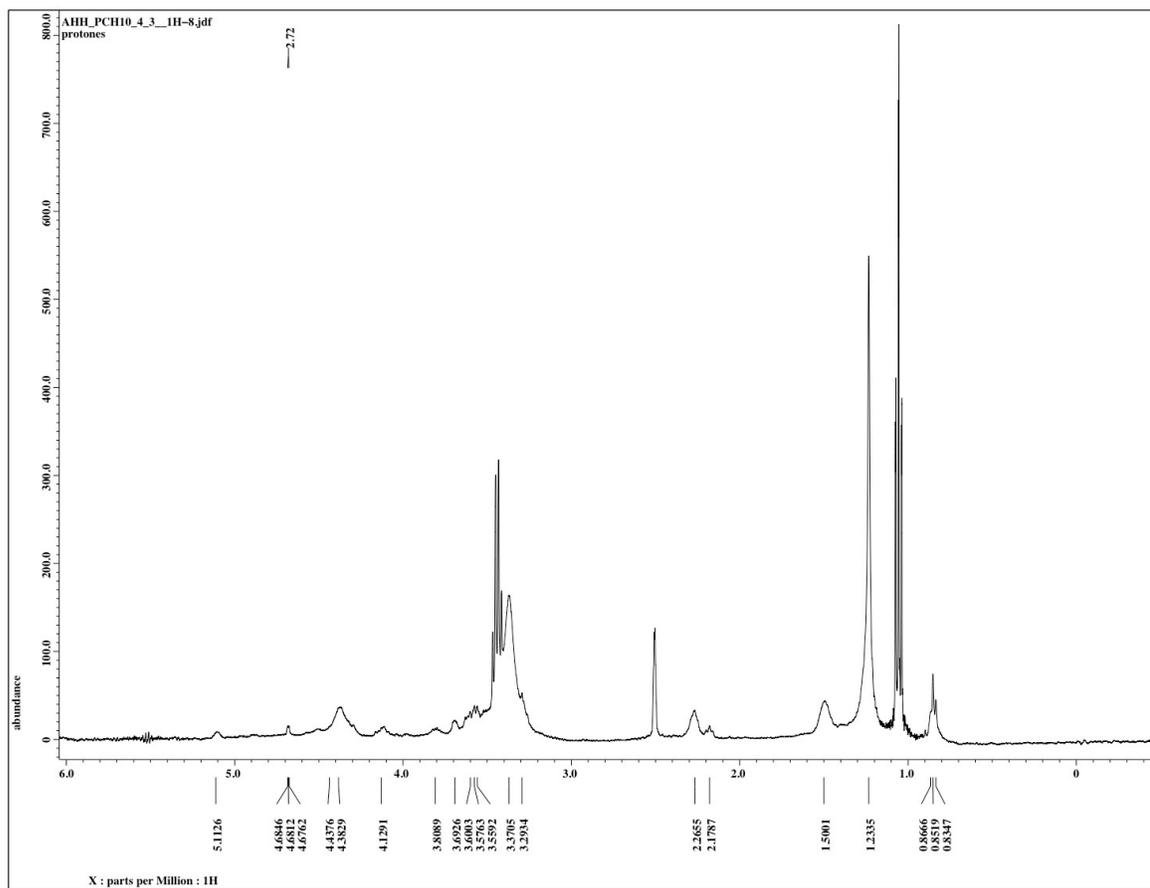
reinaldo_17 #525-621 RT: 12.34-13.45 AV: 97 NL: 5.32E3
T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1200.00]



ANEXO 10

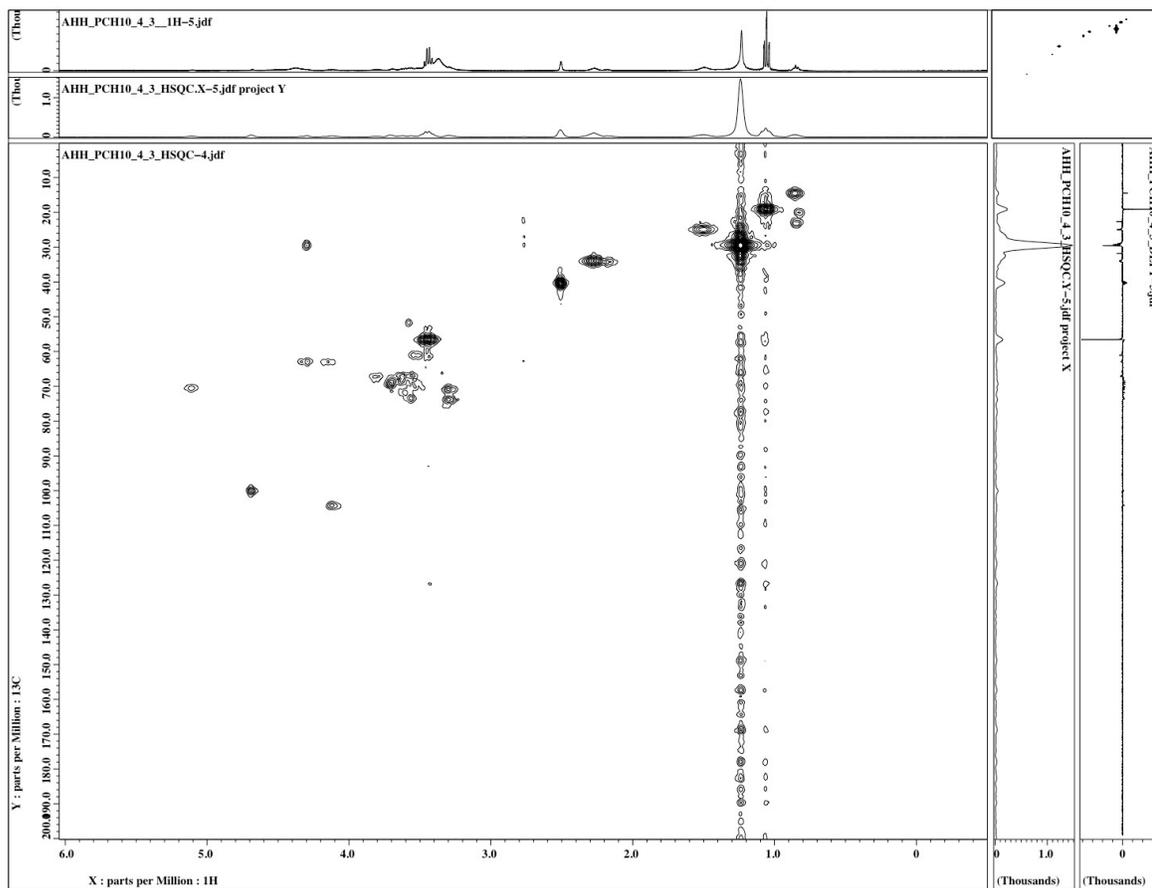
Espectro de RMN de ^{13}C y DEPT del compuesto 2:

ANEXO 11

Espectro de RMN de ^1H del compuesto 2:

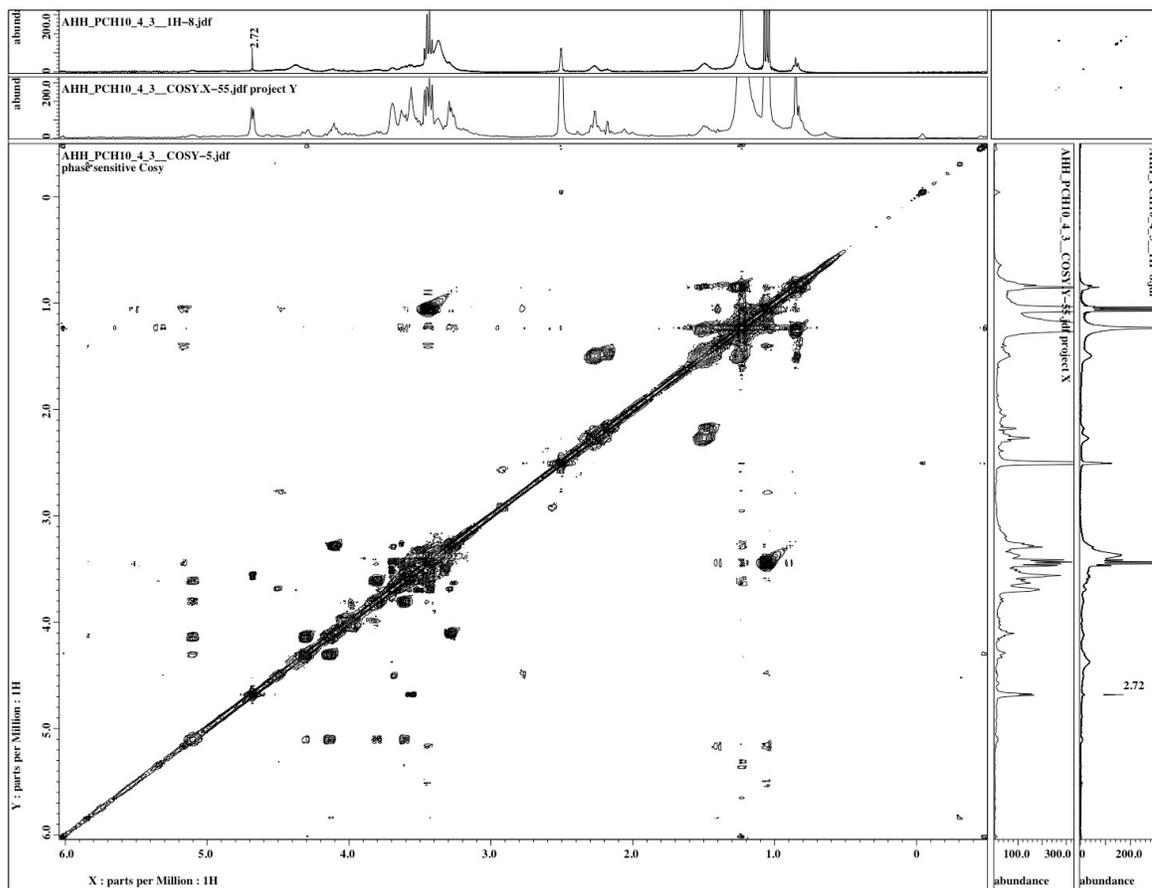
ANEXO 12

Espectro de RMN de dos dimensiones HSQC del compuesto 2:

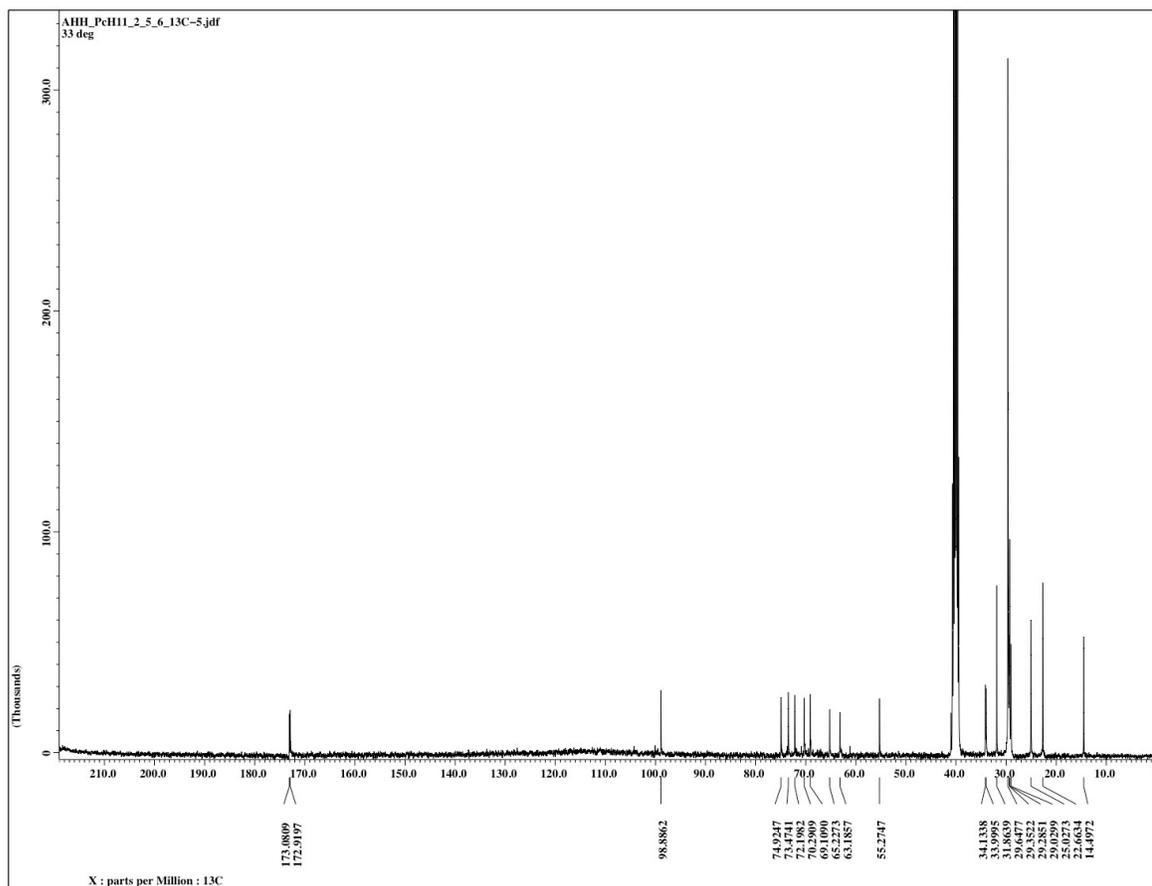


ANEXO 13

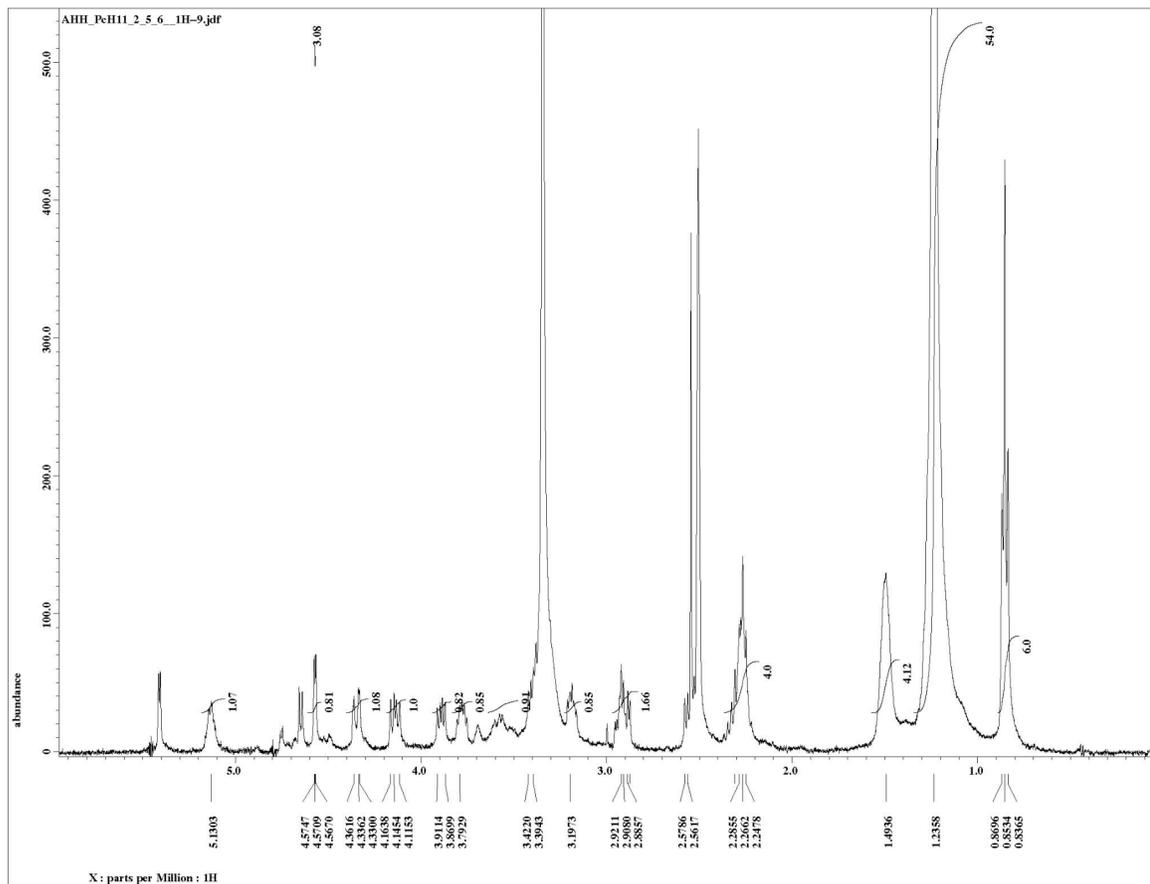
Espectro de RMN de dos dimensiones COSY del compuesto 2:



ANEXO 14

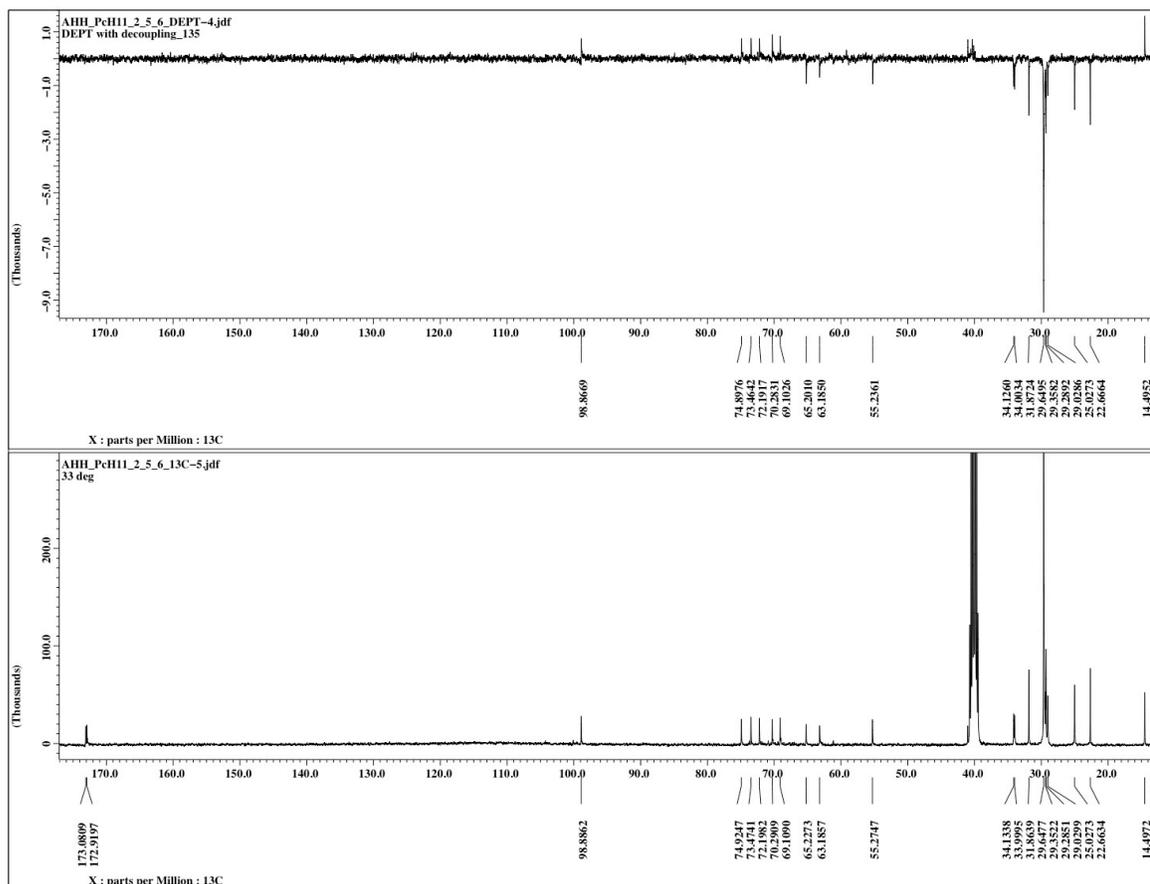
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 3

ANEXO 15

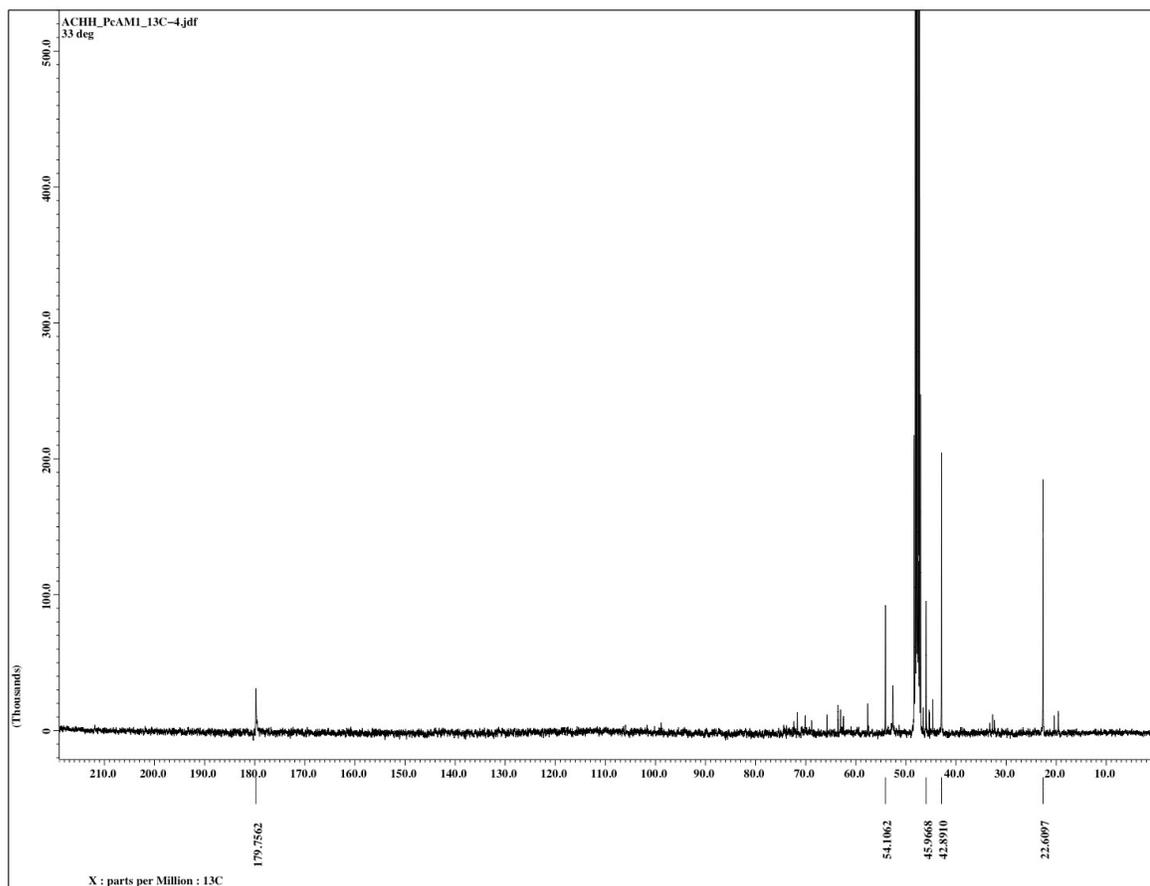
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 3:

ANEXO 16

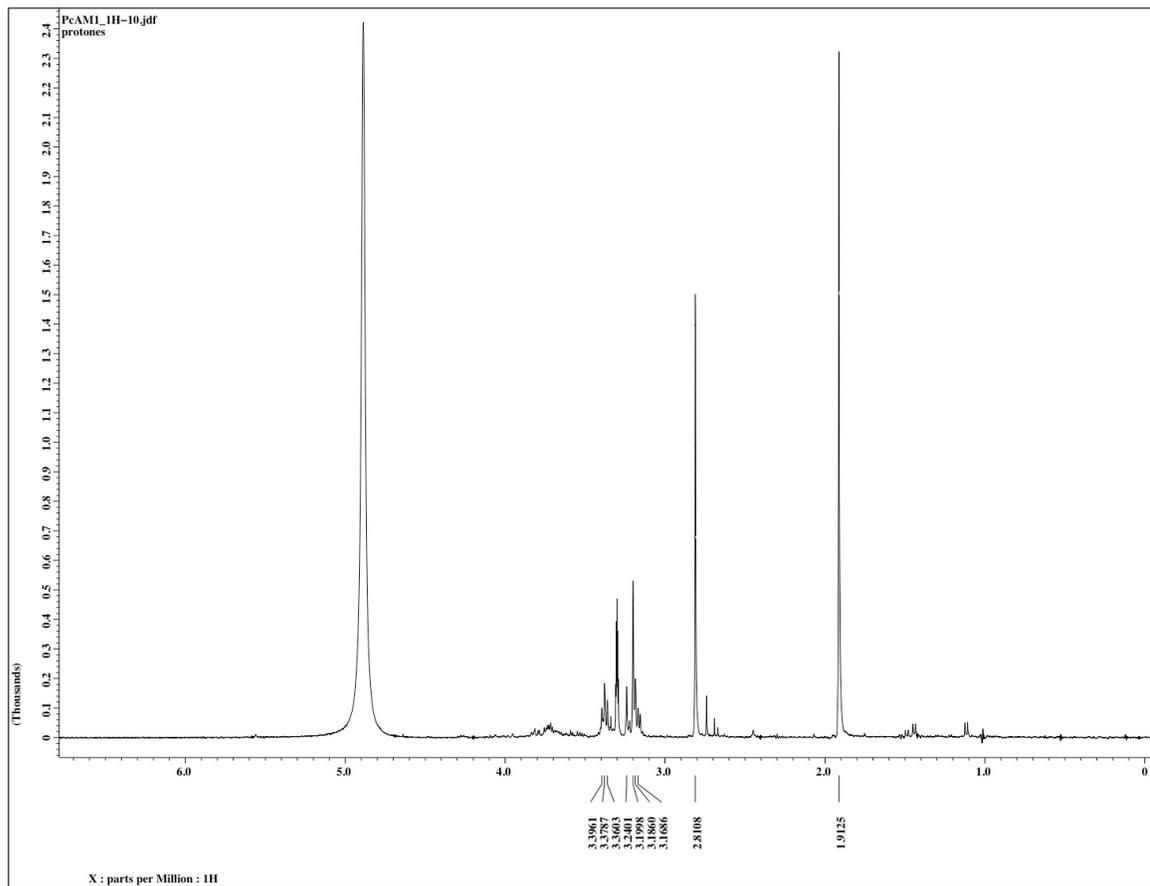
Espectro de RMN DEPT, comparado con el espectro de ^{13}C del compuesto 3:



ANEXO 17

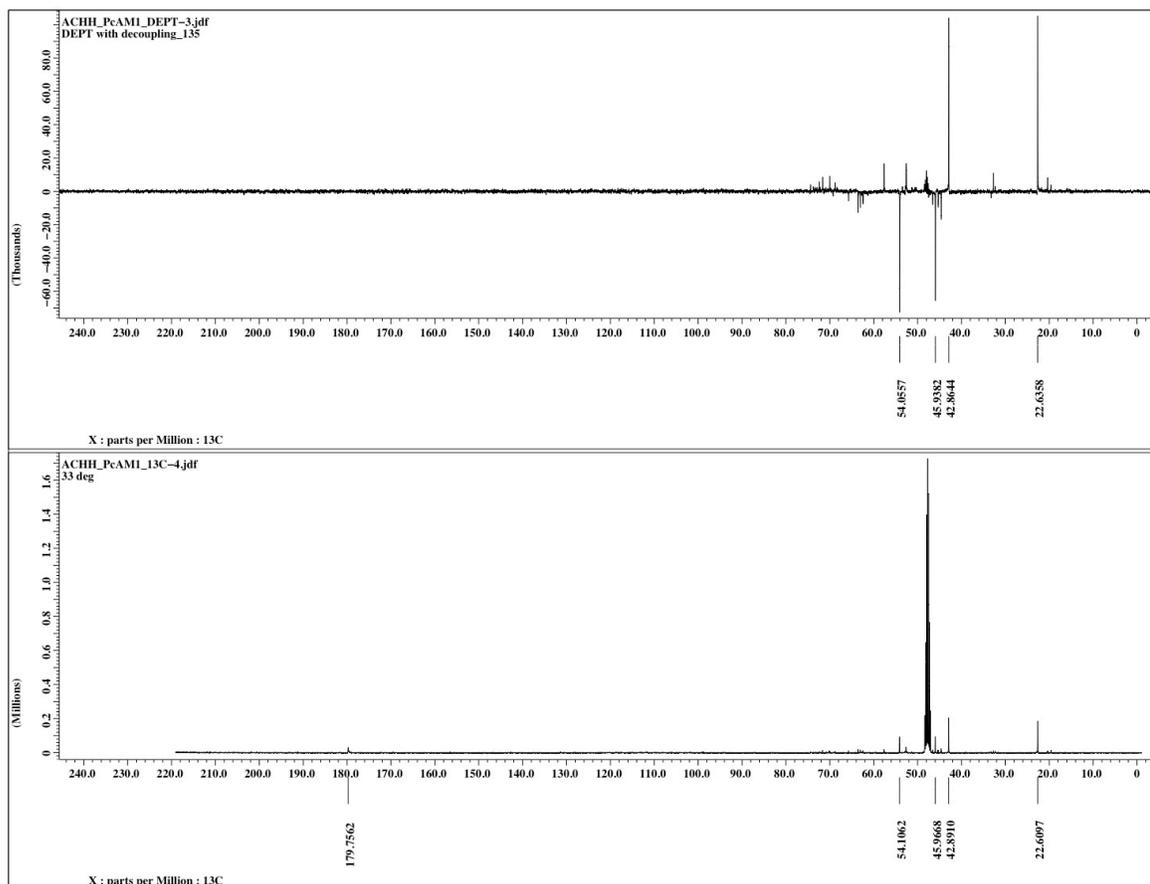
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 4 (mezcla):

ANEXO 18

Espectro de RMN de ^1H del compuesto 4:

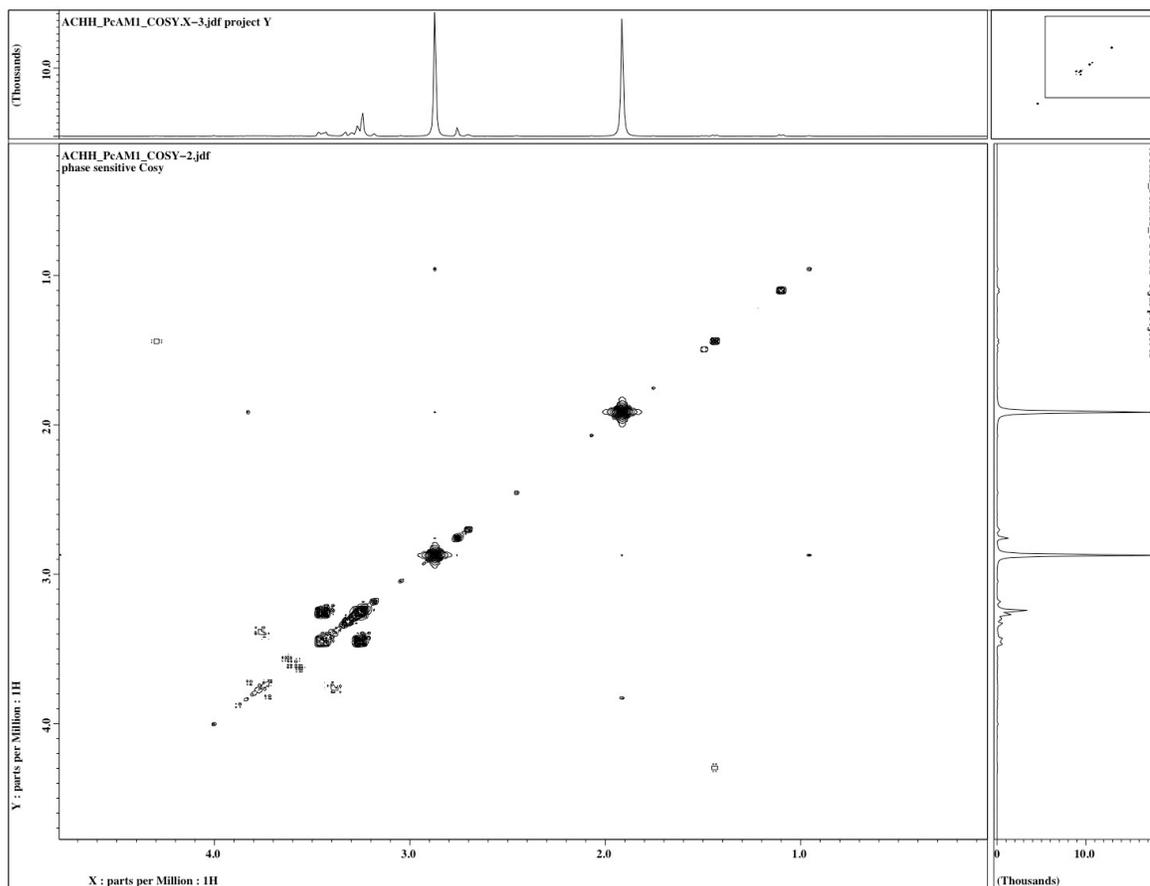
ANEXO 19

Espectro de RMN DEPT, comparado con el espectro de ^{13}C del compuesto 4:



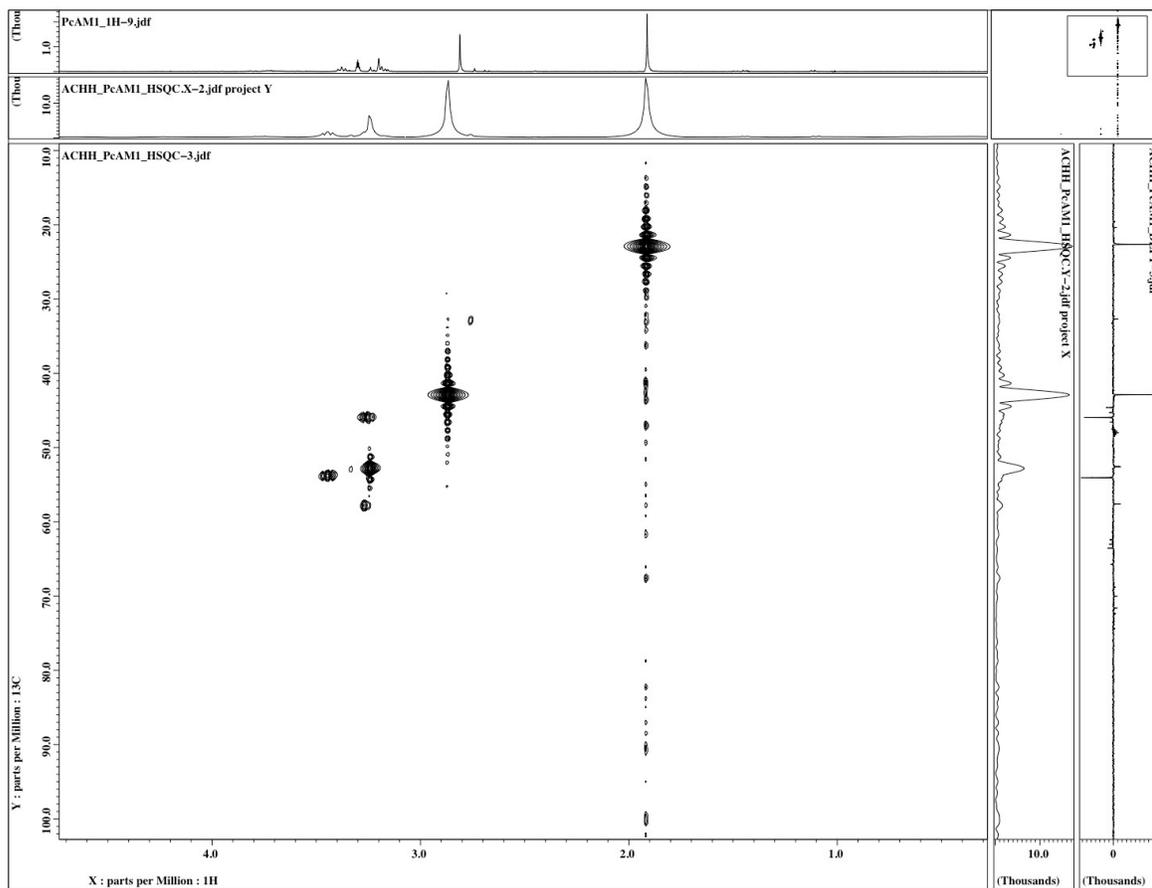
ANEXO 20

Espectro de RMN de dos dimensiones COSY del compuesto 4:



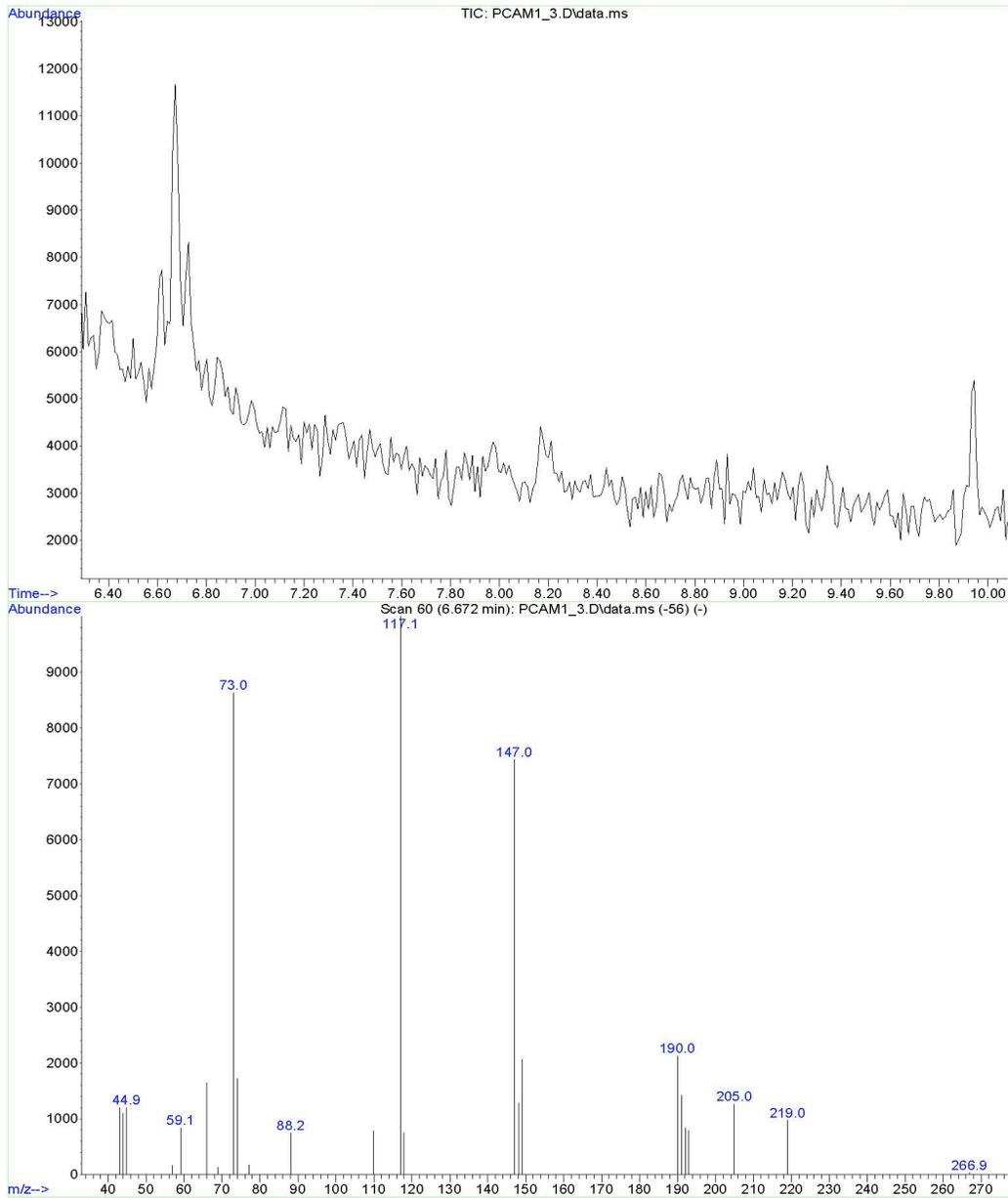
ANEXO 21

Espectro de RMN de dos dimensiones HSQC del compuesto 4:

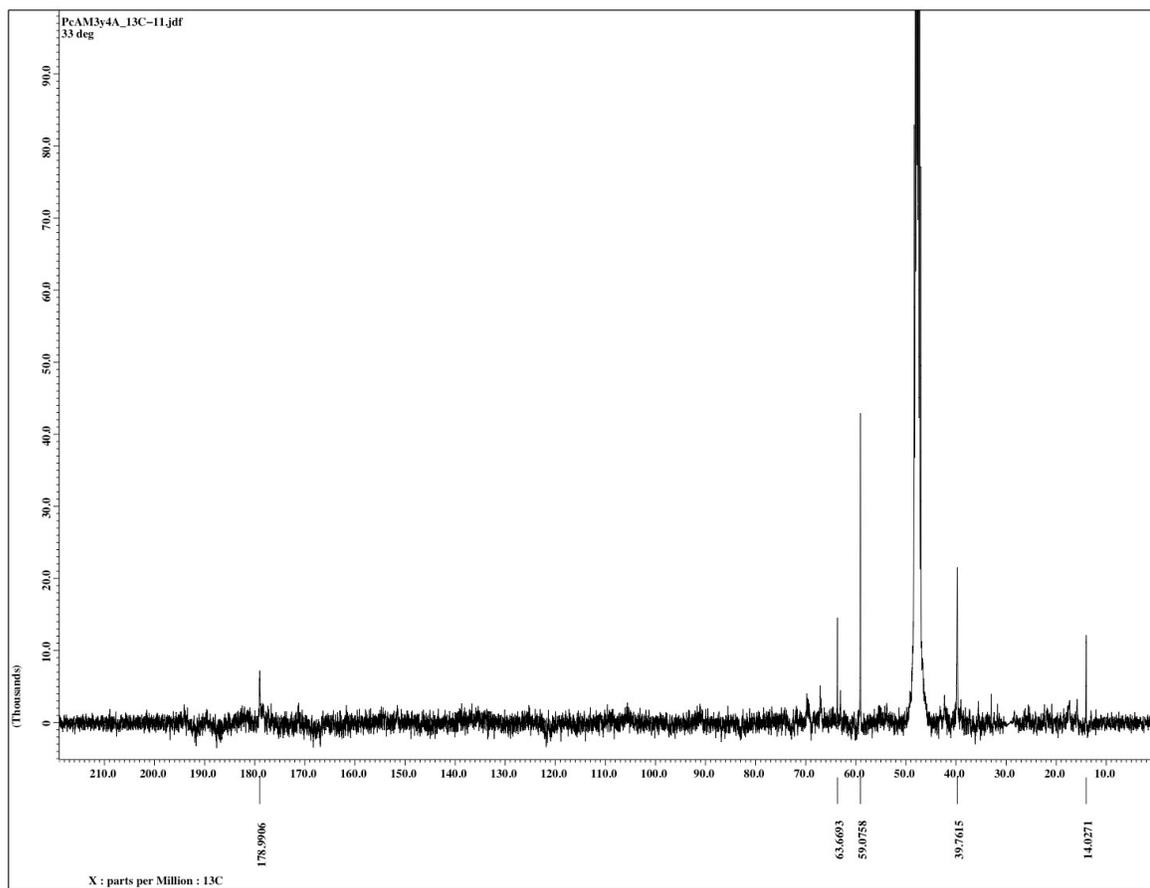


ANEXO 22**Cromatograma y espectro de masas del compuesto 4:**

File : C:\msdchem\1\DATA\Alberto\PCAM1_3.D
Operator :
Acquired : 14 Sep 2008 10:25 using AcqMethod JH-SILIL
Instrument : 5971 - In
Sample Name: Muestra sililada
Misc Info :
Vial Number: 1

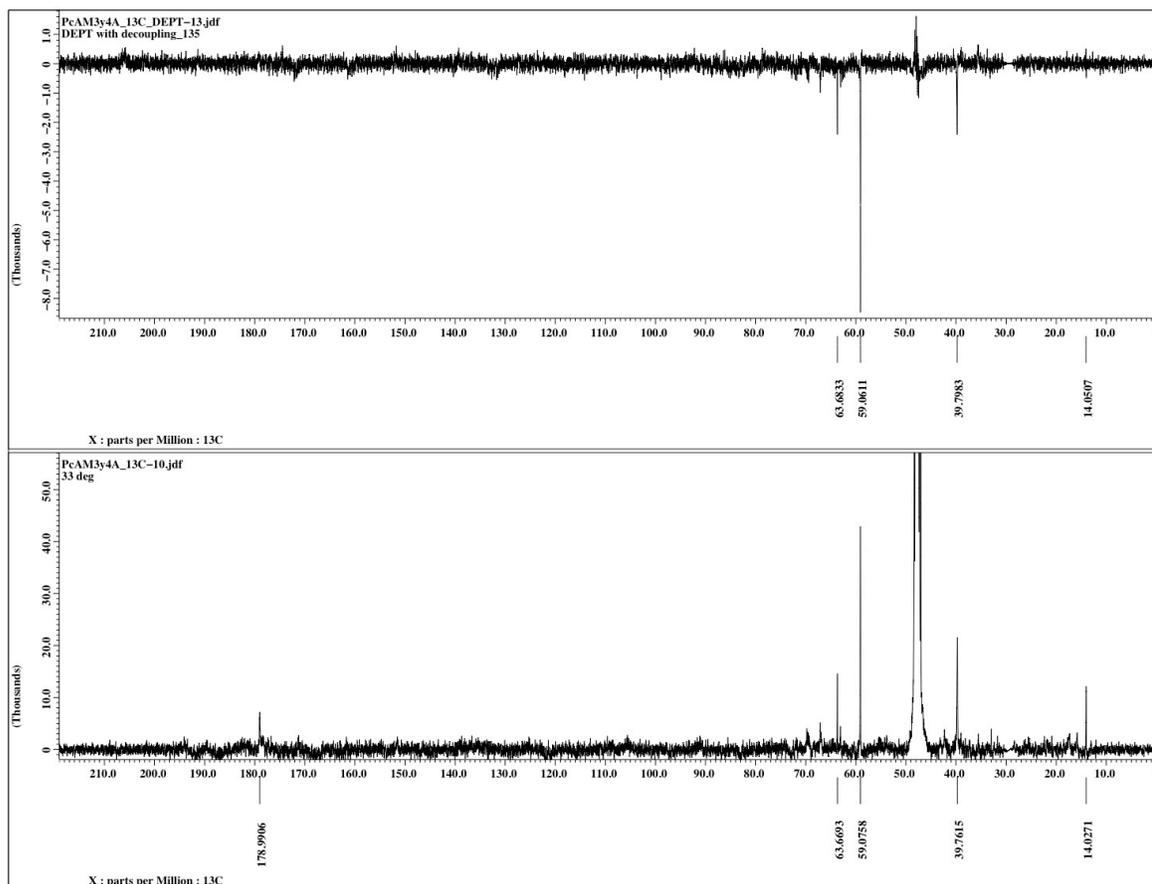


ANEXO 23

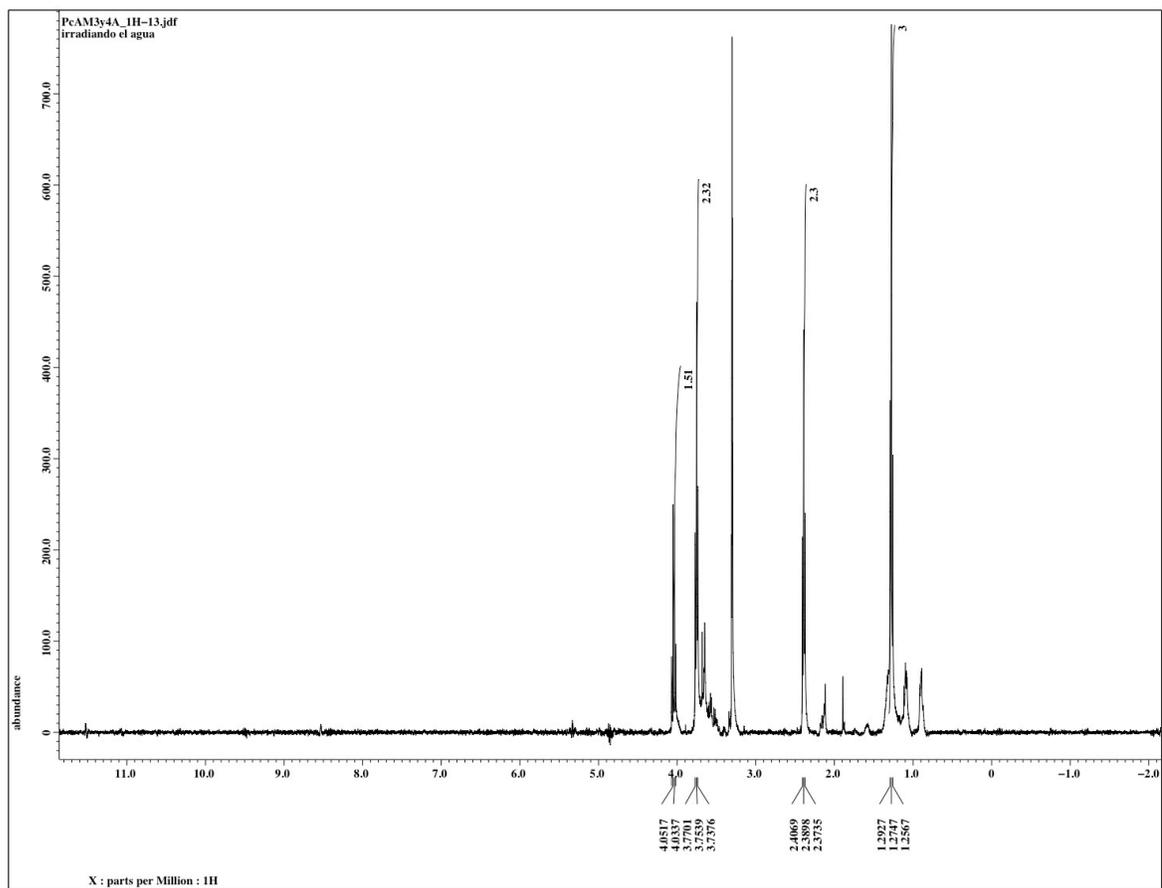
Espectro de ^{13}C del compuesto 5:

ANEXO 24

Espectro de RMN DEPT, comparado con el espectro de ^{13}C del compuesto 5:

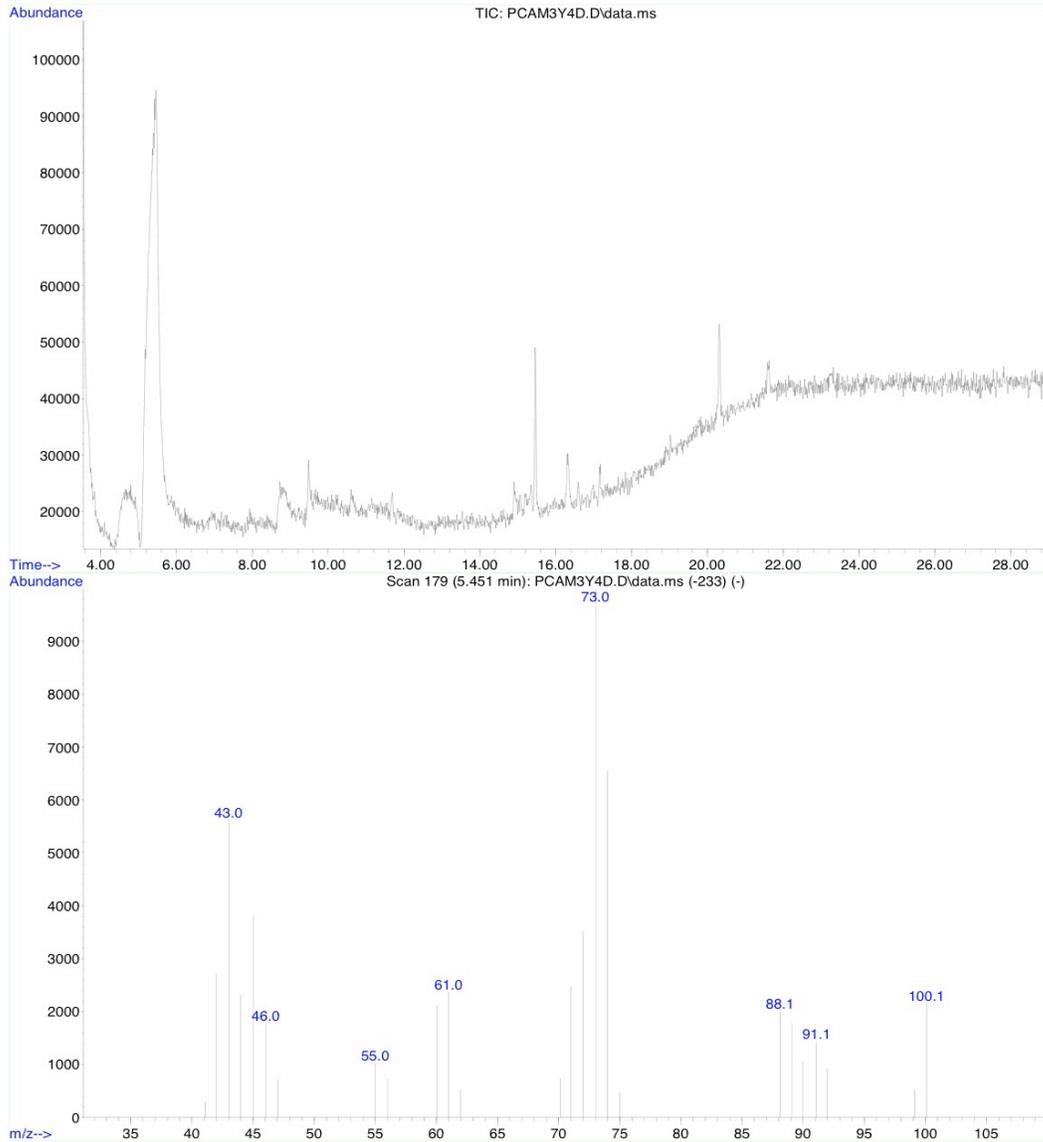


ANEXO 25

Espectro de ^1H del compuesto 5:

ANEXO 26**Cromatograma y espectro de masas del compuesto 5:**

File :C:\msdchem\1\DATA\PCAM3Y4D.D
Operator : Prof. Julio Herrera
Acquired : 20 Jan 2009 15:39 using AcqMethod IB_280
Instrument : 5971 - In
Sample Name:
Misc Info :
Vial Number: 1



VIII. GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Antineoplásicos** son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas. Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.
- **Autótrofo** es un ser vivo que fabrica su propio alimento a través de la fotosíntesis.
- **cAMP** *Cyclic adenosine monophosphate* (adenosina monofosfatada cíclica)
- **Epífita** (del griego *epi* sobre y *phyton* planta) se refiere a cualquier planta que crece sobre otro vegetal usándolo solamente como soporte, pero que no lo parasita.
- **Estipe** es una estructura soporte que puede comportarse como un tallo, siendo parte del talo de algas marinas, o de un tallo de hojas verdaderas, como en los helechos.
- **Factor quimiotáctico:** es fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o multicelulares dirigen sus movimientos de acuerdo a ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.
- **Fotosíntesis oxigenada** es la modalidad de fotosíntesis en la que el agua es el donante primario de electrones y que, por lo tanto, libera oxígeno (O₂) como subproducto.
- **fMLP** *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*
- **Gametos** son cada una de las células sexuales que al fusionarse, durante la fecundación, forman un nuevo individuo.
- **Leucocitos** (también llamados glóbulos blancos) son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmune, así intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos).

- **Macrófagos** son unas células del sistema inmunitario, que se localizan en los tejidos procedentes de la emigración desde la sangre a partir de un tipo de leucocito llamado monocito.
- **Monocitos** son un tipo de glóbulos blancos agranulocitos. Es el leucocito de mayor tamaño, su tamaño varía entre 7 y 15 μm , y representa del 4 a 8% en la sangre.
- **Pirenoide** es una masa fundamentalmente proteica, incolora, y muy refringente que se observa en el estroma de los plastos de muchas algas eucarióticas (protistas acuáticos autótrofos) de distintos grupos. No se encuentra en las formas evolutivamente más derivadas de las algas, sino principalmente en las formas basales, sobre todo unicelulares. Deriva evolutivamente del carboxisoma de las cianobacterias, y como él representa un reservorio de la enzima Ribulosa-1,5-difosfato-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO), la encargada de la fijación del dióxido de carbono durante la fotosíntesis (ciclo de Calvin).
- **PMN** es la abreviatura que designa a las células **polimorfonucleares** (PMN), llamadas así porque su núcleo es alargado y presenta varias lobulaciones. También se conocen como granulocitos debido a la presencia numerosa de gránulos en su citoplasma. Una célula PMN se clasifica como neutrófilo, eosinófilo o basófilo, según la coloración que adquieren sus gránulos en la Tinción de Giemsa. Cada uno de estos tipos tiene un papel diferente en la respuesta inmunitaria.
- **Polifilético** es aquel grupo que no incluye al antepasado común más reciente de todos sus miembros; está constituido por la unión artificial de ramas dispersas del árbol evolutivo.
- **Tilacoides** son sacos aplanados, o vesículas, que forman parte de la estructura de la membrana interna del cloroplasto; sitio de las reacciones captadoras de luz de la fotosíntesis y de la fotofosforilación; las pilas de tilacoides forman colectivamente las grana.

