

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.
FACULTAD DE CIENCIAS.
ESCUELA DE QUÍMICA.



ESTUDIO QUÍMICO DEL CORAL BLANDO VENEZOLANO
Pseudopterogorgia americana.

Trabajo Especial de Grado,
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Bachiller: Yusbeyka Massiel
Martínez Vargas, para optar por el
título de Licenciada en Química,
opción Básica.

Caracas, Abril 2009.

ACTA.

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "ESTUDIO QUÍMICO DEL CORAL BLANDO VENEZOLANO *Pseudopterogorgia americana*", presentado por la Bachiller: Yusbeyka Massiel Martínez Vargas, certificamos que éste trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra magna casa de estudios para optar por el título de Licenciada en Química.

Dra. Ivette Piña Gómez.
(Tutor)

Dra. María Luisa Serrano.
(Jurado)

Dra. María Antonieta Ranaudo.
(Jurado)

Yo, Profesora Ivette Piña Gómez, investigadora del Centro de Química Orgánica, de la Escuela de Química, de la Universidad Central de Venezuela. Certifico que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

"ESTUDIO QUÍMICO DEL CORAL BLANDO VENEZOLANO
Pseudopterogorgia americana".

Que presenta la Br. Yusbeyka Massiel Martínez Vargas, para aspirar al título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Química del Mar, bajo mi dirección, durante los años 2008 y 2009, con esta fecha autorizo su presentación.

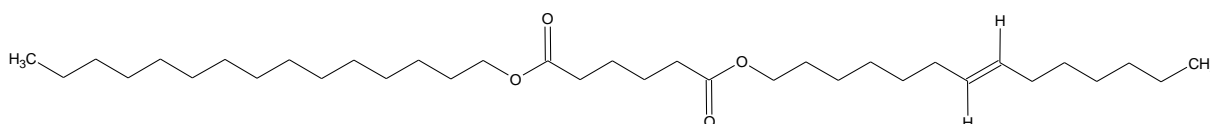
Caracas, 30 de Abril del 2009.

Dra. Ivette Piña Gómez.
(Tutor)

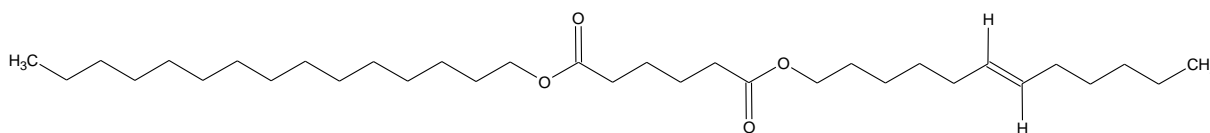
RESUMEN.

Este Trabajo Especial de Grado representa un aporte para la química de los Productos Naturales Marinos, a través del estudio de algunos de los metabolitos secundarios presentes en el coral blando venezolano *Pseudopterogorgia americana*, colectado en el Parque Nacional Morrocoy, Edo. Falcón, Venezuela.

Se realizó un estudio bio-dirigido del crudo metanólico del coral *Pseudopterogorgia americana*, que condujo a la separación y purificación de dos metabolitos secundarios presentes en el extracto de hexano del mismo. Los compuestos fueron aislados y purificados empleando técnicas cromatográficas como: cromatografía de columna sobre silica gel y cromatografía de capa fina. Se caracterizaron usando técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y ^{13}C) y espectrometría de masas de baja y alta resolución. Los metabolitos encontrados fueron I y II, no han sido reportados hasta la fecha.



I



II

La mezcla de compuestos I y II presentó toxicidad moderada (46,4 %) a una concentración de 1000 ppm de la mezcla de compuestos, para el ensayo de mortalidad de *Artemia salina*.

En el ensayo de difusión en discos de papel se obtuvo que en la especie *Pseudoptero-gorgia americana* no se encuentran componentes con la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (bacterias gram negativas) y *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, (bacterias gram positivas).

Y en el ensayo de inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) se obtuvo un porcentaje de inhibición de la enzima de 65,0 % (0,014 nm Pi/h x mg proteína) en microsomas intactos y de 13,6 % (0,19 nm Pi/h x mg proteína) en microsomas rotos, con una latencia del 92,6 %

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosín difosfato.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosín trifosfato.
°C	Grado centígrado.
Calu-3	Líneas celulares de cáncer de pulmón.
CDCl ₃	Diclorometano deuterado.
CD ₃ OD	Metanol deuterado.
CH ₃ Cl	Cloroformo.
CH ₃ OH	Metanol.
cm	Centímetro.
CM	Crudo metanólico.
col.	Colaboradores.
δ	Desplazamiento químico.
d	Doblete.
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transference.
DM	Diabetes mellitus.
EA	Extracto acuoso.
ED	Extracto de diclorometano.
EH	Extracto de hexano.
EM	Espectrometría de masas.
ES	Extracto de sec-butanol.
FAU	Florida Atlantic University.
G	Glucosa.
G-6-P	Glucosa-6-fosfato.
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatasa.
GDP	Guanosín difosfato.

GTP	Guanosín trifosfato.
H ⁺	Protón.
H ⁻	Hidruro.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity.
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation.
H ₂ O	Agua.
HPLC	High performance liquid chromatography.
Hz	Hertz.
IC ₅₀	Concentración que inhibe el crecimiento del 50 % de la población tratada.
IR	Infrarrojo.
J	Constante de acoplamiento.
Kg	Kilogramo.
Km	Kilómetro.
λ	Longitud de onda.
LnCap	Líneas celulares de cáncer de próstata.
m	Metros.
mg	Miligramo.
mg/dL	Unidad de concentración.
MHz	Megahertz.
μ m	Micrón.
mm	Milímetro.
mL	Mililitro.
mult	Multiplicidad.
m/z	Relación masa-carga.
ν	Longitud de onda.
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina.
NADH	Es la forma reducida del NAD ⁺ .
<i>P.</i>	Género <i>Pseudopterogorgia</i> .
Pi	Fosfato inorgánico.

ppm	Partes por millón.
%	Por ciento.
RE	Retículo endoplasmático.
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de protones.
s	Singlete.
t	Triplete.
T1	Proteína transportadora T1.
T2	Proteína transportadora T2.
T3	Proteína transportadora T3.
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy.
uma	Unidades de masa atómica.
UV	Ultravioleta.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

CAPITULO I.	2
I.1. INTRODUCCIÓN.	2
I.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	4
I.2.1. Productos naturales.	4
I.2.2. Productos naturales de origen marino.	4
I.2.2.1. Organismos marinos productores de moléculas bio-activas.	5
I.2.2.2. Desarrollo de un producto marino.	5
I.2.3. Las bacterias.	6
I.2.3.1. La célula bacteriana.	7
I.2.3.2. Fisiología bacteriana.	11
I.2.4. Diabetes.	13
I.2.4.1 Diabetes mellitus.	15
I.2.4.2. Diabetes mellitus tipo I.	17
I.2.4.3. Diabetes mellitus tipo II.	17
I.2.4.4. Diabetes mellitus gestacional.	18
I.2.4.5. Glucólisis.	18
I.2.4.6. Gluconeogénesis.	20
I.2.4.7. Sistema glucosa-6-fosfatasa	22
I.2.5. Pruebas de actividad biológica.	23
I.2.6. Phylum Cnidarios.	26
I.2.6.1 Clase Anthozoa.	29
I.2.6.2. Subclase Octocorallia.	31
I.2.6.3. Orden Gorgonacea.	32
I.3. DESCRIPCION TAXONÓMICA.	33

I.4.	ANTECEDENTES.	36
I.5.	JUSTIFICACIÓN.	50
	CAPITULO II.	51
II.1.	OBJETIVOS.	51
II.1.1.	Objetivo General.	51
II.1.2.	Objetivos específicos.	51
II.2.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.	52
II.2.1.	Reactivos del laboratorio.	52
II.2.2.	Agentes reveladores.	52
II.2.3.	Materiales y equipos.	53
II.2.4.	Colección del coral blando.	54
II.2.5.	Extracción y separación.	54
II.2.6.	Metodología empleada para los ensayos de actividad biológica.	56
II.2.6.1.	Metodología empleada para el ensayo de mortalidad de <i>Artemia salina</i> .	56
II.2.6.2.	Metodología empleada para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.	58
II.2.6.3.	Metodología empleada para el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa.	60
II.2.6.3.1.	Preparación de microsomas.	61
II.2.6.3.2.	Ensayo general de la enzima G-6-Pasa.	62
II.2.6.3.3.	Determinación de proteínas.	65
III.1.	RESULTADOS EXPERIMENTALES.	66

III.1.1.	Resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica.	66
III.1.1.1.	Resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de <i>Artemia salina</i> .	66
III.1.1.2.	Resultados obtenidos para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.	67
III.1.1.3.	Resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima Glucosa-6-fosfatasa.	68
III.1.2.	Separación y purificación de algunos de los compuestos presentes en el extracto de hexano EH.	69
III.1.3.	Resultados de los análisis espectroscópicos.	73
III.1.4.	Resultados obtenidos para los ensayos de actividad biológica aplicados a la fracción EH1, del extracto de hexano EH.	76
III.1.4.1.	Resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de <i>Artemia salina</i> .	76
III.1.4.2.	Resultados obtenidos para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.	77
III.1.4.3.	Resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima Glucosa-6-fosfatasa.	78
	CAPITULO IV.	79
IV.1.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	79
IV.1.1.	Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos.	79
IV.1.2.	Discusión de resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de <i>Artemia salina</i> .	110
IV.1.3.	Discusión de resultados obtenidos para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.	111
IV.1.4.	Discusión de resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima Glucosa-6-fosfatasa.	111

	CAPÍTULO V.	115
V.1.	CONCLUSIONES.	115
V.2.	RECOMENDACIONES.	117
V.3.	GLOSARIO.	118
V.4.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	125
V.5.	ANEXOS.	130
V.6.	AGRADECIMIENTOS.	142

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Formas y agrupamiento de las bacterias.	7
Figura 2.	Estructura de una bacteria.	8
Figura 3.	Distribución de los flagelos.	9
Figura 4.	Absorción de la glucosa.	14
Figura 5.	Reacciones de glucólisis y neoglucogénesis.	20
Figura 6.	Diagrama esquemático del metabolismo de la glucosa hepática.	22
Figura 7.	Ácido Clorogénico.	23
Figura 8.	A, Forma corporal polipoide. B, Forma corporal medusoide.	27
Figura 9.	Estructura de un pólipo antozoario. Sección longitudinal.	30
Figura 10.	Estructura de un coral gorgónido de la subclase octocorallia de los antozoarios (Según R. C. Moore).	31
Figura 11.	Especie <i>Pseudopterogorgia americana</i> .	33
Figura 12.	Distribución General.	35
Figura 13.	Gráfico del porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> en función de la muestra para CM, EH, ED, ES y EA a una concentración de 1000 ppm.	67
Figura 14.	Gráfico del porcentaje de inhibición de CM, EH, ED, ES y EA sobre la enzima G-6-Pasa.	69
Figura 15.	Gráfico del porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> en función de la concentración de EH1.	77
Figura 16.	Correlaciones HSQC, I ($C_{35}H_{66}O_4$).	102
Figura 17.	Correlaciones HSQC, II ($C_{33}H_{62}O_4$).	103
Figura 18.	Correlaciones TOCSY, I ($C_{35}H_{66}O_4$).	104
Figura 19.	Correlaciones TOCSY, II ($C_{33}H_{62}O_4$).	105
Figura 20.	Correlaciones HMBC, I ($C_{35}H_{66}O_4$).	106
Figura 21.	Correlaciones HMBC, II ($C_{33}H_{62}O_4$).	107

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Masa del coral húmedo y del coral seco.	54
Tabla 2.	Masa del crudo metanólico y de los extractos obtenidos a partir del mismo.	55
Tabla 3.	Preparación de los sustratos.	62
Tabla 4.	Resultados del ensayo de mortalidad de <i>Artemia salina</i> , aplicado al crudo metanólico y a los extractos EH, ED, ES y EA.	66
Tabla 5.	Resultados del ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa, aplicado al crudo metanólico y a los extractos EH, ED, ES y EA.	68
Tabla 6.	Masas de las fracciones obtenidas a partir de la separación cromatográfica del extracto de hexano EH.	71
Tabla 7.	Masas de las subfracciones obtenidas a partir de la purificación de la fracción F26- F31 del extracto de hexano EH.	72
Tabla 8.	Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) para EH1 en CDCl_3 .	73
Tabla 9.	Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN-DEPT (400 MHz) para EH1 en CDCl_3 .	74
Tabla 10.	Datos espectroscópicos de RMN-TOCSY (400 MHz) para EH1 en CDCl_3 .	75
Tabla 11.	Datos espectroscópicos de RMN-HSQC (400 MHz) para EH1 en CDCl_3 .	75
Tabla 12.	Datos espectroscópicos de RMN-HMBC (400 MHz) para EH1 en CDCl_3 .	75
Tabla 13.	Resultados del ensayo de mortalidad de <i>Artemia salina</i> aplicado a la fracción EH1.	76
Tabla 14.	Resultados del ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa	78

aplicado a la fracción EH1.

Tabla 15. Asignaciones de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz), 96
para las estructuras de los compuestos I y II propuestos.

ÍNDICE DE ESQUEMAS.

Esquema 1.	Separación del crudo metanólico CM del espécimen <i>Pseudopterogorgia americana</i> .	56
Esquema 2.	Procedimiento para la obtención de Microsomas.	61
Esquema 3.	Ensayo general de la enzima G-6-Pasa.	64
Esquema 4.	Procedimiento para la determinación de proteínas.	65
Esquema 5	Procedimiento de separación del extracto de hexano EH.	70
Esquema 6.	Procedimiento de purificación de la fracción F26- F31.	73

ÍNDICE DE ESPECTROS.

Espectro 1.	Espectro de RMN ^1H para EH1.	80
Espectro 2.	Espectro de RMN ^1H para EH1. (Asignación de señales características).	81
Espectro 3.	Espectro de RMN ^1H ampliado (0,7- 2,4) ppm, para EH1.	130
Espectro 4.	Espectro de RMN ^1H ampliado (3,9- 5,4) ppm, para EH1.	131
Espectro 5.	Espectro de RMN ^1H ampliado (0,8- 5,4) ppm, para EH1.	132
Espectro 6.	Espectro de RMN ^{13}C para EH1.	83
Espectro 7.	Espectro de RMN ^{13}C para EH1. (Asignación de señales características).	84
Espectro 8.	Espectro de RMN ^{13}C ampliado (12.0- 37.4) ppm, para EH1.	133
Espectro 9.	Espectro DEPT de RMN ^{13}C para EH1.	85
Espectro 10.	Espectro DEPT de RMN ^{13}C ampliado (10- 45) ppm, para EH1.	134
Espectro 11.	Espectro de masas LRMS- ESI (+) para EH1.	90
Espectro 12.	Espectro de masas MS-MS ESI (+), para $m/z= 550$ uma.	91
Espectro 13.	Espectro de masas MS-MS ESI (+), para $m/z= 522$ uma.	92
Espectro 14.	Cromatograma de gases para EH1.	93
Espectro 15.	Espectro de masas para el pico 11, a 28.069 min de EH1, según el espectro 14.	94
Espectro 16.	Espectro de masas para el pico 14, a 29.081 min de EH1, según el espectro 14.	95
Espectro 17.	Espectro de RMN HSQC para EH1.	99
Espectro 18.	Espectro de RMN HSQC ampliado ((18- 54), (0.3- 2.5)) ppm, para EH1.	135
Espectro 19.	Espectro de RMN TOCSY para EH1.	100
Espectro 20.	Espectro de RMN TOCSY ampliado ((0.9- 2.4), (0.4- 2.4)) ppm, para EH1.	136

Espectro 21.	Espectro de RMN TOCSY ampliado ((0.9- 5.4), (0.8- 5.5)) ppm, para EH1.	137
Espectro 22.	Espectro de RMN HMBC para EH1.	101
Espectro 23.	Espectro de RMN HMBC ampliado ((6- 70), (0.3- 5.5)) ppm, para EH1.	138
Espectro 24.	Espectro de RMN HMBC ampliado ((62- 184), (3.4- 10.4)) ppm, para EH1.	139
Espectro 25.	Espectro de RMN HMBC ampliado ((124- 206), (0.6- 5.7)) ppm, para EH1.	140
Espectro 26.	Espectro de RMN ^1H para EH1 con la asignación de protones en la estructura del compuesto.	108
Espectro 27.	Espectro de RMN ^{13}C para EH1 con la asignación de carbonos en la estructura del compuesto.	109

CAPÍTULO I.

I.1. INTRODUCCIÓN.

Históricamente toda la química orgánica fue la química de los compuestos del carbono. Con el pasar de los años, los químicos de los productos naturales se dedicaron a estudiar los metabolitos secundarios. Algunos productos naturales, entre ellos aminoácidos, carbohidratos, y sus polímeros, fueron conocidos como los constituyentes universales de la materia viviente y fueron considerados como metabolitos primarios. Los productos naturales siguen siendo fascinantes, no sólo porque los organismos que pueden biosintetizarlos poseen un poder sintético que por mucho supera el poder que tiene el hombre, no sólo por su potencial útil al hombre en su forma natural o como patrón para síntesis análogas, sino principalmente porque cada tipo de estructura nueva revela algo sobre la arquitectura molecular de la naturaleza y posee nuevas interrogantes de cómo y por qué estos compuestos están siendo producidos en la naturaleza.^[1]

La química medicinal es una ciencia cuyas raíces fundamentales recaen en todas las ramas de la química y la biología. Entre los propósitos de la química medicinal están la separación, caracterización, elucidación de la estructura, y la síntesis de compuestos que puedan ser usados en medicina para la cura o el tratamiento de enfermedades. La química medicinal está relacionada al entendimiento de los mecanismos químicos y biológicos a través de los cuales se puede explicar la acción de los fármacos. También trata de establecer relaciones entre la estructura química y la actividad biológica, de manera de plantear un enlace entre la actividad biológica y las propiedades físicas de los fármacos.^[2]

La necesidad práctica de fármacos para curar enfermedades, permitirá dirigir todos los esfuerzos a cumplir con esta tarea. La búsqueda empírica de nuevos

agentes terapéuticos seguirá siendo tan importante por un buen tiempo, como lo ha sido durante las décadas pasadas.^[2]

La falsa creencia de que las fuentes naturales y sus productos no tienen vigencia hoy en día y que sólo interesan las sustancias sintetizadas en laboratorios, está descartada definitivamente. La síntesis química, generalmente se realiza cuando la conveniencia económica obliga a ello. Muchas veces los costos de la materia prima y las dificultades para proveerse de ella convenientemente en las fuentes geográficas, dan pie para recurrir a la síntesis. Pero hay que tener presente que muchas moléculas de productos naturales son tan complejas, que duplicarlas sintéticamente constituye un reto intelectual; entonces es más ventajoso extraer y purificar los constituyentes a gran escala y tratar de mejorar la actividad farmacológica.^[3]

Los estudios de la química de productos naturales de invertebrados marinos de la clase anthozoa comenzaron a finales del año 1960, con el estudio de las especies caribeñas más comunes. Desde entonces, se han reportado numerosos estudios de la química de los productos naturales de los corales gorgónidos. Los animales de este grupo son conocidos por producir acetogeninas, sesquiterpenoides, diterpenoides y en algunos casos esteroides. Estos estudios han sido reportados por Faulkner.^[4,5]

I.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

I.2.1. Productos naturales.

Los productos naturales son compuestos orgánicos producidos por microbios, plantas y organismos marinos. Se piensa que el organismo anfitrión biosintetiza estos compuestos, de tal manera que, produce una ventaja evolutiva sobre los competidores, competidores por comida, luz, espacio y así sucesivamente. Algunos de estos productos naturales también poseen actividad biológica útil en humanos, contra enfermedades como cáncer (taxol), bacterias (penicilina), hongos e infecciones virales, dolor e inflamación (morfina y aspirina), solo por nombrar algunos.^[6]

I.2.2. Productos naturales de origen marino.

En el transcurso de los últimos veinte años, el mar se ha convertido en la principal fuente natural de moléculas bioactivas. Ello resulta lógico si se considera que su extensión abarca el 70 por ciento del globo y su diversidad biológica, el 95 por ciento de la biosfera. Además existe otro factor de interés, el 1,8 por ciento de los extractos marinos muestran actividad en ensayos *in vitro*; ese valor baja al 0,4 por ciento en los extractos terrestres.^[7]

Esta mayor actividad responde a diversos factores. De entrada, uno de carácter histórico. La vida nació en el mar; por tanto, lleva más tiempo evolucionando en ese medio. Otro factor es la presión evolutiva, hay ecosistemas marinos con una densidad de especies mayor que la de una selva tropical; por ejemplo, los arrecifes de coral. En tales ecosistemas la competitividad es muy intensa, lo que favorece la supervivencia de quien mejora continuamente sus medios de defensa y de ataque.^[7]

I.2.2.1. Organismos marinos productores de moléculas bioactivas.

En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas bioactivas, la atención se centra en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento y primitivo desde el punto de vista filogenético. Se trata de unas características bastante comunes en el medio marino, sobre todo en aguas cálidas. La supervivencia de los organismos que las poseen no se basa en la velocidad de natación ni en defensas físicas (conchas o espinas) sino en la generación de arsenales químicos depurados, productos de un metabolismo secundario de elevada complejidad, que se utilizan para el ataque y la defensa frente a otras especies.^[7]

Numerosas especies de antaño disponían de caparazón, lo perdieron durante su evolución a favor de una defensa química. Las especies sésiles generan toxinas que impiden el asentamiento de otras. Para las especies que obtienen alimento mediante la filtración del agua, las toxinas operan como antibióticos frente a la multitud de organismos unicelulares con los que entran en contacto constante.^[7]

El mecanismo de acción de estas moléculas se dirige principalmente hacia motivos biológicos muy conservados en el curso de la evolución, por lo que resulta efectivo incluso contra especies terrestres. Estos compuestos pueden ser expulsados al agua en respuesta a una amenaza o inoculados mediante inyección con un aguijón. También pueden ser simplemente acumulados en el organismo para matar al agresor que los ingiere, salvando así al resto de la colonia y disuadiendo a futuros atacantes.^[7]

I.2.2.2. Desarrollo de un producto marino.

La investigación de productos naturales de origen marino comenzó en el Ecuador del siglo pasado, con el trabajo pionero de Werner Bergman, de la

Universidad de Yale. Su auge se alcanzó decenios más tarde, merced a los aportes de John Faulkner, de la Universidad de California, Paul J. Scheuer, de la Universidad de Hawai, Kenneth L. Rinehart, de la Universidad de Illinois, y Murria H. G. Munro, de la Universidad neozelandesa de Canterbury.^[7]

El estudio de un producto marino consta de varias etapas: recolección de especímenes, determinación de su taxonomía, aislamiento de extractos o moléculas susceptibles de mostrar actividad, evaluación de su actividad, determinación de la estructura de la molécula (o moléculas) responsable de la actividad y diseño de procesos químicos que aseguren el suministro de la molécula en cuestión.^[7]

En vista de que se va a realizar un estudio químico de la especie *Pseudopterogorgia americana* con fines de evaluar la posible actividad antibacterial que puedan presentar los metabolitos aislados de esta especie, es necesario dar un breve vistazo a las bacterias y su forma de vida.

I.2.3. Las bacterias.

Las bacterias son seres vivos microscópicos, unicelulares. Pertenecen al reino de los protistas.^[8]

Los protistas están divididos en dos grandes clases: los protistas superiores o eucariotes, que comprenden las algas, los protozoarios y los hongos, y los protistas inferiores o procariotes, que incluyen a los seres vivos más rudimentarios y agrupan a las algas azules y las bacterias.^[8]

Aunque son microscópicas, las bacterias poseen, sin embargo, una estructura bastante compleja. Como todo ser vivo, se nutren, respiran y se reproducen.^[8]

I.2.3.1. La célula bacteriana.

En lo referente a su morfología, se conoce que uno de los caracteres fundamentales de las bacterias es su pequeño tamaño. Para expresarlo, se utiliza una unidad de longitud, el micrón, indicado por el símbolo μm .^[8]

El aspecto morfológico es muy variable y, clásicamente, se distinguen tres aspectos principales: i) Ciertas bacterias tienen forma redondeada, con un diámetro de aproximadamente $1 \mu\text{m}$: son los coccidios (pueden estar aislados o agrupados) y micrococos. Pueden presentarse como bolitas perfectamente esféricas o tener un aspecto reniforme como los meningococos o los gonococos; o, también tener forma oblonga u ovoide, como los neumococos. ii) Otras bacterias, más alargadas, son los bacilos. Pueden observarse múltiples formas: bacilos muy delgados o bacilos gruesos, formas cortas, largas o curvas; bacilos con extremidades redondeadas, deshilados en husos, con bordes cuadrados, abultados en forma de masa. El agrupamiento de estas bacterias también es variable. iii) Por último, algunas bacterias son curvas (espirilos, espiroquetas y treponemas). (Figura 1).^[8]

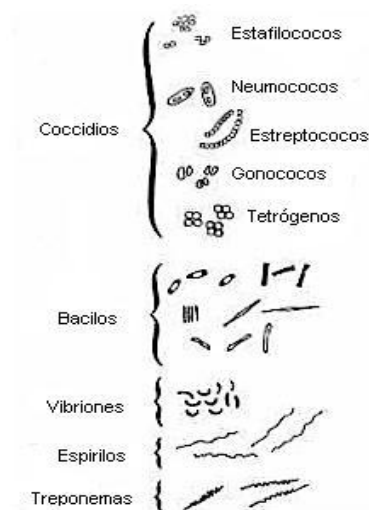


Figura 1. Formas y agrupamiento de las bacterias.^[8]

Las bacterias son seres unicelulares, es decir, constituidos por una sola célula. Ésta posee una estructura compuesta por un citoplasma, que contiene varios elementos y está rodeado por una membrana, y contiene un núcleo. El conjunto está sostenido por un cascarón rígido. Además, la bacteria puede presentar otras características: esporas, cápsulas, cilios, entre otras. (Figura 2).^[8]

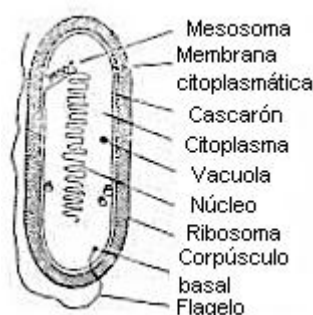


Figura 2. Estructura de una bacteria.^[8]

El citoplasma, es un gel coloidal desprovisto de todo movimiento, compuesto por un 80 por ciento de agua, sustancias disueltas (sales minerales, proteínas, glúcidos) y por un elemento fundamental el ácido ribonucleico (ARN), que existe en forma diluida o granular (ribosoma). El ARN interviene en la síntesis de proteínas. El citoplasma encierra también vacuolas (de naturaleza grasa, mineral y glucídica), inserciones y en ocasiones, pigmentos esparcidos en forma difusa o reunidos en racimos. Se encuentra rodeado por una delgada membrana citoplasmática, provista de invaginaciones intracitoplasmáticas llamadas mesosomas, que asegura los intercambios de la célula con el medio exterior, especialmente gracias a las enzimas (osmóticas).^[8]

Dentro del citoplasma se encuentra en estado libre el núcleo, presenta un aspecto redondeado en los coccidios y oval o filamentoso en los bacilos. Está constituido por una larga molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), apelotonada

y cerrada sobre sí misma. Se trata del único cromosoma de la bacteria, soporte de los genes que codifican las propiedades hereditarias de la célula.^[8]

La bacteria está rodeada por una envoltura rígida, el cascarón, formada por una enorme molécula denominada glicopéptido, compuesta por largas cadenas polisacáridicas, en las que se intercalan elementos peptídicos y a veces estructuras lipídicas (en las bacterias gram-negativas). Debido a su rigidez, el cascarón asegura la conservación de la forma propia de la bacteria. Además, es el punto de impacto de los colorantes utilizados para observarla y constituye el soporte de ciertos elementos antigénicos del microbio.^[8]

Junto a los elementos mencionados, que son constantes, las bacterias pueden presentar otras formaciones, que son variables, como: la cápsula, los cilios o flagelos (Figura 3), la espora y el Pili o fimbriae.^[8]

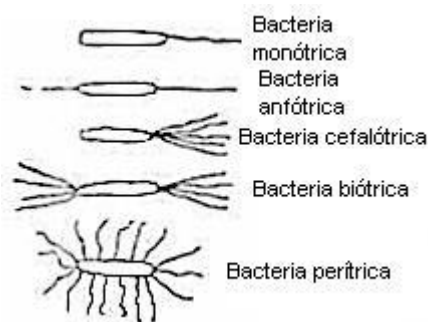


Figura 3. Distribución de los flagelos.^[8]

Para observar las bacterias con el microscopio y apreciar su morfología lo más simple es colorearlas. Los más utilizados son los colorantes básicos (violeta de genciana, tionina, fucsina, azul de metileno) y los colorantes ácidos (eosina). Los colorantes pueden ser utilizados aisladamente, es el caso de una coloración simple.

Sin embargo, se utilizan preferiblemente coloraciones dobles, de las cuales las principales son la de Gram y la de Ziehl.^[8]

El método de Gram consiste en hacer actuar sobre las bacterias, previamente fijadas en una lámina, una solución fenicada de violeta de genciana cuya acción es reforzada por un líquido yodo-yodurado, el lugol. Así tratadas, todas las bacterias se colorean de violeta. En una segunda etapa, se hace actuar alcohol etílico al 95 por ciento de pureza durante varios segundos. Algunas bacterias retienen la coloración violeta (se las llama gram-positivas) otras se decoloran: para observarlas, se las somete entonces a la acción de otro colorante, la fucsina, con lo que aparecen coloreadas de rojo (se las denomina gram-negativas). Descubierta empíricamente, esta reacción se basa, como se sabe actualmente, sobre la estructura química del cascarón (el de las bacterias gram-negativas contiene lípidos, contrariamente al de las bacterias gram-positivas), y es fundamental en bacteriología.^[8]

El método de Ziehl-Neelsen pone en evidencia la resistencia acidoalcohólica de ciertos microbios. Su principio es simple: en una primera etapa, se recubre la lámina sobre la que han sido extendidos los gérmenes, fijados por calor, con una solución concentrada de fucsina fenicada. Después de varios minutos de contacto, la muestra es volcada, sucesivamente, dentro de una solución ácida (por ejemplo, ácido nítrico diluido) y en alcohol etílico al 95 por ciento. La mayoría de las bacterias, primitivamente coloreadas de rojo, pierden su coloración como consecuencia de este doble tratamiento. Algunas la conservan: son las ácido-alcohólico-resistentes. Se ha establecido que esta propiedad se debe, particularmente, a su composición química y a su alto contenido de ácidos micólicos y ceras. Las micobacterias (el bacilo de la tuberculosis y el de la lepra, entre otros) pueden ser reveladas mediante la coloración de Ziehl.^[8]

Gracias a procedimientos especiales de coloración es posible hacer aparecer el núcleo, las esporas, la cápsula, los cilios y las granulaciones de las bacterias.^[8]

Las bacterias tienen un poder antigénico. Inyectadas en un organismo animal o humano, provocan la aparición de sustancias nuevas, altamente específicas y capaces de reaccionar con ellas: son los anticuerpos. Esta propiedad es común a todas las bacterias, pero reviste una importancia muy particular cuando se trata de gérmenes patógenos. Este poder antigénico se debe a la presencia de sustancias químicas en la bacteria (proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, entre otras), que son los antígenos bacterianos. Estos pueden encontrarse a nivel de flagelos (antígeno H o flagelario), del cascarón celular (antígeno O o somático) o en la periferia (antígeno de superficie).^[8]

I.2.3.2. Fisiología bacteriana.

Las bacterias son seres vivos y como todo ser vivo se desarrolla, respira y se reproduce.^[8]

Para desarrollarse, la bacteria debe elaborar su propia materia prima, realizar la síntesis de sustancias orgánicas. Para ello, es necesario que disponga de elementos básicos, de materiales y de una fuente de energía que le permita efectuar la síntesis.^[8]

Todas las bacterias necesitan elementos simples, constitutivos: agua, carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno en gran cantidad; azufre, fósforo, sodio, potasio, cloro en menor proporción; algunas en concentraciones mucho más reducidas: son los oligoelementos (manganeso, hierro, cobre, cobalto, entre otros). Ciertas bacterias pueden asegurar su desarrollo a partir de agua y de las sales minerales que contienen estos elementos.^[8]

Para la mayoría de las bacterias es indispensable tener a su disposición materia orgánica energética (glúcidos y proteínas). A partir de estas sustancias,

pueden efectuar la síntesis de todas las enzimas y de los metabolitos esenciales, indispensables a su crecimiento. Algunas bacterias requieren factores de crecimiento, elementos necesarios cuya síntesis no pueden asegurar por sí solas.^[8]

Gracias a su equipamiento enzimático muy variado, las bacterias pueden, en primer término, metabolizar los alimentos que les son aportados, descomponerlos y asimilarlos, mientras que las osmóticas aseguran la penetración de sustancias exógenas dentro del germen. Otras enzimas son capaces de sintetizar los constituyentes celulares.^[8]

También es necesario que dispongan de una fuente de energía. Esta puede ser provista por la luz, puede provenir de una reacción de oxidación de sustancias químicas.^[8]

En las bacterias, la respiración es generadora de energía, que servirá para efectuar las síntesis y para permitir los movimientos de la célula. Conviene distinguir dos clases de respiración. Ciertos gérmenes se desarrollan en presencia de oxígeno: son las bacterias aerobias. El oxígeno que captan permite destruir completamente la materia orgánica, estas son oxidaciones celulares a través de procesos de transferencia de hidrógeno y electrones. En cambio otros gérmenes no pueden vivir sino en ausencia de oxígeno, siendo tóxico para ellos este elemento en estado gaseoso. Son las bacterias anaerobias estrictas. Llegan a degradar la materia orgánica mediante procesos de fermentación, reacciones de descomposición incompletas en las que el oxígeno no interviene. A su vez, existe una categoría de gérmenes llamados aero-anaerobios variables, que pueden utilizar uno u otro tipo de respiración según estén en presencia o en ausencia de oxígeno.^[8]

La escisiparidad es el modo normal de multiplicación de las bacterias. La observación prolongada de un germen permite verificar el estiramiento del cuerpo

microbiano, la aparición de un estrangulamiento que se acentúa y termina con la separación de dos células hijas. La división celular comienza por el núcleo que se alarga. La cromatina se reparte según el gran eje de la bacteria y se escinde en dos partes rigurosamente iguales, que se alejan una de otra. Se dice que el cromosoma se repite. Luego de un septum, aparece un tabique transversal a partir de la membrana citoplasmática y, como un diafragma, separa las dos células hijas. Así, una bacteria da origen a dos nuevos microbios que, a su vez, se dividirán igualmente dando cada uno dos nuevos descendientes y así sucesivamente.^[8]

Ciertas bacterias pueden reproducirse por esporulación. Situadas en condiciones de vida desfavorables, estos gérmenes esporulan, producen una espora, organismo mucho más resistente que la forma vegetativa de la que surgen. Cuando la espora encuentra un medio favorable para su desarrollo, germina, dando nacimiento a una bacteria comparable en todo sentido a la bacteria de origen. Este proceso, es un modo ocasional de conservación.^[8]

En vista de que se va a realizar un estudio químico de la especie *Pseudopterogorgia americana* con fines de evaluar la posible actividad hipoglicemiante que puedan presentar los metabolitos aislados de esta especie, es necesario dar un breve vistazo al origen del problema, éste es la diabetes y ciertos aspectos en torno a la misma.

I.2.4. Diabetes.

Las células del cuerpo necesitan energía para mantenerlo activo, mantener las funciones vitales, la temperatura corporal y los movimientos musculares entre otras funciones. Esta energía tiene su fuente de origen en la glucosa, la cual entra en el organismo a través del consumo de alimentos. Luego, con la digestión, a lo

largo del tubo digestivo se pone en marcha una cadena de transformaciones químicas que convierte los alimentos en elementos más pequeños:^[9]

Alimento	Nutriente	Elemento básico
Pan, arroz, garbanzos...	Hidratos de Carbono	Glucosa

Los alimentos transitan por el tubo digestivo y, al llegar al intestino delgado, la glucosa pasa a la sangre.^[9]

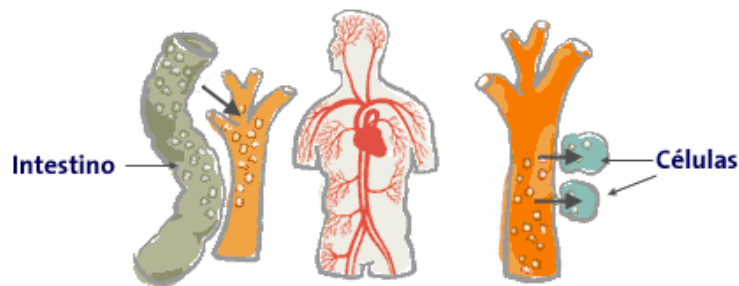


Figura 4. Absorción de la glucosa.^[9]

Para regular el uso de la glucosa en el organismo, el páncreas produce insulina, por lo cual es vital que para que el proceso metabólico se realice correctamente, el azúcar, el almidón y otros alimentos sean transformados en la energía que el cuerpo necesita para satisfacer los requerimientos de la vida diaria. Si el organismo no está en capacidad de generar o utilizar correctamente la insulina, se desarrolla una enfermedad conocida como diabetes.^[9]

La diabetes es una enfermedad crónica que incapacita al organismo de utilizar los alimentos adecuadamente, es decir, el proceso de metabolización de la glucosa no se realiza de manera eficaz y como consecuencia la glucosa no puede alojarse en las células.^[9]

Cuando los valores de glucosa en sangre se encuentran por debajo de 55 mg/dL, se denomina hipoglicemia; si están entre 70 y 110 mg/dL se consideran valores normales y se conoce como normoglicemia y cuando son mayores a 110 mg/dL, se consideran valores anormalmente altos, conocido como hiperglicemia, la cual puede causar numerosos problemas de salud tales como enfermedades en los riñones, pérdida de la visión y problemas vasculares y cardíacos.^[9]

I.2.4.1. Diabetes Mellitus.

La diabetes mellitus (DM), es un trastorno endocrino-metabólico crónico, que afecta la función de todos los órganos y sistemas del cuerpo: el proceso mediante el cual se dispone del alimento como fuente energética para el organismo (metabolismo), los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares) y la circulación de la sangre, el corazón, los riñones, y el sistema nervioso (cerebro, retina, sensibilidad cutánea y profunda, etc).^[10]

Las células metabolizan la glucosa para convertirla en una forma de energía útil; por ello el organismo necesita recibir glucosa (a través de los alimentos), absorberla (durante la digestión) para que circule en la sangre y sea distribuida por todo el cuerpo, y que finalmente, desde la sangre, entre al interior de las células para que pueda ser utilizada. Esto último sólo ocurre bajo los efectos de la insulina. En la DM el páncreas no produce o produce muy poca insulina ocasionando que las células del cuerpo no responden normalmente a la insulina que se produce, esto evita o dificulta la entrada de glucosa en la célula, aumentando sus niveles en la

sangre (hiperglicemia). La hiperglicemia crónica que se produce en la DM tiene un "efecto tóxico" que deteriora los diferentes órganos y sistemas y puede llevar al coma y la muerte.^[10]

La DM no es una patología única sino un síndrome, por lo cual esta denominación incluye hoy en día a varios tipos de afecciones diferentes pero con una característica común: la hiperglicemia y sus consecuencias. Hay cuatro clases de diabetes mellitus: DM tipo I (insulinodependiente o diabetes juvenil); DM tipo II (no insulinodependiente, generalmente iniciada en la adultez); DM gestacional (un tipo desarrollado durante el embarazo); y otros tipos de diabetes (desarrollados en el contextos de otras enfermedades o trastornos que se asocian a DM).^[10]

Existen muchos factores de riesgo para esta enfermedad, como:

- Herencia.
- Obesidad.
- Edad superior a 45 años.
- Algunos grupos étnicos (particularmente afroamericanos, nativos americanos, asiáticos, isleños del pacífico e hispanoamericanos).
- Diabetes gestacional o parto de un bebé con un peso mayor a 4 kg.
- Presión arterial alta.
- Niveles altos de triglicéridos en la sangre (un tipo de molécula grasa).
- Nivel alto de colesterol en la sangre.
- Sedentarismo.^[10]

La Asociación Estadounidense para la Diabetes (American Diabetes Association) recomienda que todos los adultos mayores de 45 años se sometan a un examen para diabetes al menos cada tres años y con una frecuencia mayor para las personas que se encuentran en alto riesgo.^[11]

I.2.4.2. Diabetes mellitus tipo I.

A este tipo también se le conoce como diabetes de la juventud o diabetes dependiente de la insulina y es provocada por una destrucción (inmunológica) de las células productoras de insulina del páncreas. Los pacientes con este tipo de diabetes deben aplicarse insulina, de no hacerlo, pueden ser propensos a presentar un coma diabético y por esta razón el tratamiento desde el momento del diagnóstico es con insulina en inyecciones subcutáneas.^[12]

I.2.4.3. Diabetes Mellitus tipo II.

Conocida como diabetes del adulto o diabetes no dependiente de la insulina, es la forma más frecuente de diabetes y se presenta como resultado de una resistencia a la acción de la insulina con una secreción insuficiente de la misma por el páncreas.^[12]

Los pacientes con diabetes tipo II permanecen sin diagnóstico entre 5 y 10 años, como consecuencia de que los síntomas que presentan son leves, en otras palabras, presentan ligera elevación de la glucosa en sangre y por ello no manifiestan los síntomas de la enfermedad.^[12]

El riesgo de presentar diabetes se incrementa con la edad, la obesidad, la falta de ejercicio físico, hipertensión arterial (elevación de la presión arterial), dislipidemia (elevación de las grasas en la sangre, como son el colesterol y los triglicéridos). Está fuertemente asociada con una predisposición genética.^[12]

I.2.4.4. Diabetes Mellitus Gestacional.

La diabetes gestacional, es una condición en la cual el nivel de la glucosa es elevado y otros síntomas de la diabetes aparecen durante el embarazo en una mujer que no ha sido diagnosticada con diabetes previamente. Todos los síntomas de la diabetes desaparecen después del parto.^[13]

A diferencia de la diabetes mellitus de tipo I, la diabetes gestacional no es causada por la carencia de insulina, sino por los efectos bloqueadores de las otras hormonas en la insulina producida, una condición referida como resistencia a la insulina.^[13]

I.2.4.5. Glucólisis.

La energía química almacenada en la glucosa y en otras moléculas combustibles se libera para realizar trabajo biológico. El principal combustible de la mayoría de los organismos es la D-glucosa y juega un papel muy importante en el metabolismo pues es un precursor extremadamente versátil, capaz de suministrar una gran cantidad de intermediarios metabólicos, que son materiales de partida necesarios para reacciones biosintéticas.^[14]

El destino metabólico de la glucosa podría abarcar numerosas transformaciones pero en las plantas y animales superiores tiene tres destinos principales:

- Puede ser almacenada.
- Oxidada a un compuesto de tres carbonos (piruvato) vía glucólisis.
- Oxidada a pentosas, vía ruta de las pentosas fosfato (fosfogluconato).^[14]

La glucólisis es una ruta metabólica en la que se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, dando dos moléculas de piruvato. Durante la secuencia de reacciones, parte de la energía libre cedida por la glucosa se conserva en forma de ATP (Figura 5).^[14]

La rotura de la glucosa, que contiene seis átomos de carbono en dos moléculas del piruvato formado por tres carbonos tiene lugar en diez pasos, divididos en dos fases.^[14]

Los cinco primeros pasos constituyen la fase preparatoria; es estas reacciones la glucosa es fosforilada en primer lugar en el grupo hidroxilo en el carbono 6 (paso 1). La D-glucosa-6-fosfato formada se convierte en D-fructosa-6-fosfato (paso 2) que vuelve a ser fosforilada pero esta vez en el carbono 1, generando D-fructosa-1,6-bisfosfato (paso 3). El ATP es el dador de fosfato en ambas fosforilaciones.^[14]

La fructosa-1,6-bisfosfato se cliva a continuación dando dos moléculas de tres carbonos, la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato (paso 4); éste es el paso de la ruptura. La dihidroxiacetona fosfato se isomeriza a una segunda molécula de gliceraldehído-3-fosfato (paso 5), lo que finaliza la primera fase de la glucólisis.^[14]

El retorno energético tiene lugar en la fase de beneficios de la glucólisis. Cada molécula de gliceraldehído-3-fosfato es oxidada y fosforilada por fosfato inorgánico (no por ATP) formando 1,3-bisfosfoglicerato (paso 6). En la conversión de las dos moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato en dos moléculas de piruvato (pasos 7 a 10) se libera energía.^[14]

I.2.4.6. Gluconeogénesis.

La gluconeogénesis es la formación de glúcidos o carbohidratos a partir de precursores no glucídicos, de los cuales los más importantes son el piruvato, el lactato, la alanina y el glicerol.^[14]

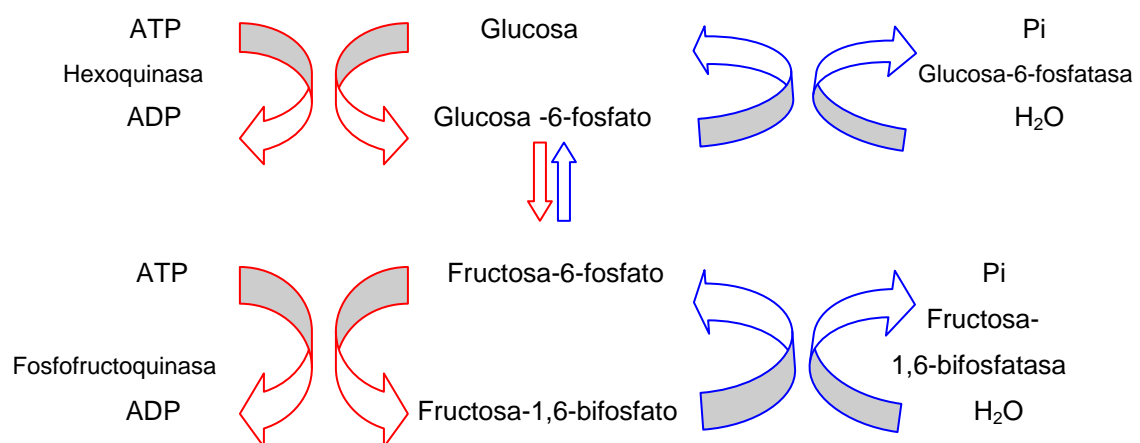
Del mismo modo que la conversión glucolítica (glucólisis) de la glucosa en piruvato es una ruta central del catabolismo glucídico, la conversión del piruvato en glucosa es una ruta central en la biosíntesis de glúcidos. Estas rutas no son idénticas aunque comparten muchos pasos. Siete de las diez reacciones de la gluconeogénesis son la inversa de las reacciones glucolíticas.^[14]

La gluconeogénesis hepática se encuentra regulada en dos puntos principales (Figura 5):

1. La carboxilación del piruvato por la piruvato carboxilasa.
2. La desfosforilación de la fructosa-1,6-bisfosfato por la fructosa-1,6-bisfosfatasa.^[14]

Glicólisis

Gluconeogénesis



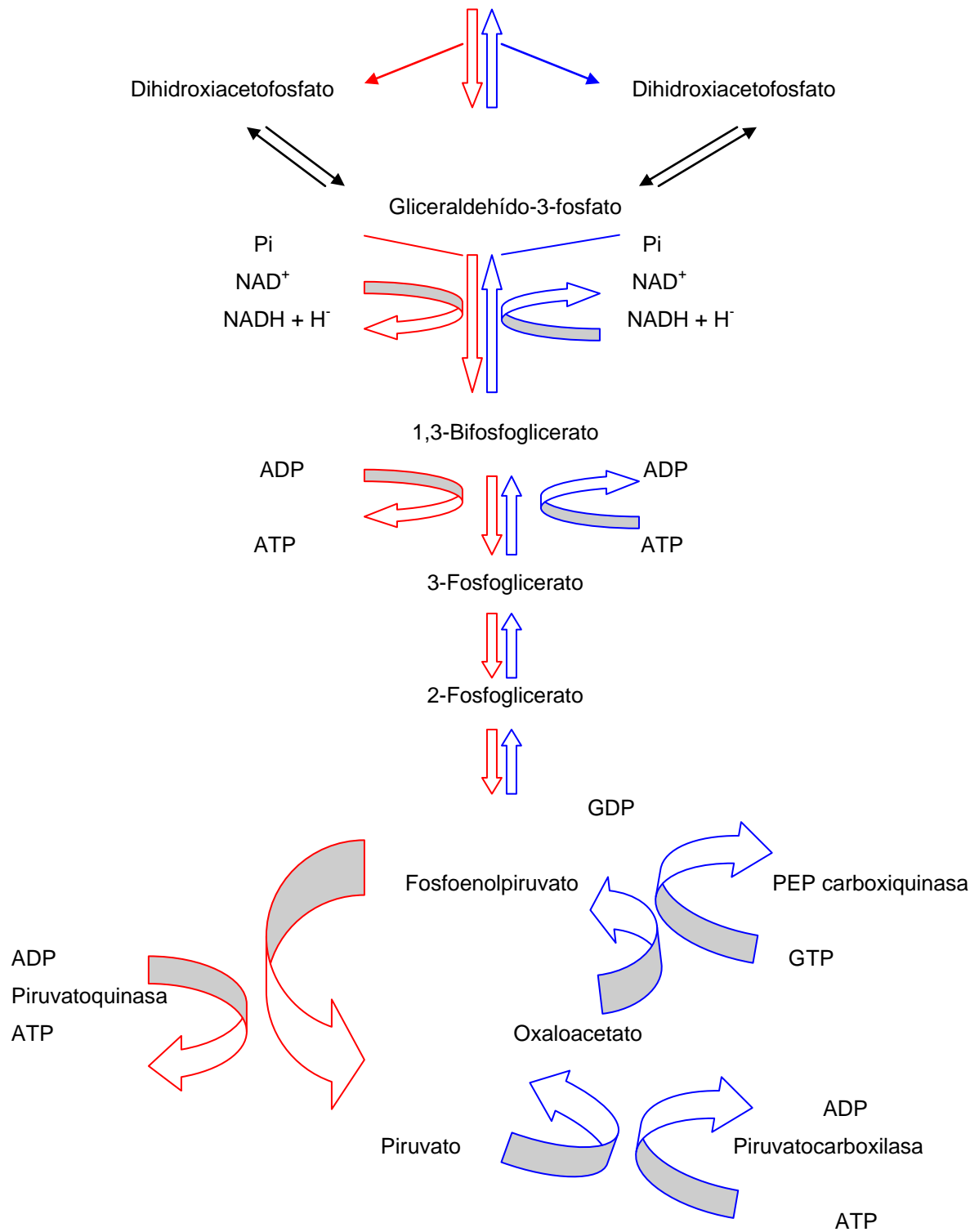


Figura 5. Reacciones de Glucólisis y Gluconeogénesis. ^[14]

I.2.4.7. Sistema glucosa-6-fosfatasa.

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) es una enzima localizada predominantemente en el retículo endoplasmático (RE) del hígado y del riñón y cataliza el paso final tanto de la gluconeogénesis como de la glucólisis, convirtiendo la glucosa-6-fosfato (G-6-P) en glucosa (G) y fosfato inorgánico (Pi).^[15]

La enzima G-6-Pasa ha sido descrita por Burchell y col.^[16], como un sistema multicomponente formado por cinco polipéptidos (Figura 6): la subunidad catalítica, con su sitio dirigido hacia el lumen del RE, una proteína estabilizadora y tres proteínas transportadoras: T1 que se encarga de transportar la G-6-P hacia el lumen del RE donde se hidroliza en glucosa y fosfato inorgánico; T2 y T3 que se encargan de transportar los productos formados (G y Pi) hacia el citosol, respectivamente.^[16]

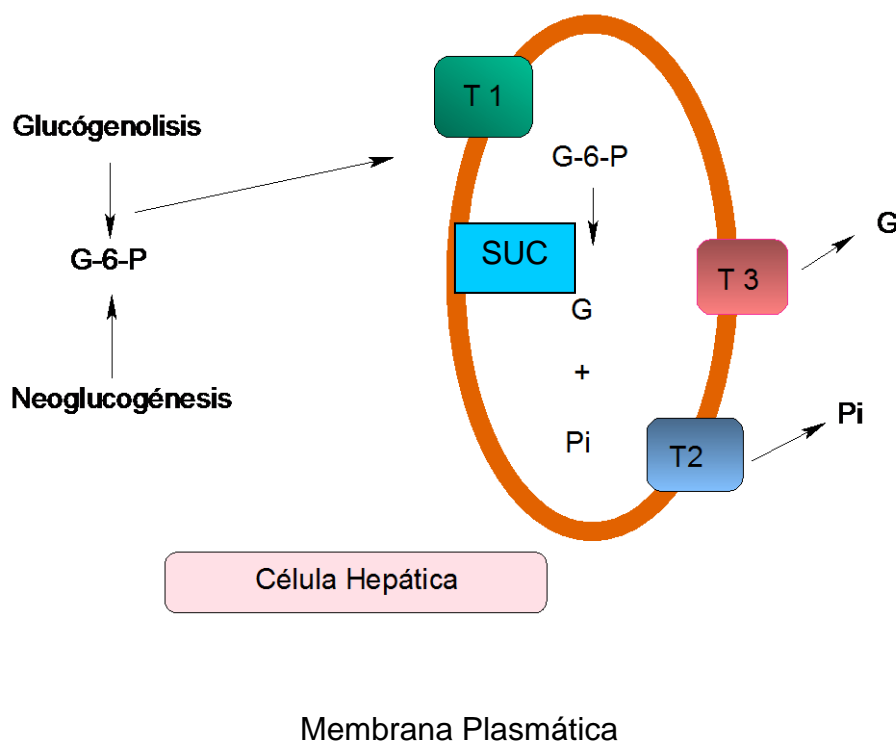


Figura 6. Diagrama esquemático del metabolismo de la glucosa hepática.^[16]

Según este modelo, si alguno de los componentes del sistema de la G-6-Pasa es inhibido, se disminuye la capacidad del hígado de producir glucosa por gluconeogénesis o glucólisis con la consecuente reducción de la glicemia. De esta manera la inhibición de la enzima G-6-Pasa podría ser utilizada para controlar la hiperglicemia presente en la diabetes mellitus tipo II.^[15]

Existen algunos inhibidores reportados para la enzima G-6-Pasa como lo son: ácido clorogénico y algunos flavonoides tal y como lo señalan Estrada y col.^[17]

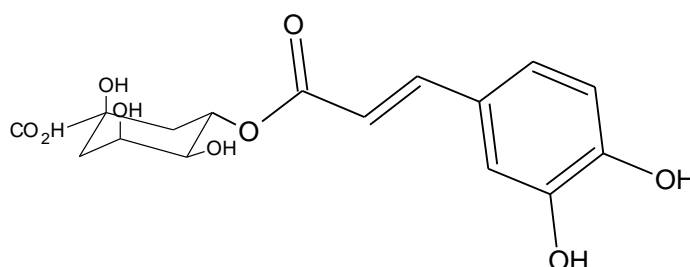


Figura 7. Ácido Clorogénico.^[17]

Tomando en cuenta que se realizará la evaluación de la actividad biológica del material extraído de la especie *Pseudopterogorgia americana*, se va a revisar de manera general algunas pruebas de actividad biológica encontradas en la literatura.

I.2.5. Pruebas de actividad biológica.

La actividad biológica se refiere a cualquier efecto que ejerce la muestra sobre los seres vivos, de modo que existe un gran número de ensayos utilizados para monitorear los estudios químicos.^[18]

Cuando el estudio químico está destinado al aislamiento de principios activos responsables de una determinada actividad se usarán ensayos específicos. Sin embargo, McLaughlin ha presentado tres bioensayos simples que pueden ser aplicados con carácter general, éstos son:

- a) Mortalidad de *Artemia salina*, que tiene una correlación positiva con ensayos sobre células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) por lo que puede ser usado para detectar antitumorales y pesticidas.^[18, 19]

Al ser colocados los huevos de camaroncitos de *salina* en agua de mar, después de 48 horas se produce una cantidad de larvas útiles para usos experimentales. Los extractos de productos naturales, las fracciones o los compuestos puros son evaluados por triplicado en frascos que contienen 5 mL de agua de mar y diez camaroncitos. Después de 24 horas se cuentan los sobrevivientes.^[19]

El ensayo de *Artemia salina*, es poco costoso y poco laborioso, además es rápido y simple. Se utilizan grandes cantidades de organismos para validaciones estadísticas.^[19]

- b) Efectos inhibitorios del crecimiento de tumores sobre discos de papa ("Crown gall") causados por una droga. Éste es paralelo al efecto observado en ensayos *in vivo* contra células 3PS (leucemia tipo murine), por lo cual el ensayo es útil para detectar compuestos anticancerígenos.^[18, 19]

Los tumores cancerosos tipo corona (Crown gall) representan una enfermedad neoplásica de las plantas, inducida por la bacteria Gram negativa, *Agrobacterium tumefaciens*. Se demostró que el efecto inhibitorio del crecimiento de los tumores cancerosos tipo corona en discos de tubérculos de papas, muestra una

aparente correlación con el efecto antitumoral de compuestos y extractos de plantas que son activos en los ensayos *in vivo* contra células 3PS.^[19]

- c) Efectos sobre el crecimiento de una planta acuática, *Lemna minor*, (dockweed) que se usa en el despistaje simple de varias actividades, incluyendo antitumoral, herbicida y estimulante del crecimiento de las plantas.^[18, 19]

Lemna minor, es una monocotiledonia acuática en miniatura. Las plantas de *Lemna* tienen una fronda central ovoidal o fronda madre con dos frondas hijas pegadas a los lados y una raíz con filamentos. Bajo condiciones normales la planta se reproduce exponencialmente a partir de las frondas hijas a los lados de la fronda madre. Este ensayo es similar al de la mortalidad de la *artemia salina*, porque de igual manera se prepara una serie de soluciones de la sustancia a evaluar. En dicha solución se hace crecer la planta y luego de unos días se cuentan el número de frondas y se hace el estudio estadístico.^[19]

Se van a aplicar los ensayos de mortalidad de *Artemia salina*, ensayos de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer y la determinación de la actividad de los productos que se logren aislar en el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa, descrita por Burchell y Waddel.

Ahora, la revisión va a estar enfocada hacia el phylum al que pertenece la especie *Pseudopterogorgia americana*, con el objeto de conocer las características generales de los organismos pertenecientes a dicho phylum.

I.2.6. Phylum Cnidarios.

El filo coelenterata o cnidaria, incluye las hidras, bien conocidas, medusas, anémonas de mar y corales. Los colores brillantes de muchas especies aunados a su simetría radial, crean a menudo un índice de belleza sobrepasado por pocos animales.^[20]

Los celentéreos o celenterados poseen dos características estructurales propias de los metazoarios. En primer término, un espacio interno para la digestión, llamada en estos animales cavidad gastrovascular (Figura 8). Esta cavidad se extiende a lo largo del eje polar del animal y se abre al exterior de un extremo para formar una boca. La presencia de cavidad digestiva y boca permite a estas especies utilizar una gama mucho más amplia, en cuanto se refiere al tamaño de las partículas alimenticias que la empleada por los protozoarios y las esponjas. Por otra parte, se observa en los celentéreos un círculo de tentáculos, que representan prolongaciones en la pared corporal, rodeando la boca, y que constituyen una importante ayuda en la captura e ingestión del alimento.^[20]

La pared corporal de los celentéreos consta de tres capas fundamentales (Figura 8), una externa de epidermis, otra interna integrada por células de revestimiento de la cavidad gastrovascular, y entre ambas una tercera capa llamada mesoglea. Esta última puede variar desde una membrana delgada, no celular, hasta una estructura mucoide, parecida a gelatina, fibrosa y gruesa, con amibocitos errantes o sin ellos.^[20]

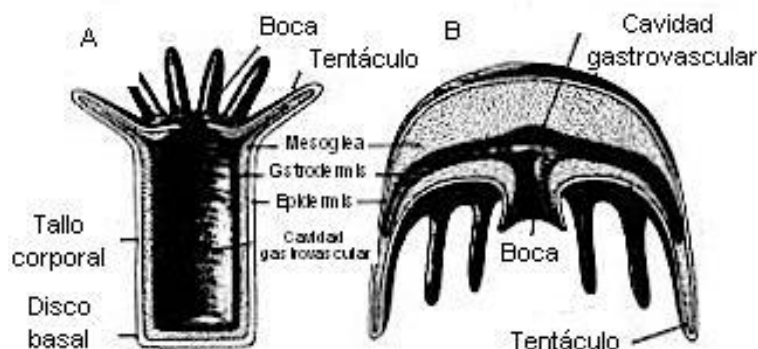


Figura 8. A, Forma corporal polipoide. B, Forma corporal medusoide.^[20]

Sí bien todos los celentéreos se caracterizan por la presencia de tentáculos y por su simetría radial, se han observado dos tipos estructurales distintos dentro del filo. Uno de ellos, sésil, es conocido como pólipo, el otro, que nada libremente, recibe el nombre de medusa. En forma típica, el cuerpo de un pólipo es un tallo cilíndrico cuyo extremo oral, portador de la boca y tentáculos, se dirige hacia arriba, y el extremo opuesto o aboral permanece fijo (Figura 8. A). El cuerpo medusoide parece una campana o una sombrilla, con la parte convexa hacia arriba y la boca localizada en el centro de la superficie inferior cóncava (Figura 8. B).^[20]

Algunos de estos animales muestran solamente forma polipoide, otros sólo medusoide, mientras otros pasan por ambas formas durante el curso de su ciclo vital.^[20]

Salvo las hidras y algunos otros hidrozooarios de agua dulce, todos los celentéreos son marinos. La mayor parte viven en los litorales; las formas sésiles abundan en las costas rocosas o en formaciones coralinas de aguas tropicales. El filo está compuesto de unas 9000 especies vivas y los ricos depósitos fósiles datan del período cámbrico.^[20]

Como el objeto de estudio de esta investigación es un invertebrado de forma polipoide, profundizaremos el estudio de las hidras, para comprender la estructura de la especie.^[20]

Las hidras son pólipos solitarios, cilíndricos, que fluctúan de unos pocos milímetros a 1 cm o más de longitud, su diámetro rara vez excede de 1 mm. El extremo aboral del tallo cilíndrico que constituye el cuerpo forma un disco basal, que sirve al animal para fijarse al substrato. El extremo oral contiene una prominencia o cono llamado hipostoma en cuya parte superior se encuentra la boca.^[20]

En cuanto a la locomoción, se tiene que el tallo corporal y los tentáculos de la hidra pueden extenderse, contraerse, o incurvarse a un lado y a otro. El líquido de la cavidad gastrovascular desempeña un papel importante como esqueleto hidráulico, absorbiendo agua por la boca, como resultado de la vibración de los flagelos gastrodérmicos.^[20]

Las hidras, como muchos celentéreos, son carnívoras y se alimentan principalmente de pequeños crustáceos. El contacto con los tentáculos provoca la descarga de los nematocistos, los cuales primero envuelven y después paralizan la presa. Los tentáculos llevan el organismo capturado hacia la boca, la cual se abre para recibirlo. La abertura de la boca quizá obedezca a un reflejo iniciado por liberación de glutatión reducido por parte de la presa. La secreción de moco ayuda a la deglución, pudiendo la boca distenderse mucho. Por último, la presa llega a la cavidad gastrovascular. Luego se inicia la digestión de las proteínas y luego la digestión continúa en el interior de las células.^[20]

Estos animales carecen de órganos especiales para la respiración y excreción. El intercambio de gases se produce a través de la superficie del cuerpo.

Los desechos nitrogenados son casi exclusivamente en forma de amoníaco que también se difunde por la superficie corporal.^[20]

Dentro de este filo se agrupan varias clases, entre ellas están: la clase Hydrozoa (hidrozoarios), clase Scyphozoa (escifiziarios) y clase Anthozoa (antozoarios).^[20]

- | | | |
|--|---|------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Excrecencias marinas adheridas a las rocas, conchas y pilotes de los muelles. • Los pocos cnidarios de agua dulce conocidos. • Algunas medusas dulceacuícolas con etapas polipoidales reducidas. | } | Clase Hydrozoa. |
| <ul style="list-style-type: none"> • Medusas. | } | Clase Scyphozoa. |
| <ul style="list-style-type: none"> • Anémonas de mar. • Gorgonias. • Corales. • Trinitarias marinas. | } | Clase Anthozoa. |

De las clases mencionadas, la clase anthozoa es la que agrupa a los corales y por tal motivo es de interés para complementar la información bibliográfica acerca de la especie *Pseudopterogorgia americana*.

I.2.6.1. Clase Anthozoa.

Los antozoos son celentéreos polipoides solitarios o coloniales en los que no se observa etapa medusoide. Son miembros de esta clase muchas formas bien

conocidas como anémonas de mar, gorgonias, corales y trinitarias de mar. Es sin duda, la clase más nutrida de los celentéreos, ya que incluye más de 6000 especies.^[20]

Aunque los antozoos son polipoides difieren netamente de los pólipos de hidrozoos. La boca conduce a una faringe tubular que se extiende a más de la mitad de camino en la cavidad gastrovascular (Figura 9). La faringe deriva del ectodermo invaginado. La cavidad gastrovascular está dividida por tabiques o mesenterios longitudinales, en compartimientos radiados, y los bordes mesentéricos ostentan nematocistos y éstos no poseen tapa u opérculo. Las gónadas son gastrodérmicas. El nematocisto tiene su extremo superior dividido en tres partes que se pliegan hacia atrás durante la expulsión.^[20]

En esta clase están incluidos los corales octocoralarios, éstos junto con otras especies marinas, como plumas de mar, abanicos de mar, pensamientos de mar, órganos de mar y el coral látigo forman la subclase Octocorallia (octocorales) o Alcyonaria (alcionarios).^[20]



Figura 9. Estructura de un pólipo antozoario. Sección longitudinal.^[20]

I.2.6.2. Subclase Octocorallia.

Los octocorales tienen siempre ocho tentáculos pinados, es decir, poseen ramas laterales en forma de pluma. En relación con el número de tentáculos, hay siempre ocho mesenterios completos, y poseen un sólo sifonoglifo.^[20]

Los octocorales son cnidarios coloniales, los pólipos (Figura 10) de una colonia de octocorales están unidos por masas de tejido que reciben el nombre de cenénquima y que consisten en porciones de mesoglea perforadas por tubos gastrodérmicos que se continúan con las cavidades gastrovasculares de los pólipos.^[20]

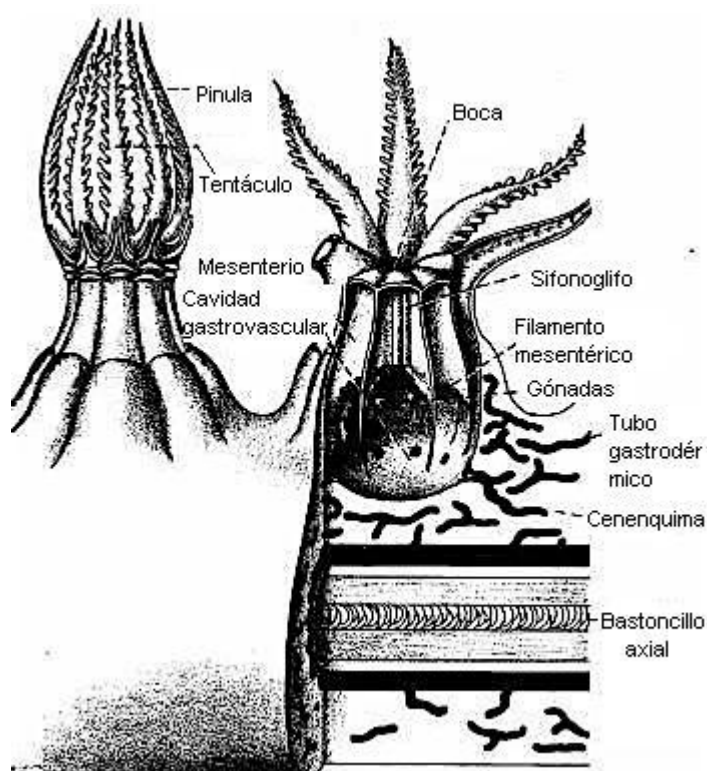


Figura 10. Estructura de un coral gorgónido de la subclase octocorallia de los antozoarios (Según R. C. Moore).^[20]

Entre las formas más conocidas de octocorales destacan las gorgonias o corales córneos (orden Gorgonacea), que incluye las plumas de mar, abanicos de mar, el coral látigo y el preciado coral rojo (*corallium*). Los gorgónidos son miembros corrientes y conspicuos de las faunas de arrecife.^[20]

I.2.6.3. Orden Gorgonacea.

El cuerpo de la mayor parte de los corales gorgónidos posee un bastoncillo axial central compuesto de una sustancia orgánica llamada gorgonina. En torno al eje hay un cilindro de cenénquima y pólipos (Figura 10).^[20]

El cenénquima posee osículos o espículas calcáreas enclavadas, de diferentes formas y colores. Es precisamente el color de las masas calcáreas del esqueleto el que presta su matiz amarillo, anaranjado o el color de espliego de algunas especies. El color amarillo pardo de muchas especies de arrecife proviene de la presencia de zooxantellas simbióticas.^[20]

Las colonias de la mayoría de los corales gorgónidos son varas erectas ramificadas y parecen así más bien plantas.^[20]

I.3. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA.

Reino: Animalia.

Phylum: Cnidaria.

Clase: Anthozoa.

Subclase: Alcyonaria.

Orden: Gorgonacea.

Familia: Gorgoniidae.

Género: *Pseudopterogorgia*.

Especie: *P. americana*.^[21]

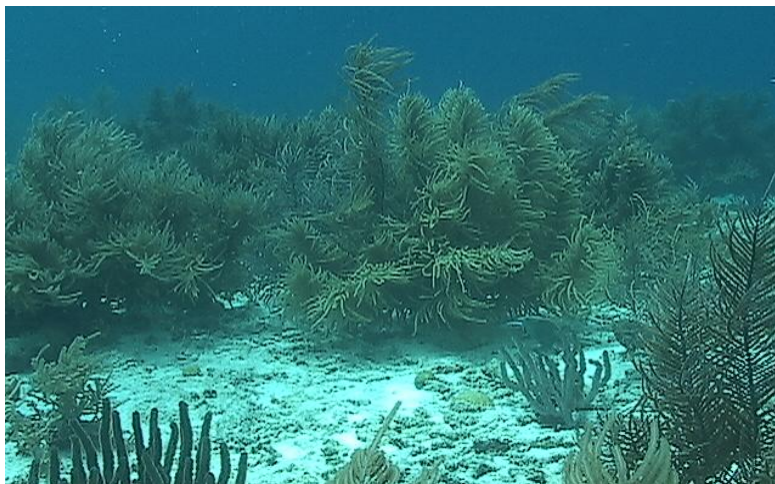


Figura 11. Especie *Pseudopterogorgia americana*.^[22]

Esta especie fue clasificada por el naturalista y químico alemán Johann Friedrich Gmelin en el año 1791.^[23]

Nombre científico: *Pseudopterogorgia americana* (Gmelin, 1791).^[24]

Nombre común: Rama.^[24]

Descripción general: Colonia de una altura aproximada de 75 cm, ramificada, bipinada, flexible, con pinas hasta de 15 cm de longitud. Superficie de la colonia muy viscosa o mucosa. Escleritos corticales escafoides, fuertemente curvados, entre 0,1 y 0,2 mm de longitud y escleritos husiformes de entre 0,08 y 0,10 mm de longitud; escleritos de los pólipos en forma de varillas octorradiadas. Axis cilíndrico, córneo, negro o marrón claro y con estrías longitudinales. Cuando se colectan y se extraen ejemplares fuera del agua, expulsan un mucus viscoso. Al secarse, las ramas se secan por el mucus secretado, lo que hace a los ejemplares poco atractivos.^[24, 25]

Habitáculo: Se localiza entre los espacios arenosos de las formaciones de arrecifes de Punta Charagato y Playa Conejo (Isla de Cubagua) y el Farallón (Isla de Margarita) hasta unos 5 m de profundidad sobre sustratos duros constituidos por arenas esqueléticas y rocas, sedimentos gravosos y encima de corales pétreos. También se encuentran en el Parque Nacional Morrocoy y en un arrecife costanero de Isla Alcatraz.^[24]

Coloración en vivo: Amarillo pálido.^[24]

Coloración en seco: Negro.^[24]

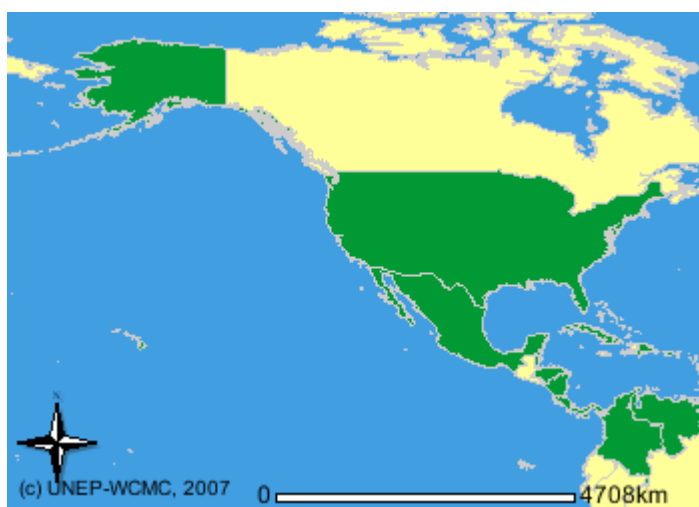
Otros miembros del género *Pseudopterogorgia*:

- *P. acerosa*
- *P. albatrossae*
- *P. anceps*
- *P. australiensis*
- *P. bipinnata*
- *P. blaquilenesis*
- *P. elisabethae*
- *P. formosa*
- *P. fredericki*
- *P. hummelincki*
- *P. hystrix*
- *P. kallos*
- *P. luzonica*
- *P. marcgravii*
- *P. navia*
- *P. oppositipinna*
- *P. pinnata*

- *P. rigida*
- *P. rubrotincta*
- *P. thomassini*
- *P. torresia* ^[26]

Distribución General: Alaska, Bahamas, Belize, Colombia, Costa Rica, Cuba, Estados Unidos, República Dominicana, Honduras, Martinica, México, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, Venezuela. ^[26]

Distribución en Venezuela: Archipiélago Los Roques, Isla de Margarita, Romero, Isla de Cubagua, Isla Larga, Islotes Caribe y Los Lobos, Parque Nacional Morrocoy, Isla Alcatraz. ^[24]



Leyenda:

- Existencia a nivel de país.
- Ausencia a nivel de país.

Figura 12. Distribución General.

I. 4. ANTECEDENTES.

El estudio de la especie *Pseudopterogorgia americana* en la búsqueda de metabolitos secundarios que posean actividad biológica ha sido de interés para muchos investigadores alrededor del mundo. Estos estudios han sido llevados a cabo desde hace ya varios años y los resultados que han sido obtenidos se resumen en esta investigación, de manera de dar soporte a la misma.

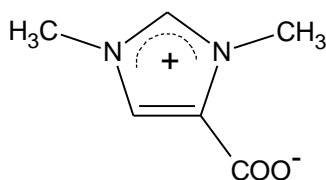
En el año 1973, A. J. Weinheimer y col. Aislaron una nueva betaina marina, esta es la Norzooanemonina **(1)**, fue separada del extracto etanólico de la especie *Pseudopterogorgia americana* por intercambio iónico seguido por cromatografía en columna. Su estructura fue deducida por su composición elemental conocida en un espectro de masas y adicionalmente se tomaron espectros de IR y RMN ^1H , y dicha estructura ha sido confirmada a través de síntesis.^[4, 27]

El ejemplar fue colectado en Florida, se tenían 3,5 Kg de la corteza superficial de *Pseudopterogorgia americana*, ésta fue extraída con hexano frío y caliente, y con 3 litros de etanol 95 por ciento. El extracto etanólico filtrado fue reducido a la mitad de su volumen y diluido con un volumen igual de agua destilada. Luego de un tiempo, el precipitado fue removido por filtración. Una pequeña alícuota de la solución fue evaporada a sequedad, y de la masa del residuo, se estimó que la solución contenía aproximadamente 100 g de sólidos disueltos. La solución alcohólica al 50 por ciento fue pasada a través de una columna de Bio-Rad AG 21 K, resina de intercambio iónico de grado analítico, la cual había sido lavada con alcohol acuoso 50 por ciento.^[27]

La solución del efluente de la columna anterior fue pasada por una segunda columna de Dowex 50W-XB resina de intercambio iónico, esta columna fue eluída primero con alcohol acuoso al 50 por ciento y luego con hidróxido de amonio 5 por

ciento. La solución de hidróxido de amonio fue evaporada a sequedad, quedando 10 g de material, el cual fue sometido a cromatografía en columna sobre 400 g de alúmina empleando una mezcla de etanol- hidróxido de amonio (10:1) como eluente. Se recolectaron 10 fracciones de 25 mL y una fracción de 500 mL.^[27]

Se encontraron 150 mg de Norzooanemonina en las tres últimas fracciones de 25 mL y en la fracción de 500 mL. Fue recrystalizado en una mezcla de metanol-acetona y se obtuvo como un sólido incoloro de punto de fusión (260- 263) °C.^[27]

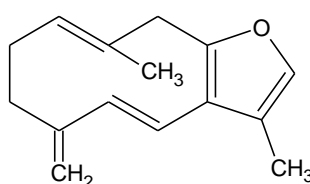


(1)

En el año 1982, Richard R. Izac y col. Examinaron diversas especies marinas del phylum Cnidaria, entre ellas la especie *Pseudopterogorgia americana*, y reportaron la separación e identificación de un nuevo furano sesquiterpénico de la clase germacreno, del extracto de cloroformo de esta especie, furanotrieno **(2)**, una combinación de información espectral de masas y RMN ¹³C indicaron una fórmula molecular de C₁₅H₁₈O para este metabolito, el cual sugiere un grado inusual de insaturación de 7. La utilización de un sólo átomo de O en un anillo furano α,β,β'-trisustituido, fue indicado por la eliminación de las demás funcionalidades del O que se pudieran concebir, a través de información obtenida de los espectros de IR y RMN ¹³C.^[4, 28]

El ejemplar de la pluma marina *Pseudopterogorgia americana* fue colectado en Carrie Bow Cay Belice, en abril de 1978. Dicho ejemplar fue colocado en una

mezcla (2:1) cloroformo- metanol, fue levemente calentada y luego filtrada, luego de tres repeticiones, los extractos fueron reducidos en vacío. El residuo fue disuelto en cloroformo, secado con sulfato de magnesio, y luego filtrado, el solvente fue removido en vacío dando como resultado el extracto crudo final. Seguidamente se realizó cromatografía de columna con silica gel. Finalmente lograron purificar el moderadamente inestable furano **(2)**, a través de HPLC (isooctano).^[28]



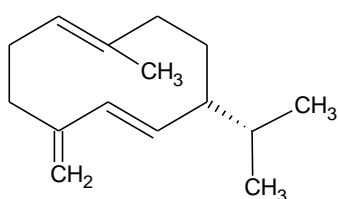
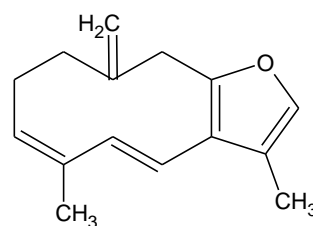
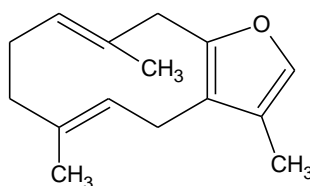
(2)

En el año 1990, Wilfred R. Chan y col. Reportaron la separación y caracterización de los derivados germacranolidos **(3)-(5)** y uno ya aislado en el año 1982 **(2)** ^[28] como los metabolitos mayoritarios aislados del extracto de éter de petróleo de la especie *Pseudopterogorgia americana*.^[29]

La muestra fue colectada en la Bahía Man-O-War, Tobago, Trinidad y Tobago, en marzo de 1984. 400 g secos de la muestra fueron cortados y colocados en 1,5 L de acetona por 24 horas. El extracto de acetona fue sometido a partición entre 600 mL de éter de petróleo y 500 mL de metanol acuoso 90 por ciento. El extracto de éter de petróleo dio 24,9 g de aceite verde oscuro luego de evaporar el solvente. 1,0 g de extracto crudo fue separado por cromatografía de capa fina preparativa con éter de petróleo como eluyente. La misma dio, en orden decreciente de R_f (+)-germacreno-D **(3)** (69 mg), furanotrieno **(2)** (46 mg), aislado por primera vez en 1982, y una mezcla de isofuranotrieno **(4)** (30 mg) y furanodieno **(5)** (15 mg), que fue separada por cromatografía de capa fina preparativa usando nitrato de plata

15 por ciento, silica impregnada con éter de petróleo- acetato de etilo (9:1) como eluente.^[29]

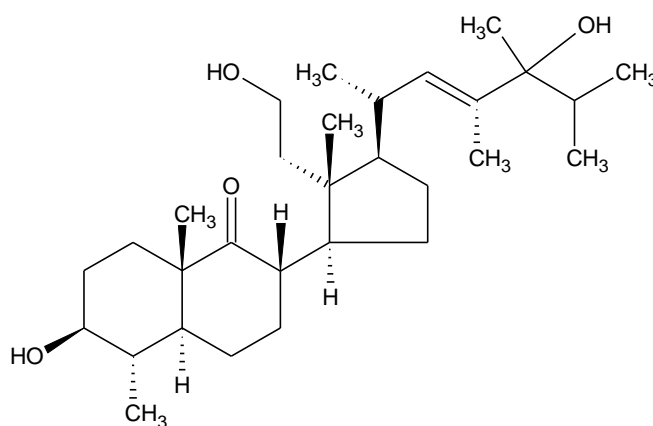
Furanotrieno **(2)** e isofuranotrieno **(4)** fueron separados como un aceite amarillo inestable, por la exposición al aire se descomponían rápidamente.^[29]

**(3)****(4)****(5)**

En el año 1995, Samuel L. Miller y col. Reportaron la separación y caracterización de 9,11-Seco-24-hidroxdinosterol **(6)** como un nuevo metabolito de los extractos de *Pseudopterogorgia americana*, la separación del 9,11-seco-24-hidroxdinosterol representa el primer ejemplo de un secoesterol que posee el núcleo dinostano, mientras que el único ejemplo conocido de un esterol polihidroxdinostano fue recientemente separado de la especie *Pseudopterogorgia acerosa*. Para la

caracterización de la estructura emplearon las técnicas de EM, IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C .^[30]

9,11-Seco-24-hidroxicinosterol (**6**) fue separado como una goma incolora.^[30]

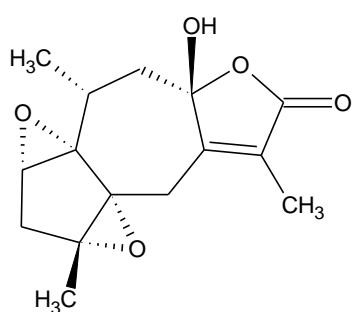
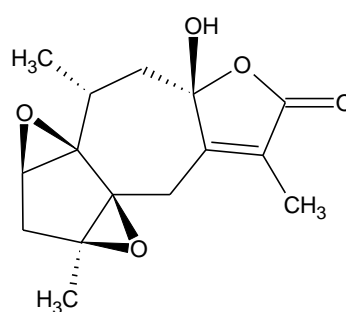
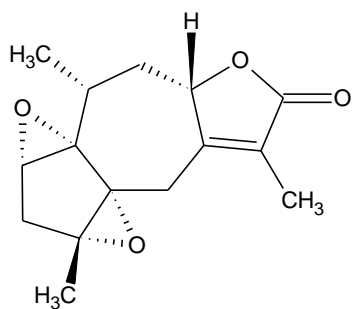
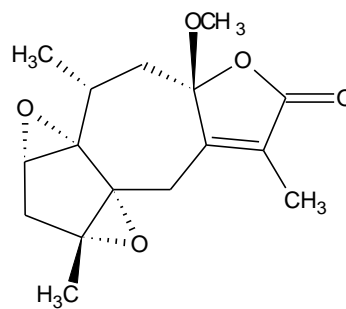


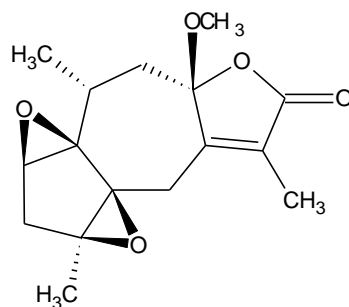
(6)

En el año 1996, Abimael D. Rodríguez y Anna Boulanger, reportaron la separación de tres nuevos sesquiterpenos guaianolidos A, B y C, junto con dos derivados 8 β -metoxi, del extracto de cloroformo de la especie *Pseudopterogorgia americana*, ellos son: americanolida A (**7**), americanolida B (**8**) y americanolida C (**9**), metoxiamericanolida A (**10**) y metoxiamericanolida B (**11**), los compuestos conocidos fueron identificados por comparación espectral con muestras auténticas, y las estructuras de los nuevos compuestos fueron establecidas por técnicas espectroscópicas, principalmente IR y RMN ^1H y RMN ^{13}C .^[31]

La muestra fue colectada en La Parguera, Lajas, Puerto Rico, en diciembre de 1994. El residuo del extracto metanol-cloroformo (1:1) obtenido del espécimen seco (2,3 Kg) fue extraído con hexano seguido por cloroformo. El residuo obtenido del extracto de cloroformo, quedó como un residuo aceitoso oscuro (17,7 g), fue pasado

por cromatografía de absorción sobre sílica gel con cloroformo conteniendo proporciones crecientes de metanol, dando un grupo de fracciones que contenía una mezcla compleja de muchos metabolitos. Ésta fue separada por cromatografía en columna y luego se purificaron los compuestos obtenidos mediante la técnica de HPLC en fase normal, para obtener los cinco nuevos derivados guaianolidos **(7)**–**(11)**.^[31]

**(7)****(8)****(9)****(10)**

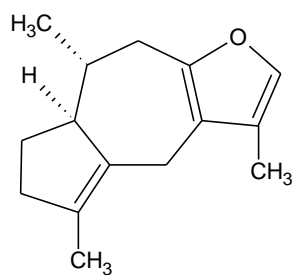
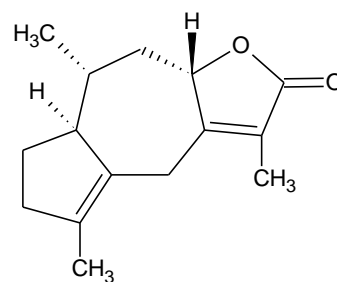
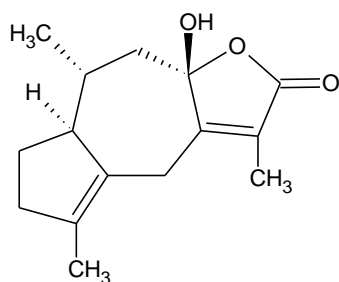
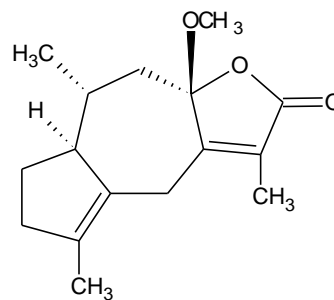
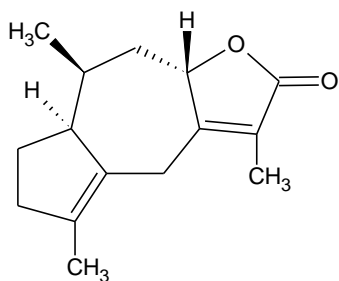
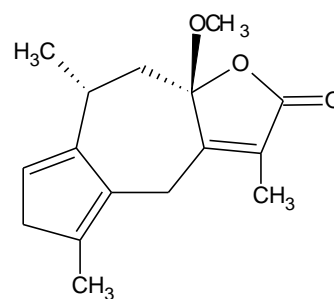


(11)

Luego en el año 1997, Abimael D. Rodríguez y Anna Boulanger continuaron los estudios sobre la especie *Pseudopterogorgia americana*, la mezcla de sesquiterpenos guaianolidos reportada en 1996^[31] por ellos mismos, fue examinada con más detalle y se encontró que consistía principalmente de seis nuevos componentes, entonces reportaron la separación y la elucidación de estructuras de metabolitos guaianolidos, éstos fueron separados del extracto de hexano de la especie, los nuevos metabolitos se citan a continuación: furanoguaian-4-eno (**12**), americanolida D (**13**), americanolida E (**14**), metoxiamericanolida E (**15**), americanolida F (**16**) y metoxiamericanolida G (**17**). La asignación de sus estructuras y las estereoquímicas relativas fueron basadas en interpretación de datos espectroscópicos, estudio de modelaje molecular y la comparación con compuestos conocidos. Se encontró que la mayoría de los nuevos metabolitos se descomponían lentamente bajo condiciones de medida espectral normales.^[32]

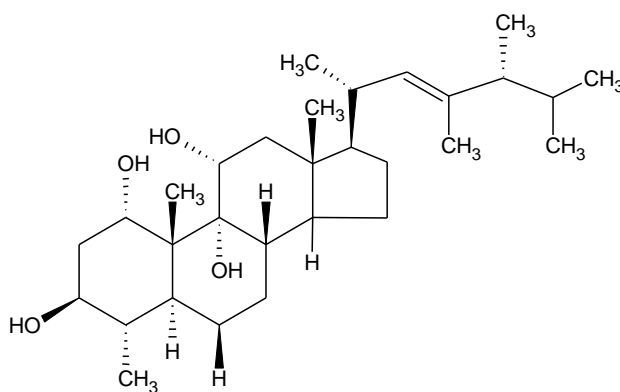
La muestra fue colectada en la estación marina La Parguera, Lajas, Puerto Rico, en diciembre de 1994. Luego de la extracción efectuada en 1996^[31], el extracto de hexano (302 g) fue pasado a través de una columna sílica gel por gravedad y eluida en sucesión con: (1) 100 por ciento hexano, (2) 2 por ciento acetona en hexano, (3) 5 por ciento acetona en hexano, (4) 10 por ciento acetona en hexano, (5) 20 por ciento acetona en hexano, (6) 30 por ciento acetona en hexano, (7) 50 por ciento acetona en hexano, (8) 100 por ciento acetona, (9) 30 por ciento

metanol en acetona y (10) 100 por ciento metanol. Se obtuvieron 10 fracciones, las cuales fueron sometidas a cromatografía en columna sílica gel y HPLC para purificar los metabolitos aislados.^[32]

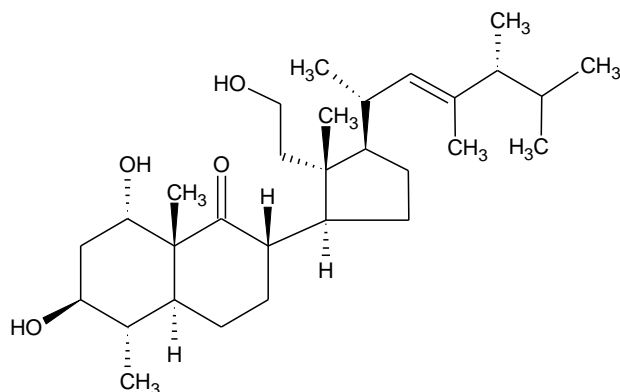
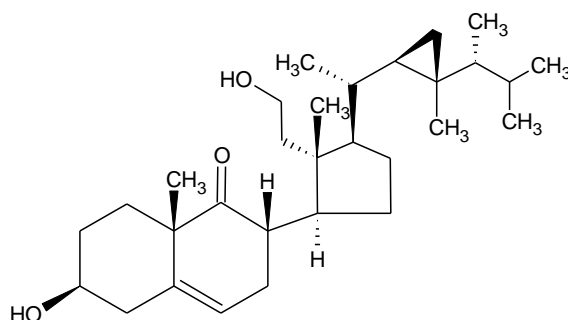
**(12)****(13)****(14)****(15)****(16)****(17)**

En el año 1998, Abimael D. Rodríguez y col. Reportaron la separación y la determinación de la estructura de dos nuevos esteroides polihidroxidinostano del extracto de hexano de la especie *Pseudopterogorgia americana*, designados: $1\alpha,9\alpha,11\alpha$ -trihidroxidinosterol **(18)**, 1α -hidroxi-9(11)-secodinosterol **(19)** y de un secogorgosterol conocido **(20)**.^[33]

La muestra fue colectada en La Parguera, Puerto Rico. Una vez liofilizada, se extrajo con una mezcla (1:1) cloroformo- metanol, dicho extracto fue sometido a partición entre agua y hexano. La fracción soluble en hexano fue sujeta a filtración flash en sílica gel (n-hexano, acetona, metanol), seguido de cromatografía en columna con sílica gel y HPLC en fase normal para obtener dos nuevos esteroides C_{30} polihidroxilados **(18)** (20,4 mg), **(19)** (15,3 mg) y un secogorgosterol conocido **(20)** (2,5 g).^[33]



(18)

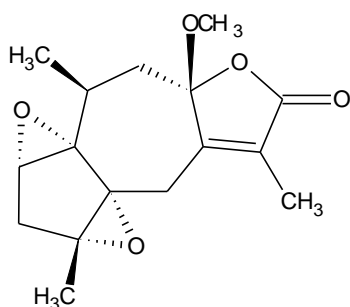
**(19)****(20)**

En el mismo año 1998, Abimael D. Rodríguez y col. Reportaron que durante el curso de su investigación de los compuestos biológicamente activos de la especie gorgoniana *Pseudopterogorgia americana*, encontraron con seis metabolitos altamente oxigenados pertenecientes a la clase guaianolida de lactonas sesquiterpénicas, en el extracto de hexano, reportando así la separación y la elucidación de las estructuras de estos nuevos compuestos. Las estructuras

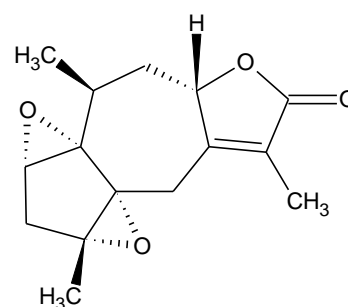
10-epimetoxiamericanolide	A	(21) ,	10-epiamericanolide	C	(22) ,
8-epimetoxiamericanolide	A	(23) ,	8-epiamericanolide	C	(24) ,

metoxiamericanolide H (**25**) y metoxiamericanolide I (**26**), fueron establecidas por técnicas espectroscópicas, principalmente EM y RMN.^[34]

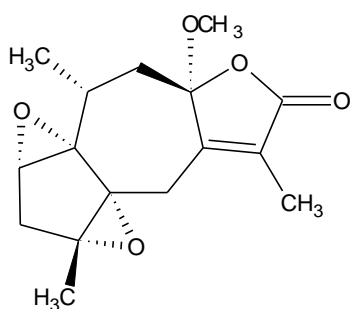
Esta muestra es la misma que trabajaron los autores en el año 1996, la cual fue colectada en La Parguera, Puerto Rico en Diciembre de 1994 ^[31], se realizó el tratamiento mostrado en la reseña de ese año y lo que se hizo después fue pasar las fracciones obtenidas a través de cromatografía columna y como técnica de purificación se usó HPLC.^[34]



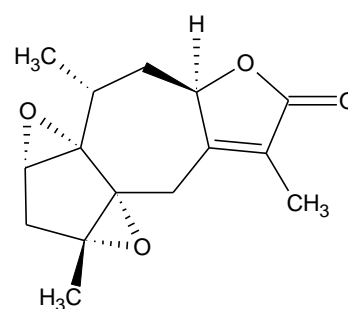
(21)



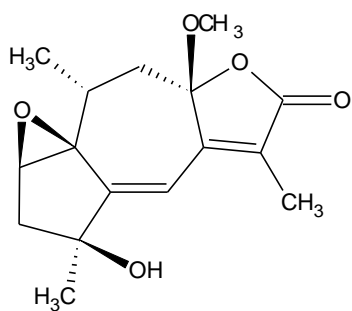
(22)



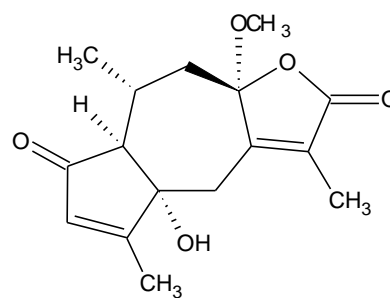
(23)



(24)

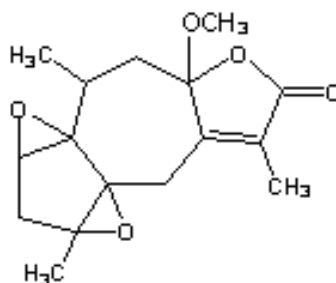


(25)



(26)

En el año 1998, Patricia L. Richardson y col. Lograron aislar un compuesto perteneciente a la familia de las lactonas sesquiterpénicas, su estructura comprende un esqueleto guaianolido incorporando dos grupos epóxido, una lactona y un grupo éter. Este compuesto, $C_{16}H_{20}O_5$, es la metoxiamericanolida B **(27)**.^[35]

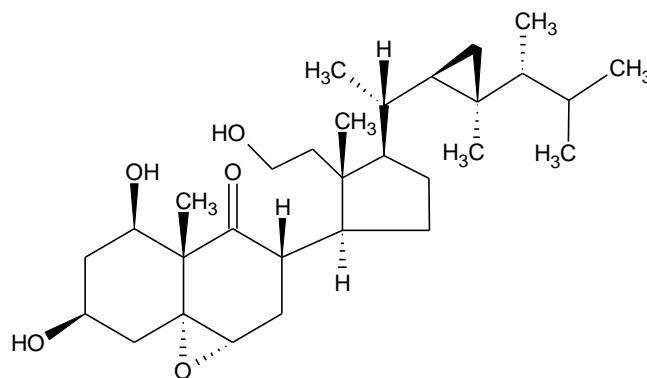


(27)

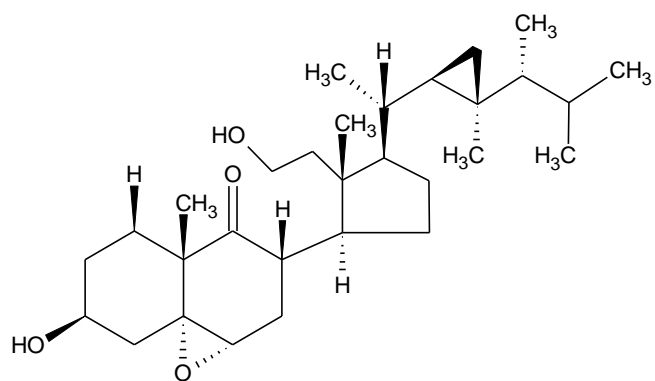
En el año 2000, Samina Naz y col. Aislaron dos nuevos 9(11)-secogorgosteroles con un anillo epóxido en las posiciones C-5/C-6, del extracto cloroformo-metanol de la especie *Pseudopterogorgia americana*, estos compuestos son 1 β ,3 β -di-hidroxi-5 α ,6 α -epoxy-9-oxo-9,11-secogorgostano-11-ol **(28)**, 3 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxy-9-oxo-9,11-secogorgostano-11-ol **(29)** y el conocido 3 β -hidroxi-9-oxo-9,11-secogorgostano-11-ol **(30)**.^[36]

La muestra seca (88,9 g) del octocoral fue extraída en metanol, para dar un extracto crudo de (26,8 g), el cual fue fraccionado por partición de solvente entre agua y cloroformo: metanol (2:1). La fracción orgánica fue sometida a cromatografía por columna y HPLC en fase reversa para obtener los dos nuevos secosteroides con un patrón de oxigenación inusual. **(28)** (4,2 mg) y **(29)** (3,6 mg), junto con el metabolito conocido **(30)** (5,1 mg).^[36]

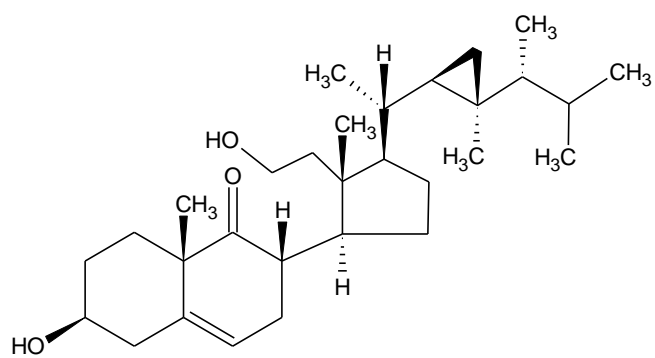
Las estructuras fueron elucidadas empleando estudios espectroscópicos detallados y se encontró que el compuesto **(28)** exhibió actividad contra líneas celulares de cáncer de próstata (LnCap) y en líneas celulares de cáncer de pulmón (Calu-3), con valores observados de IC_{50} de 15,49 $\mu\text{g/mL}$ y 11,10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El compuesto **(29)** también mostró bioactividad similar contra las líneas celulares mencionadas anteriormente, con valores observados de IC_{50} de 18,43 $\mu\text{g/mL}$ y 12,00 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, el compuesto **(30)** exhibió valores de IC_{50} de 41,00 $\mu\text{g/mL}$ y 38,12 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente^[36]



(28)



(29)



(30)

I. 5. JUSTIFICACIÓN.

Con base en la revisión bibliográfica de los antecedentes sobre la especie *Pseudopterogorgia americana*, se puede afirmar que la especie objeto de estudio ha sido colectada en países como Estados Unidos, Belice, Trinidad y Tobago y Puerto Rico, notándose que no ha sido objeto de estudio en Venezuela, aún y cuando en el país se cuenta con una gran variedad de arrecifes de coral a lo largo de sus costas.

Al ser esta especie parte de los invertebrados marinos del phylum Cnidaria, no cuenta con extremidades o medios de defensa físicos o que involucren la fuerza, es un organismo sésil. Por ello, y con el fin de sobrevivir a las condiciones del ecosistema marino en el que habita, muchos científicos manejan la teoría que la “defensa química” se basa en la biosíntesis de componentes que sean dañinos para sus depredadores y en algunas ocasiones le sirvan como mecanismo de ataque para proveerse de alimento.

Dado que estos animales son poco desarrollados, obtienen sus nutrientes del medio que los rodea, por lo que la ubicación de la especie afecta la biosíntesis de los metabolitos secundarios, puesto que, según el sitio donde se colecte se va o no a contar con la presencia de algunos compuestos específicos de ese medio. De esta manera, resulta importante realizar el estudio químico de la especie *Pseudopterogorgia americana*, de especímenes colectados en costas Venezolanas, para identificar los principales componentes presentes en la misma.

CAPITULO II.

II.1. OBJETIVOS.

II.1.1. Objetivo General.

Realizar un estudio sistemático de los metabolitos secundarios principales presentes en el octocoral *Pseudopterogorgia americana*.

II.1.2. Objetivos Específicos.

- Preparar el crudo metanólico de la especie *Pseudopterogorgia americana*.
- Preparar los extractos de hexano, diclorometano y sec-butanol a partir del material soluble en metanol.
- Realizar la evaluación de la actividad biológica del crudo metanólico y de los extractos obtenidos de este coral blando.
- Analizar la composición química de los extractos y realizar su separación mediante técnicas de cromatografía.
- Realizar la identificación estructural de los componentes que sean aislados a través de las técnicas Espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.
- Realizar la evaluación de la actividad biológica de algunos de los metabolitos que se obtengan a partir del coral blando.

II.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

II.2.1. Reactivos del laboratorio.

- Ácido sulfúrico. H_2SO_4 .
- Agua destilada. H_2O .
- Cloroformo. CHCl_3 .
- Diclorometano. CH_2Cl_2 .
- Etanol. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$.
- Hexano. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$.
- Metanol. CH_3OH .
- p-anisaldehído.
- Sec-butanol. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$.
- Sílica gel marca Riedel-De Hain Seelze-Hannover de (0,2-0,5) mm
- Sulfato de sodio. Na_2SO_4 .

II.2.2. Agentes reveladores.

- Solución de p-anisaldehído en ácido sulfúrico: 0,5 mL de p-anisaldehído es mezclado con 10 mL de ácido acético glacial, luego se añade 85 mL de Metanol y para finalizar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Rociar y calentar a 80 °C, para ácidos grasos y terpenos se observa una coloración morado-azul, para compuestos nitrogenados se observa una coloración marrón.
- Lámpara UV.

II.2.3. Materiales y Equipos.

- Rotavapor T.W.T. Heidolph Laborata 4000 modelo: 04980063. (UCV).
- Ultrasonido Sonicor. Modelo: SC-300TH. (UCV).
- Lámpara UV a dos longitudes de onda, λ : 254 y 366 nm. MINERALIGHT, modelo UVGL-25. (UCV).
- Columnas de cromatografía. (UCV).
- Placas de vidrio y alugram Sil G/UV₂₅₄ para cromatografía de capa fina. (UCV).
- Equipo de RMN JEOL, modelo Eclipse 270: campo de aplicación 270 MHz para protones y 67,5 MHz para carbono 13. (UCV).
- Equipo de RMN VARIAN, campo de aplicación 500 MHz para protones y 125 MHz para carbono 13. (FAU).
- Espectrómetro de masas Finnigan, modelo LCQ DUO. (IVIC).

II.2.4. Colección del coral blando.

El ejemplar de la especie *Pseudopterogorgia americana* se colectó en el Parque Nacional Morrocoy, ubicado en el Estado Falcón, Venezuela, en el año 2007.

Dicho ejemplar se codificó en el Laboratorio de Química del Mar, con el serial 07004TPE, fue identificado a nivel de especie por la Prof. Sheila Márquez Pauls, de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

II.2.5. Extracción y separación.

A continuación se describe el tratamiento químico realizado al octocoral, una vez fuera de su hábitat natural, así como también la metodología empleada en la obtención del crudo metanólico.

Una vez colectado el ejemplar del coral, se sumergió en una mezcla metanol-agua de mar (1:1) (esquema 1), esta mezcla se descartó después de ocho horas, este procedimiento evita la descomposición de las células del animal y permite el traslado del organismo al laboratorio. En el laboratorio, el coral húmedo (113,7834 g. Tabla 1) se congeló y se liofilizó (97,3428 g. Tabla 1).

Tabla 1. Masa del coral húmedo y del coral seco.

Muestra	(Masa \pm 0,0001) g
Coral húmedo	113,7834
Coral seco	97,3428

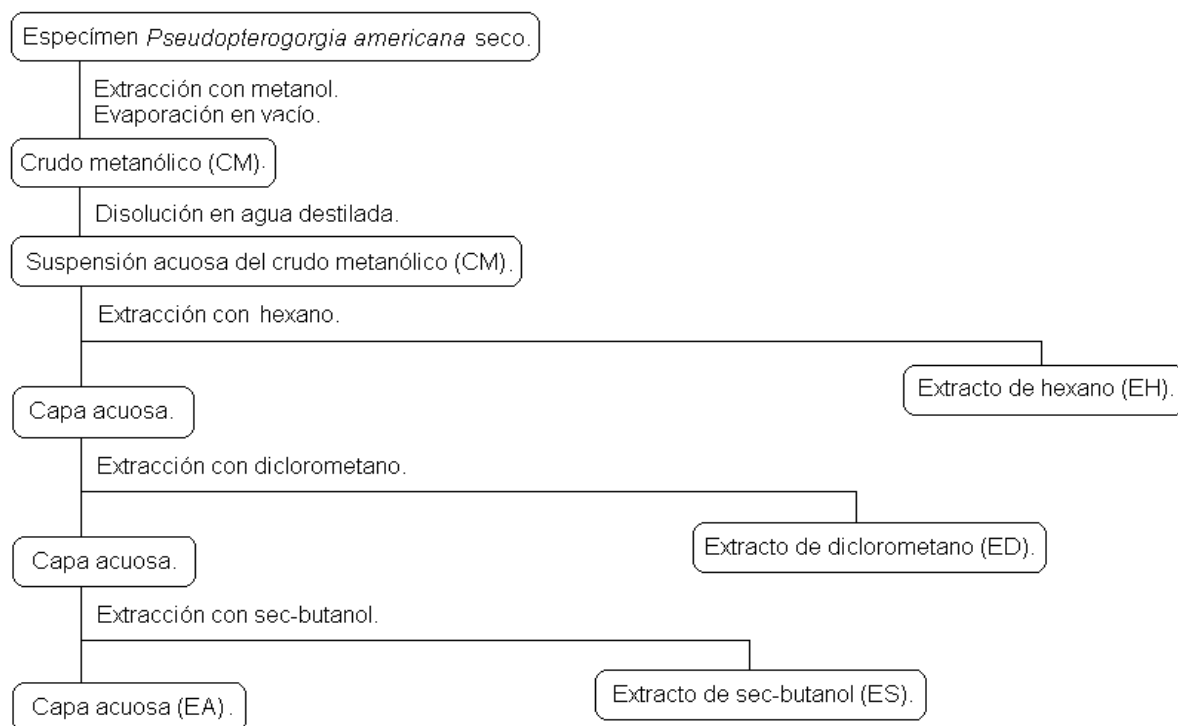
Posteriormente el coral se sumergió en metanol durante un período de 24 horas, este procedimiento se realizó tres veces para obtener la mayor cantidad de material orgánico presente en el coral. Posteriormente, se unieron las tres porciones de los lavados con metanol, obteniendo así el crudo metanólico, esta solución se evaporó en vacío hasta sequedad para obtener el crudo metanólico seco CM (13,3066 g. Tabla 2), dicho crudo metanólico se utilizó como material de partida para realizar la separación que se muestra en el esquema 1.

CM se disolvió en 200 mL de agua destilada y se extrajo con porciones de 50 mL de hexano, teniendo como resultado una fase acuosa y una fase orgánica correspondiente al extracto de hexano EH (6,2459 g. Tabla 2). La fase acuosa remanente del proceso anterior se extrajo con porciones de 50 mL de diclorometano, teniendo como resultado la fase acuosa y una fase orgánica que en este caso se rotuló como el extracto de diclorometano ED (1,3680 g. Tabla 2). La fase acuosa remanente de la extracción anterior con diclorometano se extrajo con porciones de 50 mL de sec-butanol, obteniendo esta vez una fase acuosa correspondiente al extracto acuoso EA (3,2775 g. Tabla 2) y una fase orgánica que se rotuló como extracto de sec-butanol ES (0,6737 g. Tabla 2). Cada uno de los extractos obtenidos EH, ED y ES se secaron con sulfato de sodio y se evaporaron en vacío hasta sequedad, EA se secó por evaporación del agua que contenía.

Tabla 2. Masa del crudo metanólico y de los extractos obtenidos a partir del mismo.

Muestra	(Masa \pm 0,0001) g	(Porcentaje de la muestra respecto a la masa del coral seco \pm 0,1) %
Crudo metanólico CM	13,3066	13,7
Extracto de hexano EH	6,2459	6,4
Extracto de diclorometano ED	1,3680	1,4

Extracto de sec-butanol ES	0,6737	0,7
Extracto acuoso EA	3,2775	3,4



Esquema 1. Separación del crudo metanólico CM del espécimen *Pseudopterogorgia americana*.

II.2.6. Metodología empleada para los ensayos de actividad biológica.

II.2.6.1. Metodología empleada para el ensayo de mortalidad de *Artemia salina*.

En grandes dosis los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos. Por ello, la mortalidad *in vivo*, de un organismo simple de la escala zoológica (por ejemplo: *Artemia salina*), puede ser usada como un indicador de toxicidad en el estudio de productos naturales.^[19]

Se colocó una pequeña cantidad de huevos de *Artemia salina* en agua de mar fresca, éstos se mantuvieron durante 48 horas bajo luz blanca fluorescente, el recipiente se tapó con papel parafilm y se mantuvo una corriente de oxígeno en el agua con el uso de un motor de pecera.

La metodología que se utilizó para realizar el ensayo de mortalidad de *Artemia salina* fue la reportada por Meyer y col. ^[37], la cual consistió en evaluar por triplicado a concentraciones de 1000 ppm en extractos crudos sin tratamiento y de 1, 10, 100 y 1000 ppm en compuestos puros, como se muestra a continuación:

Solución A: 20 mg de compuesto en 2 mL de solvente.

Solución 1000 ppm: 500 μ L de la solución A.

Solución 100 ppm: 50 μ L de la solución A.

Solución 10 ppm: 5 μ L de la solución A.

Solución 1 ppm: 0, 5 μ L de la solución A.

Luego de evaporarse cada una de las alícuotas, se agregó en cada vial 5 mL de agua de mar y 10 nauplios. Se preparó un blanco positivo (agregando 5 mL de etanol en tres viales) y un blanco negativo (agregando 5 mL de agua de mar en tres viales), a los mismos se le agregó 10 nauplios. Los individuos muertos se contaron después de 24 horas. Estos datos se procesaron determinándose los resultados de mortalidad en cada caso, es decir, el porcentaje de mortalidad promedio para cada concentración en cada ensayo.

II.2.6.2. Metodología empleada para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.

Este ensayo fue realizado por la Lic. Sandra Duque en el Laboratorio de Bioensayos José María Benitez, ubicado en el tercer piso de la Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Se utilizaron las bacterias: *Escherichia coli* (CVCM28), *Klebsiella pneumoniae* (CVCM375) (bacterias gram negativas) y *Bacillus subtilis* (CVCM438), *Staphylococcus aureus* (CVCM691), (bacterias gram positivas). Las cuales se adquirieron en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Las bacterias se mantuvieron en un medio líquido, Tryptone Soya Broth (TSB. HiMedia) y en tubos inclinados con un medio sólido de agar, Tryptone Soya Agar (TSA. HiMedia).

El estudio de la susceptibilidad bacteriana de CM, los extractos EH, ED, ES y EA y los compuestos puros aislados, se realizó siguiendo el método de difusión en discos de papel. Para ello se pesó una cantidad de muestra y se disolvió en una cantidad apropiada de DMSO al 50 por ciento en agua. Obteniéndose así las soluciones madres, de las cuales se prepararon las disoluciones correspondientes a cada una de las concentraciones a evaluar, las cuales fueron de (10-1000) µg/mL, (1500-2000) µg/mL.

El medio que se utilizó para los ensayos de susceptibilidad bacteriana fue agar Mueller-Hinton (HiMedia), el cual se esterilizó en un autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos, después de su esterilización se dejó enfriar hasta 55 °C y se procedió a servir las cápsulas de petri debidamente rotuladas. Todos los ensayos se realizaron con discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro

impregnados con las soluciones de los extractos obtenidos a las diferentes concentraciones. En cada disco se colocaron 25 µL de la fracción, posteriormente los discos se colocaron en las cápsulas previamente sembradas con las diferentes especies bacterianas de forma estéril, para evitar cualquier tipo de contaminación. Para obtener la suspensión de las especies bacterianas, se prepararon fiolas de 25 mL previamente rotuladas en las cuales se colocaron 10 mL de medio TSB (previamente esterilizado en un autoclave). Posteriormente se sembró cada fiola con un asa del correspondiente microorganismo, luego se llevaron a una estufa para incubarse a 37 °C durante 24 horas. Al siguiente día se procedió a diluir las suspensiones de los microorganismos con solución salina a 0,85 por ciento estéril, para obtener la densidad de la población ajustada aproximadamente a 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC/mL) Patron de Mc Farland. Las cápsulas se colocaron por 30 minutos en una cámara fría para facilitar la difusión de los extractos. Posteriormente se incubaron en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Después de este tiempo se midieron las zonas o halos de inhibición producidos alrededor de los discos.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron al doble para cada extracto. En cuanto al control, los análisis se realizaron también por triplicado.

Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano:

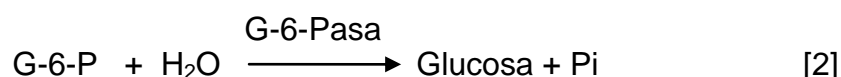
$$\% \text{Inhibicion} = \frac{\bar{X} \text{ diametro halos de inhibicion de la muestra}}{\bar{X} \text{ diametro halos de inhibicion del control}} \times 100 \quad [1]$$

\bar{X} = La media de todos los valores de los diámetros de inhibición obtenidos a las concentraciones estudiadas. Tanto para la muestra como para el control.

II.2.6.3. Metodología empleada para el ensayo de inhibición de la enzima Glucosa-6-fosfatasa.

Este ensayo fue realizado por la Lic. Sandra Duque y dirigido por el Dr. Freddy González-Mujica, en el Laboratorio de Bioquímica, Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

La enzima Glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) cataliza el paso final de los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis, produciendo glucosa y fosfato inorgánico; la reacción se puede medir mediante la desaparición del sustrato (Glucosa-6-fosfato) o la aparición de los productos (Glucosa o Pi).

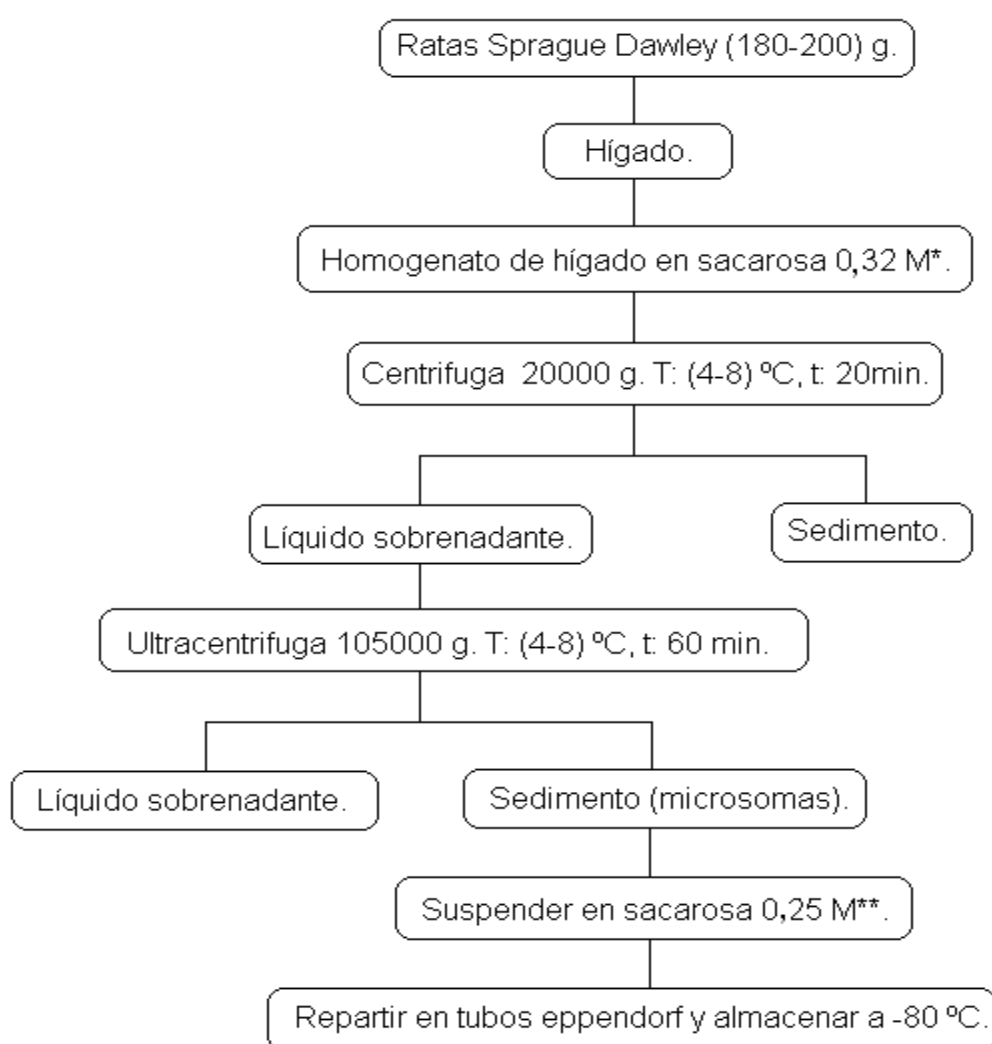


La actividad de la G-6-Pasa se determinó siguiendo la formación de fosfato inorgánico (Pi), que en medio ácido y en presencia de heptamolibdato de amonio forma un complejo azul, cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de 820 nm. La ventaja del uso de este método es que, además de ser económico y rápido, el reactivo que se usa para formar el complejo también detiene la reacción.

Para diferenciar si el inhibidor actúa sobre el transportador T1 o directamente sobre la subunidad catalítica, se utilizaron microsomas intactos y microsomas rotos; los primeros son vesículas en las cuales la membrana limitante actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, mientras que los segundos carecen de dicha selectividad y el sustrato tiene libre acceso a la subunidad catalítica. Los microsomas rotos se obtuvieron mediante la incorporación de histonas durante el ensayo.

II.2.6.3.1. Preparación de microsomas.

Para la preparación de los microsomas, fuente de la enzima, se siguió el procedimiento descrito por Marcucci y col.^[38], que se detalla en el esquema 2.



*Sacarosa 0,32 M; MgCl_2 3 mM.

**Sacarosa 0,25 M; HEPES 5 mM; MgCl_2 1 mM pH 6,5.

Esquema 2. Procedimiento para la obtención de Microsomas.

II.2.6.3.2. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa.

Se utilizó como sustrato Glucosa-6-fosfato (G-6-P) 5 mM, tanto con histonas (+H) como sin histonas (-H); en la tabla 3, se presenta la cantidad de los reactivos necesarios para su preparación.

Tabla 3. Preparación de los sustratos.

Sustrato	G-6-P 100mM (μ L) pH 6,5	EDTA 0,1M (μ L) pH 6,5	HEPES 1M (μ L) pH 6,5	H ₂ O (μ L)	Histonas (tipo II AS) (μ L)	V _t (mL)
-H	250	100	80	1570	-	2
+H	250	100	80	1370	200	2

Para determinar la actividad de los extractos y compuestos purificados sobre la enzima G-6-Pasa se empleó la metodología descrita por Burchell y col.^[16], que se describe en el esquema 3:

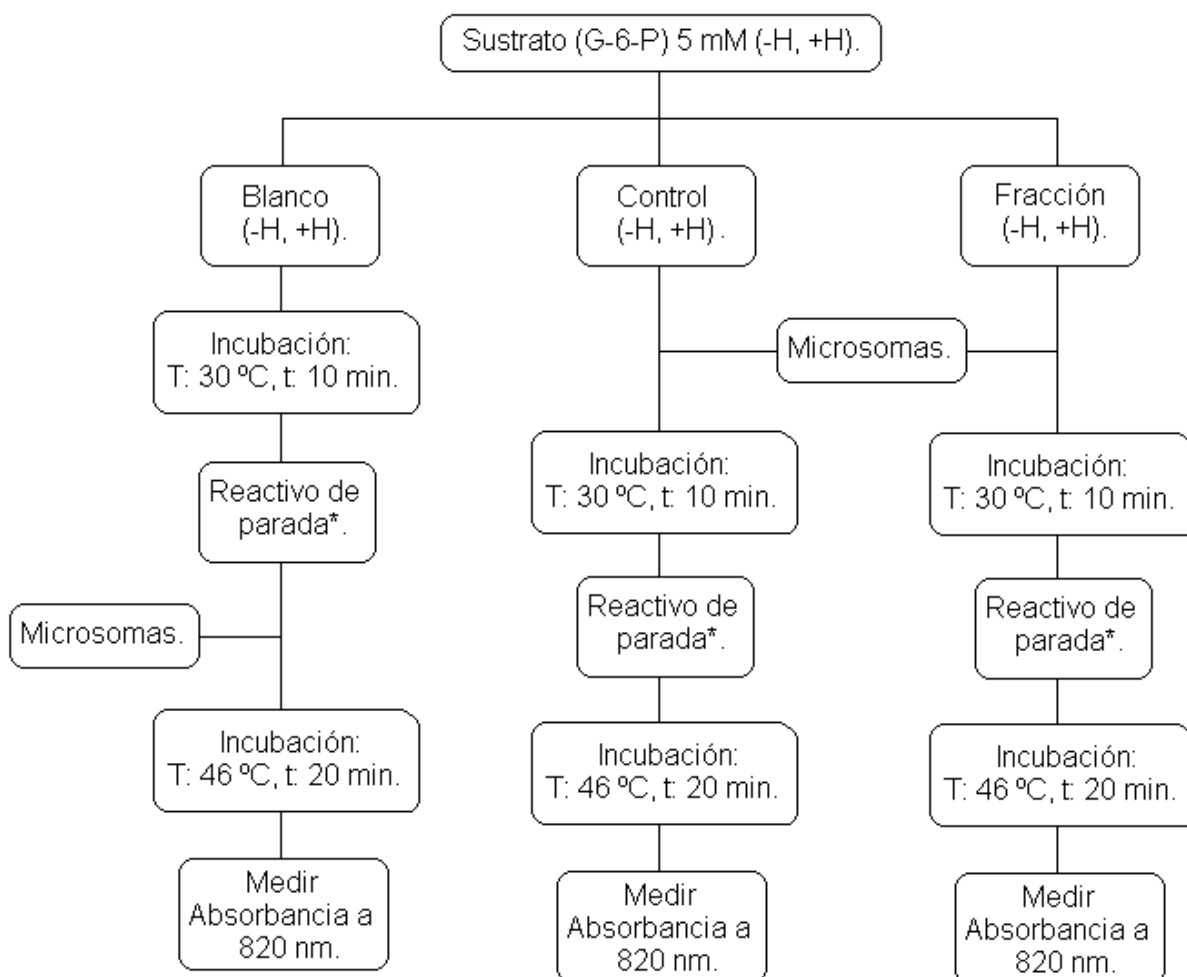
A continuación se resume brevemente la metodología a seguir para el ensayo:

- Utilizar cuatro tubos de ensayo para cada compuesto a probar (blanco y triplicados), tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H).
- Para los ensayos *Control* colocar en cada tubo 40 μ L de sustrato más 40 μ L de agua (o del solvente en que fue disuelto el compuesto a probar). Para los ensayos con la fracción o el compuesto a analizar, se añade 40 μ L de la

solución problema o del compuesto problema a la concentración deseada en lugar de agua.

- Diluir los microsomas hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL, en sacarosa 0,25 M; 5 mM HEPES y 1 mM de MgCl_2 (pH = 6,5).
- Colocar los tubos en un baño de temperatura controlada a 30°C.
- Colocar 20 μL de los microsomas a los triplicados e incubar por 10 min.
- Detener la reacción tubo por tubo y en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, añadiendo 0,9 mL del reactivo de parada, incluyendo a los blancos. Por último, añadir 20 μL de los microsomas a los blancos.
- Incubar por 20 min, en un baño de temperatura controlada a 46°C.
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 820 nm.
- La actividad enzimática se expresa en μmoles de Pi/ mg de proteína.

Para determinar la cantidad de fosfato liberado en la reacción se realiza una curva de calibración con un rango de concentración de 0,1 a 0,75 mM de Pi tomando alícuotas correspondientes de una solución madre de KH_2PO_4 1mM en un volumen final de 100 μL .



-H: sin histonas.

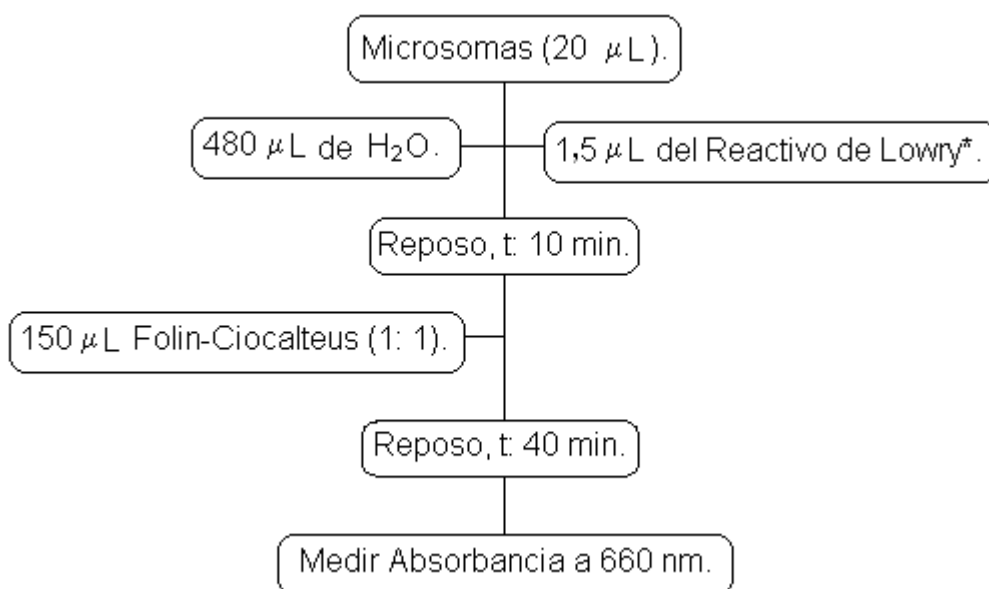
+H: con histonas.

*Reactivo de parada: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,42% en H_2SO_4 0,5M: SDS 5%: Ácido Ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1.

Esquema 3. Ensayo general de la enzima G-6-Pasa.

II.2.6.3.3. Determinación de proteínas.

La cantidad de proteínas se determinó siguiendo el procedimiento de Lowry y col.^[39] modificado por Markwell y col.^[40] que combina la reacción de Biruet basada en la reacción de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre en medio alcalino y la reducción de el reactivo de Folin-Ciocalteu por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, esta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína^[41]. Para determinar la concentración de proteínas presentes en cada ensayo se elaboró una curva de calibración con un rango de concentración entre 25 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en un volumen final de 500 μL . Este procedimiento se resume en el esquema 4.



*Reactivo de Lowry: A+B (100:1)

A= Na_2CO_3 2 %, NaOH 0,4 %, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 0,16 %, SDS 1 %.

B = $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 %.

Esquema 4. Procedimiento para la determinación de proteínas.

CAPITULO III.

III.1. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

III.1.1. Resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica.

A continuación se reportan los resultados que se obtuvieron de la aplicación de los ensayos de evaluación de la actividad biológica tanto de CM como de los extractos EH, ED, ES y EA.

III.1.1.1. Resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de *Artemia salina*.

Tabla 4. Resultados del ensayo de mortalidad de *Artemia salina*, aplicado al crudo metanólico y a los extractos EH, ED, ES y EA.

Muestra	Porcentaje de Mortalidad de la <i>Artemia salina</i> (%)
Crudo metanólico CM	67,6
Extracto de hexano EH	60,0
Extracto de diclorometano ED	48,8
Extracto de sec-butanol ES	21,7
Extracto acuoso EA	26,7
Blanco negativo (agua de mar)	3,3
Blanco positivo (etanol)	93,3

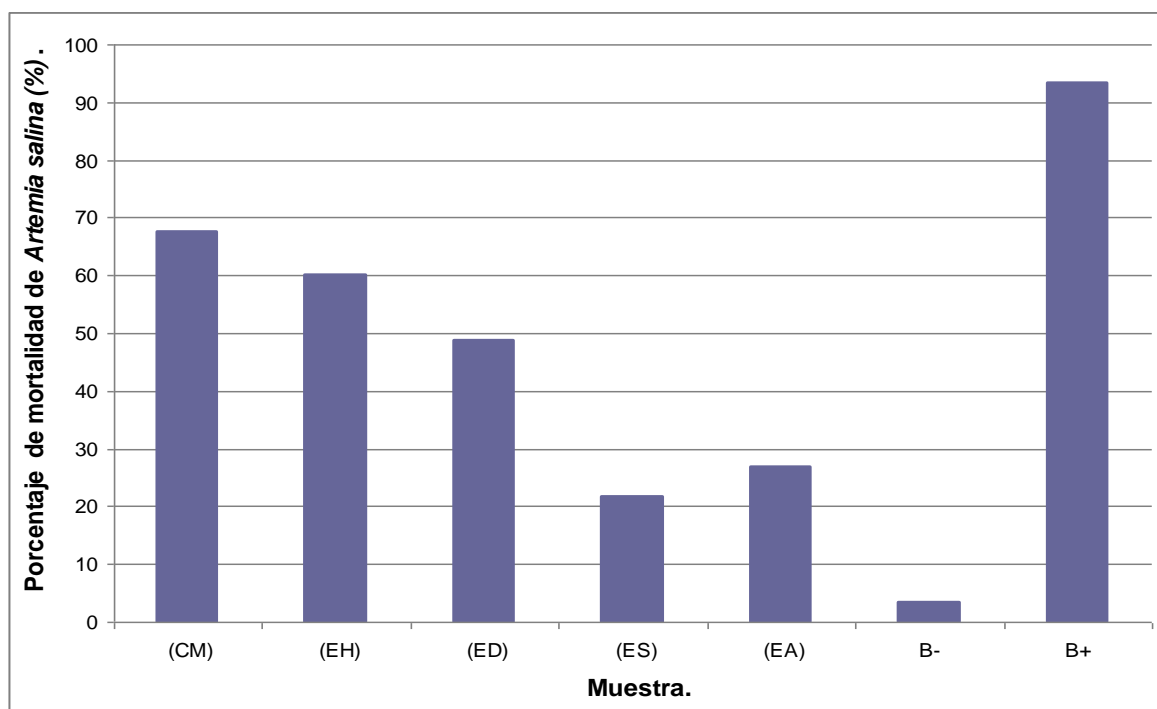


Figura 13. Gráfico del porcentaje de mortalidad de Artemia salina en función de la muestra para CM, EH, ED, ES y EA a una concentración de 1000 ppm.

III.1.1.2. Resultados obtenidos para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.

Las concentraciones preparadas de cada extracto fueron (10, 100, 500, 1000, 1500 y 2000) ppm.

En este ensayo no se observó la presencia de halos de inhibición para ninguna concentración, en ninguno de los extractos ensayados.

III.1.1.3. Resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa.

Tabla 5. Resultados del ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa, aplicado al crudo metanólico y a los extractos EH, ED, ES y EA.

Muestra	Porcentaje de inhibición sobre la enzima G- 6- Pasa (%)	
	- H	+ H
Crudo metanólico CM	50,00	95,50
Crudo metanólico CM <small>sin fostato</small>	25,00	27,30
Extracto de hexano EH	69,10	67,50
Extracto de diclorometano ED	23,41	56,69
Extracto de sec-butanol ES	59,33	60,50
Extracto acuoso EA	59,12	61,42

Se realizó un estudio por cromatografía de capa fina, de los componentes químicos presentes en el crudo metanólico y los extractos EH, ED, ES y EA, para ello se emplearon mezclas de solvente de hexano: diclorometano, hexano: cloroformo, diclorometano: metanol y cloroformo: metanol. De los cuales se obtuvo mejores condiciones de separación con mezclas de hexano: diclorometano y diclorometano: metanol y el extracto que mostró una mejor partición en estas mezclas fue el extracto de hexano, para el extracto de diclorometano no se logró obtener condiciones para una separación efectiva de sus componentes y para los extractos de sec-butanol y acuoso no se logró el arrastre de gran parte de la muestra sembrada, la mayor parte quedó retenida donde se sembró, todo esto bajo las condiciones empleadas en el laboratorio.

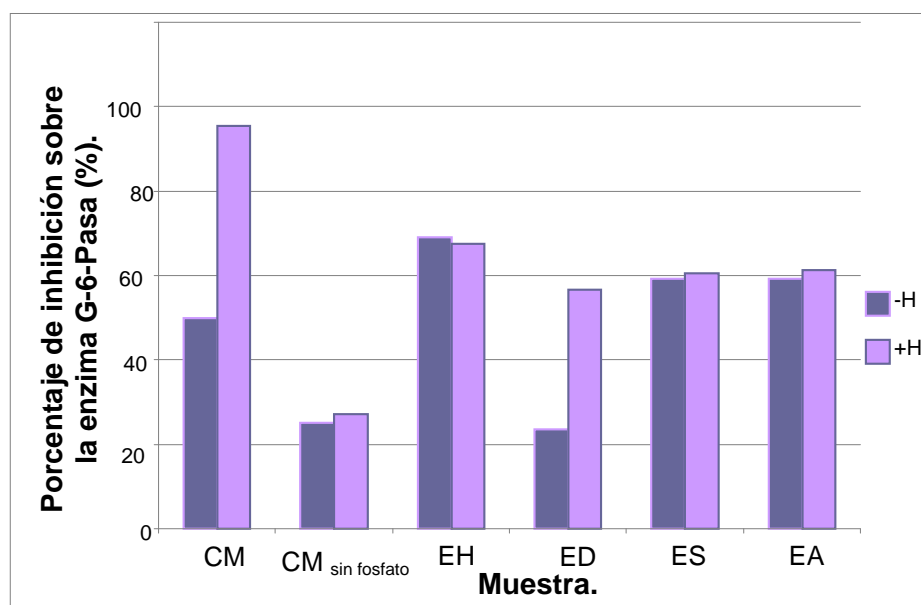


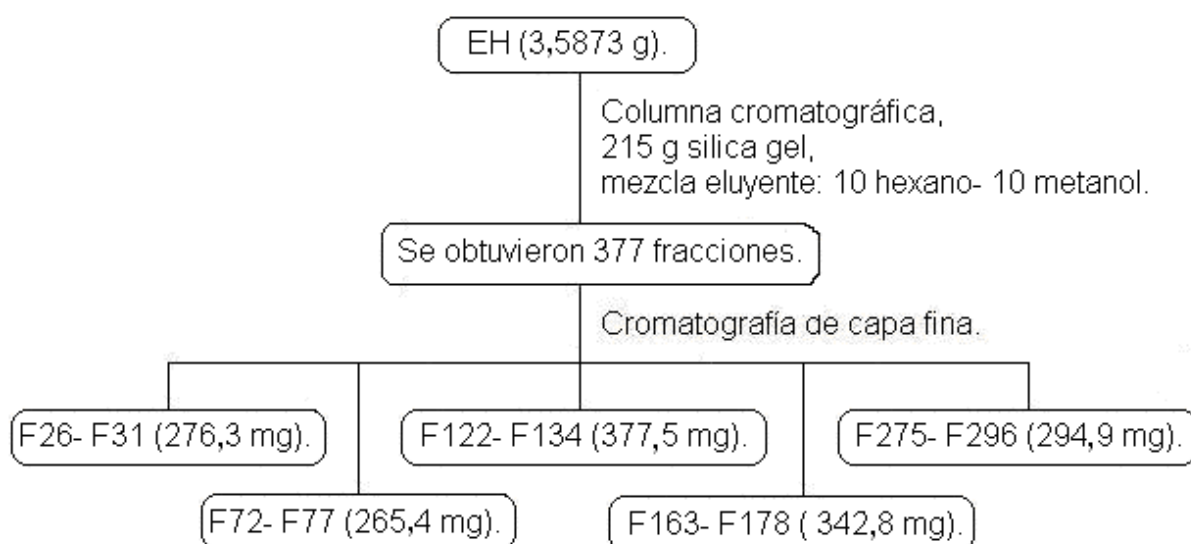
Figura 14. Gráfico del porcentaje de inhibición de CM, EH, ED, ES y EA sobre la enzima G-6-Pasa.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados como parte de la evaluación de la actividad biológica del coral *Pseudopterogorgia americana*, así como los resultados del estudio por cromatografía de capa fina y las cantidades obtenidas para cada extracto (Tabla 2), se escogió el extracto de hexano EH como el material a ser analizado y purificado en este Trabajo Especial de Grado, para lo cual se realizó la separación del mismo a través de técnicas de cromatografía. A continuación se muestran los resultados de la separación del extracto de hexano EH.

III.1.2. Separación y purificación de algunos de los compuestos presentes en el extracto de hexano EH.

Del extracto de hexano EH (6,2459 g. Tabla 2), se tomaron 3,5873 g y se sometieron a cromatografía de columna en fase normal con silica gel (215,2057 g),

el solvente que se empleó para montar la columna y sembrar la muestra fue hexano, posteriormente se aumentó la polaridad del solvente con mezclas de hexano-diclorometano y diclorometano-metanol (esquema 5).



Esquema 5. Procedimiento de separación del extracto de hexano EH.

Se recolectaron fracciones de 10 mL aproximadamente, en tubos de ensayo según se eluyó la columna, cada fracción se sometió a un estudio por cromatografía de capa fina, lo que permitió la unión de fracciones según la composición mostrada en las placas. Se obtuvo de esta manera la unión de las 337 fracciones en un grupo de 32, el balance de masas del material eluido de la columna se reporta en la tabla 6.

Tabla 6. Masas de las fracciones obtenidas a partir de la separación cromatográfica del extracto de hexano EH.

Muestra	(Masa \pm 0,1) mg
F1- F9	2,0
F10- F13	99,0
F14- F15	87,5
F16- F21	40,2
F22- F25	106,6
F26- F31	276,3
F32- F40	116,4
F41- F49	3,0
F50- F58	122,0
F59- F65	106,9
F66- F71	13,2
F72- F77	265,4
F78- F85	4,1
F86- F91	13,7
F92- F99	10,4
F100- F111	110,6
F112- F115	36,7
F116- F121	22,1
F122- F134	377,5
F135- F148	51,3
F149- F162	44,8
F163- F178	342,8
F179- F191	58,5
F192- F196	15,7

F197- F209	19,4
F210- F224	13,0
F225- F248	23,6
F249- F274	55,3
F275- F296	294,9
F297- F309	7,5
F310- F344	12,7
F345- F377	29,3

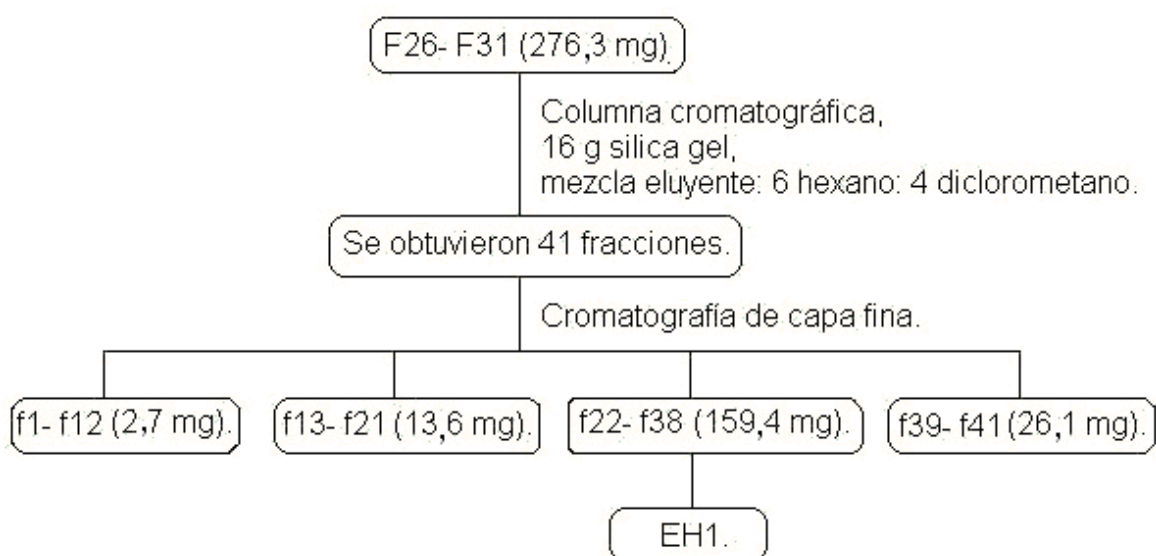
La fracción F26- F31, se sometió a cromatografía en columna para lograr la separación de mezclas simples de dos y hasta tres componentes que formaban parte de la misma, esto se observó en el estudio de cromatografía de capa fina que se realizó para unificar las fracciones que tuvieran los mismos componentes. La purificación se realizó como se muestra en el esquema 6.

Para la fracción F26- F31 (esquema 6), se tomaron 16 g de silica gel para montar la columna, se sembraron 276,3 g y se utilizó como eluyente, una mezcla 6 hexano: 4 diclorometano. Se encontró la fracción EH1, entre las subfracciones f22- f38, obteniéndose 159,4 mg de la misma, la unión de dichas subfracciones fue posible a través del estudio por cromatografía de capa fina de las fracciones eluidas de la columna. En la tabla 7, se resume el balance de masa del material eluido de la columna.

Tabla 7. Masas de las subfracciones obtenidas a partir de la purificación de la fracción F26- F31 del extracto de hexano EH.

Muestra	(Masa \pm 0,1) mg
f1- f12	2,7

f13- f21	13,6
f22- f38	159,4
f39- f41	26,1



Esquema 6. Procedimiento de purificación de la fracción F26- F31.

III.1.3. Resultados de los análisis espectroscópicos.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz) para EH1 en CDCl_3 .

$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm); mult; (J (Hz))	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm); mult
0,86; t; (6,18; 6,94)	14,20; s
1,24; pd; (11,85)	22,77; s
1,68; t; (6,67; 6,70)	25,11; s

1,99; d; (5,43)	26,02; s
2,27; t; (7,43; 7,67)	27,27; d
4,04; t; (6,70; 6,67)	28,73; s
5,67; m	(29,24- 29,77); m
	32,00; s
	34,49; s
	64,49; s
	129,94; d
	174,08; s

Tabla 9. Datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN-DEPT (400 MHz) para EH1 en CDCl_3 .

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), mult	DEPT
14,20; s	-CH ₃
22,77; s	-CH ₂ -
25,11; s	-CH ₂ -
26,02; s	-CH ₂ -
27,27; d	-CH ₂ -
28,73; s	-CH ₂ -
(29,24- 29,77); m	-CH ₂ -
32,00; s	-CH ₂ -
34,49; s	-CH ₂ -
64,49; s	-CH ₂ -
129,94; d	-CH-

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN-TOCSY (400 MHz) para EH1 en CDCl₃.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
0,86	1,24
1,24	0,86; 1,68; 1,99; 2,27; 4,04; 5,67
1,68	1,24; 1,99; 2,27; 4,04
1,99	1,24; 1,68; 5,67
2,27	1,24; 1,68
4,04	1,24; 1,68
5,67	1,24; 1,99

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN-HSQC (400 MHz) para EH1 en CDCl₃.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
0,86	14,20
1,24	32,00
1,68	34,49; (29,24- 29,77)
1,99	27,27 ; (29,24- 29,77)
2,27	34,49; (29,24- 29,77)
4,04	64,49
5,67	129,94

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN-HMBC (400 MHz) para EH1 en CDCl₃.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
0,86	22,77; 32,00
1,24	(29,24- 29,77)

1,68	26,02; 27,27; 28,73; (29,24- 29,77); 64,49; 174,08
1,99	(29,24- 29,77); 129,94
2,27	25,11; (29,24- 29,77); 174,08
4,04	26,02; (29,24- 29,77); 32,00; 174,08
5,67	27,27 (29,24- 29,77); 129,94

III.1.4. Resultados obtenidos para los ensayos de actividad biológica aplicados a la fracción EH1, del extracto de hexano EH.

III.1.4.1. Resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de *Artemia salina*.

Tabla 13. Resultados del ensayo de mortalidad de *Artemia salina* aplicado a la fracción EH1.

Muestra	Concentración (ppm)	Porcentaje de Mortalidad de la <i>Artemia salina</i> (%)
	Blanco (agua de mar)	0,0
	1	0,0
	10	0,0
EH1	100	11,8
	1000	46,4
	Blanco (agua de mar)	0,0

En la figura 15, se muestra la tendencia de los resultados del ensayo de mortalidad de *Artemia salina* dependiente de la concentración de la muestra. En ésta

se observa una tendencia creciente de la mortalidad de la *Artemia salina* con el aumento de la concentración de la fracción EH1.

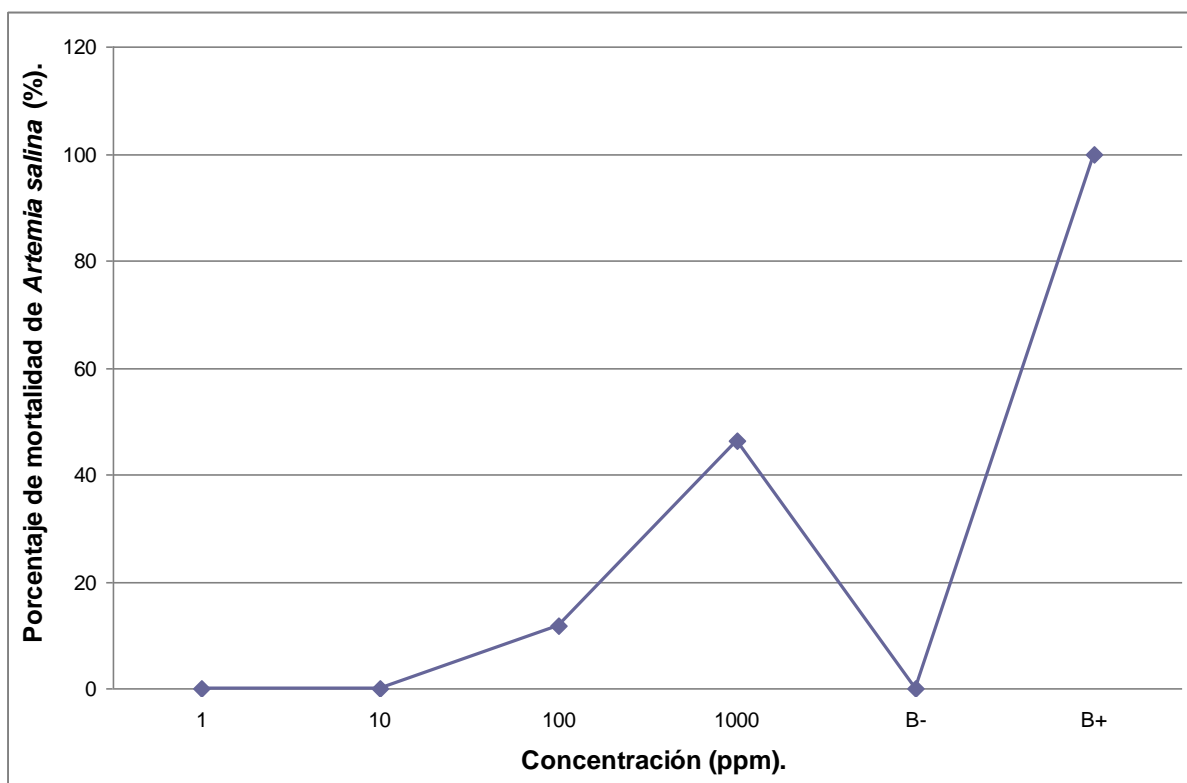


Figura 15. Gráfico del porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* en función de la concentración de EH1.

III.1.4.2. Resultados obtenidos para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.

Las concentraciones preparadas de cada extracto fueron (10, 100, 500, 1000, 1500 y 2000) ppm.

En este ensayo no se observó la presencia de halos de inhibición para ninguna concentración, en EH1. Lo que indica que en la fracción EH1 no se

encuentran componentes capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de las especies estudiadas.

III.1.4.3. Resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa.

Tabla 14. Resultados del ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa aplicado a la fracción EH1.

Muestra	nm Pi/h x mg proteína (nm/h x mg)		Latencia (%)	Porcentaje de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa (%)	
				- H	+ H
	- H	+ H		- H	+ H
EH1	0,014	0,19	92,6	65,0	13,6

CAPITULO IV.

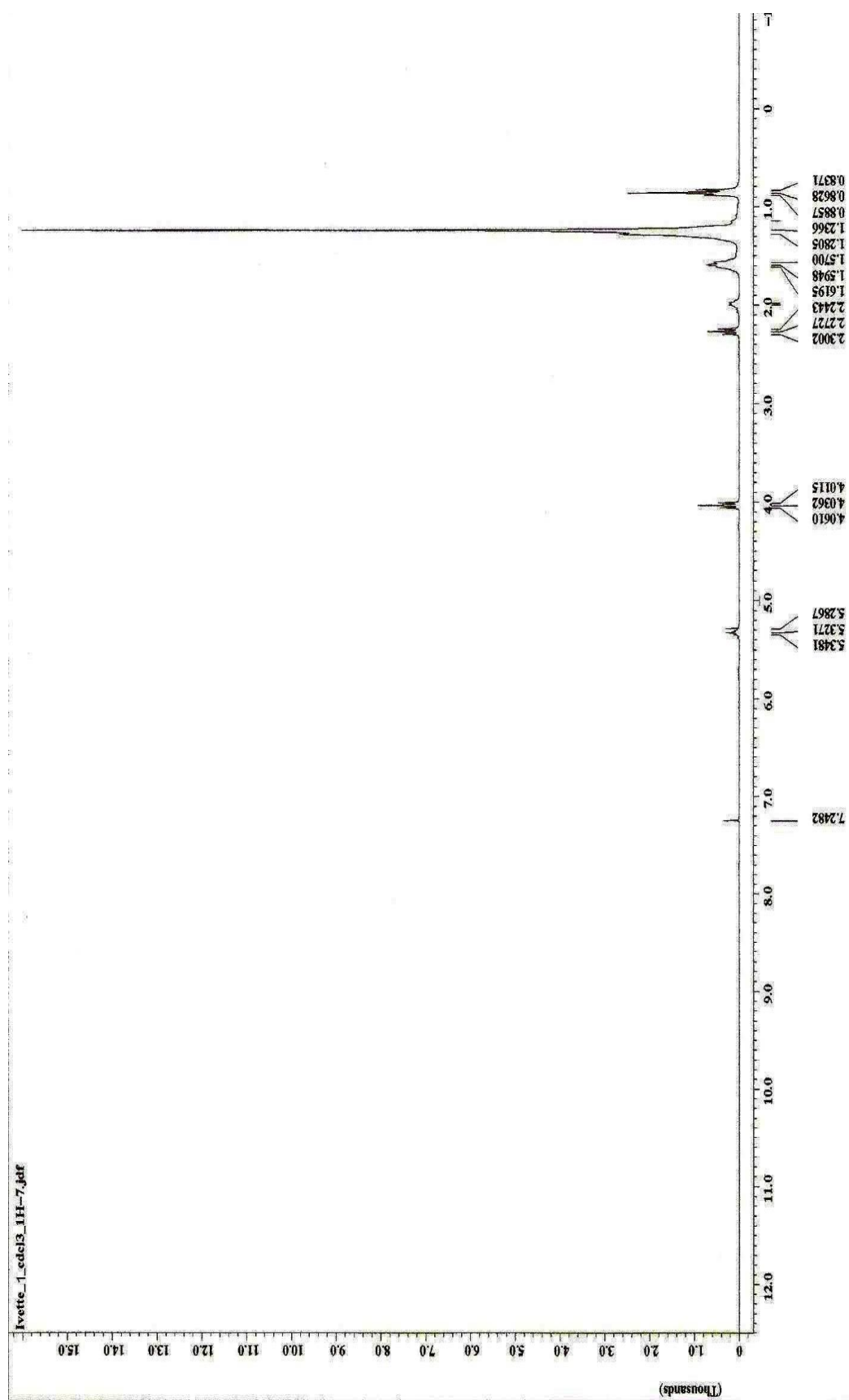
IV.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

IV.1.1. Discusión de resultados de los análisis espectroscópicos.

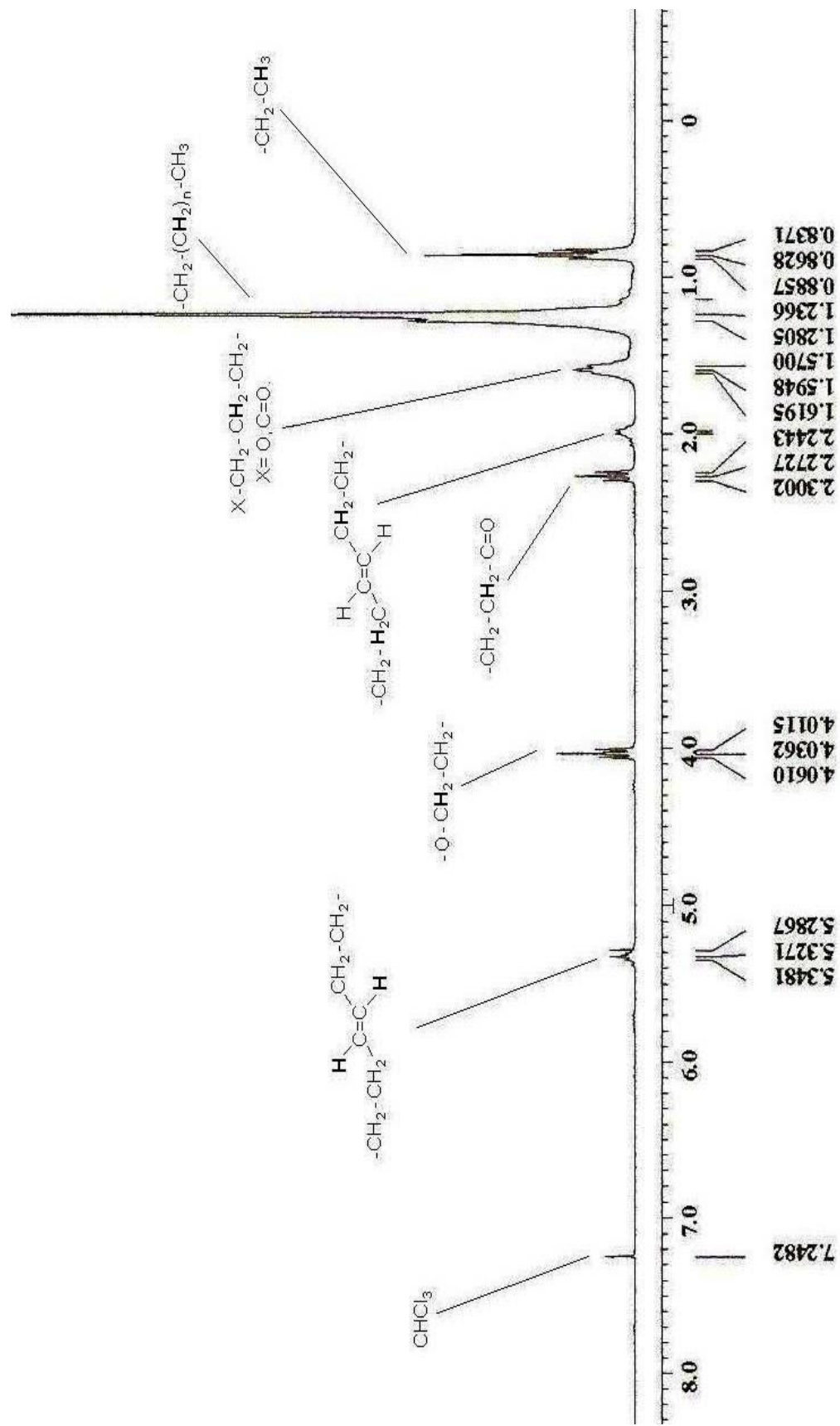
De la separación cromatográfica del extracto de hexano, se obtuvieron 159,4 mg de una fracción rotulada EH1. Esta fracción se aisló como un semisólido incoloro, soluble en diclorometano y cloroformo. EH1 se sometió a análisis de espectrometría de masas y a análisis espectroscópicos de RMN, los datos obtenidos de los espectros de protones y carbono así como los de los experimentos en dos dimensiones se reportaron en las tablas 8, 9, 10, 11 y 12.

Del espectro 1, de RMN- ^1H , se obtuvo la siguiente información:

Una señal a un desplazamiento químico (δ) de 0,86 ppm en forma de triplete correspondiente a protones metílicos, también se observa en un δ de 1,24 ppm una señal muy intensa que se puede asignar a protones metilénicos de cadenas carbonadas largas, luego se tiene una señal a un δ de 1,68 ppm en forma de triplete asignables a protones ubicados en una posición α a un carbono oxigenado y β con respecto a un grupo carbonilo, la señal que aparece a un δ de 1,99 ppm en forma de doblete se asocia a los protones de un carbono en posición α a una olefina, la señal que aparece a un δ de 2,27 ppm en forma de triplete posee un valor característico de protones metilénicos de un carbono enlazado a un grupo carbonilo, una señal a un δ de 4,04 ppm en forma de triplete correspondiente a los protones metilénicos adyacentes a un heteroátomo, y la señal ubicada a un δ de 5,67 ppm corresponde a los protones de una olefina. Las asignaciones de cada una de las señales mencionadas anteriormente aparecen en el espectro 2. (Las ampliaciones de RMN- ^1H aparecen en los espectros 3, 4, 5. Anexos).



Espectro 1. Espectro de RMN ^1H para EH1.

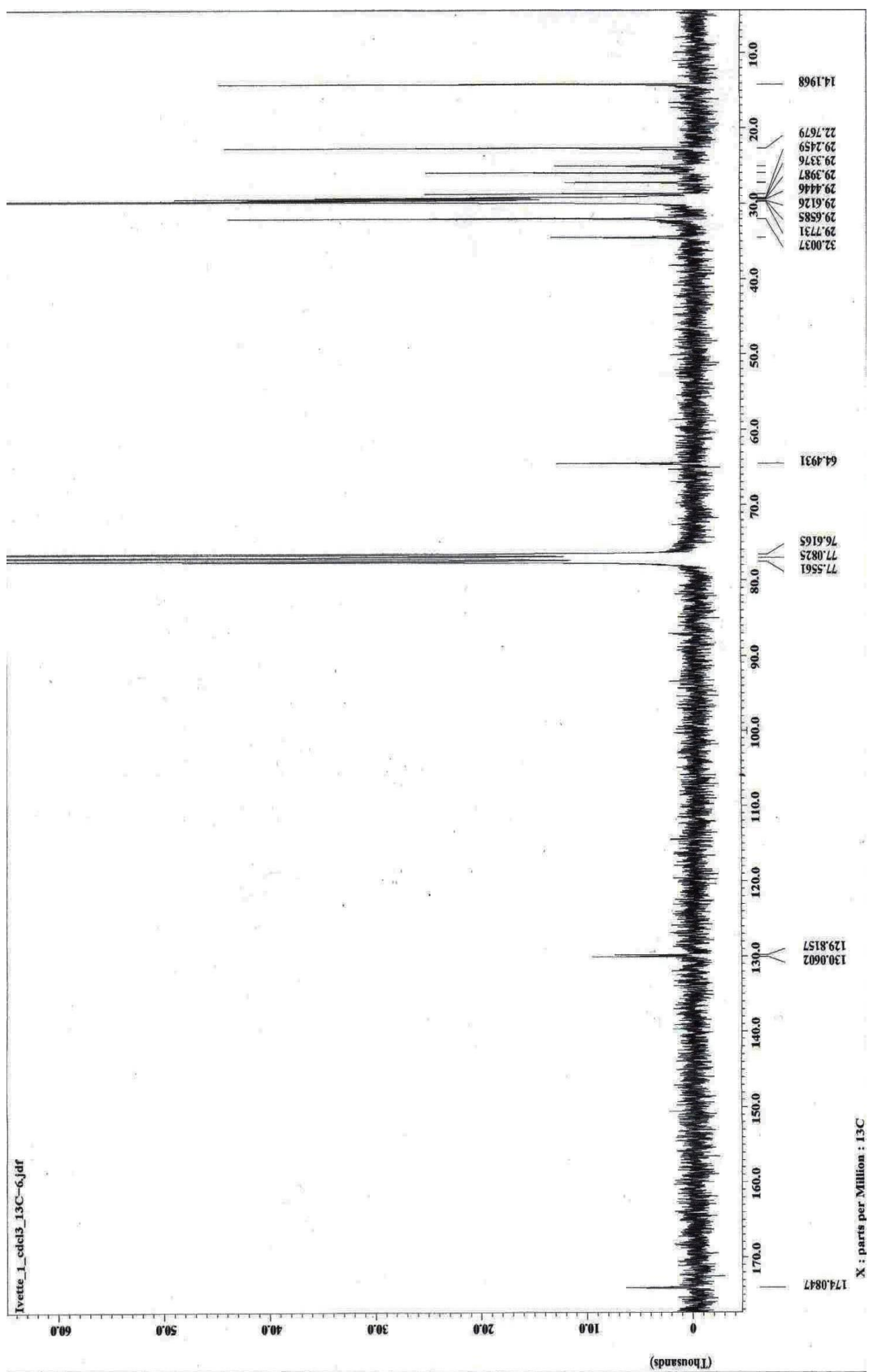


Espectro 2. Espectro de RMN ^1H para EH1. (Asignación de señales características).

Del espectro 6, de RMN- ^{13}C , se obtuvo la siguiente información:

Una señal a un desplazamiento químico (δ) de 14,20 ppm que se asocia a carbonos metílicos, otra señal a un δ de 22,77 ppm, que corresponde a carbonos metilénicos enlazados a un carbono metílico, luego se tiene un grupo de señales con unos valores de δ desde 25,11 ppm hasta 34,49 ppm asignables a carbonos metilénicos ubicados en distintos entornos químicos, desde carbonos en una posición α a un carbono oxigenado o β a un grupo carbonilo, carbonos en posición α al doble enlace de una olefina, carbonos enlazados a un grupo carbonilo y los carbonos conectados en una cadena saturada de longitud amplia (13, 14 o 15 átomos de carbono). La señal que aparece a un δ de 64,49 ppm se puede asignar a los carbonos metilénicos enlazados a un átomo de oxígeno, las señales alrededor de 130 ppm pertenecen a los carbonos involucrados en un enlace de una olefina y por último la señal que aparece a un δ de 174,08 ppm se asocia a un carbono de un grupo carbonilo. Las asignaciones de cada una de las señales mencionadas anteriormente aparecen en el espectro 7. (La ampliación de RMN- ^{13}C aparece en el espectro 8. Anexos).

Con base en el espectro 9, de RMN DEPT-135, se confirman las señales pertenecientes a carbonos metílicos, metilénicos y metínicos presentes en EH1, la señal que aparece en $\delta = 14,20$ ppm es la única señal asociada a carbonos metílicos, las señales que aparecen desde $\delta = 22,77$ ppm hasta $\delta = 64,49$ ppm son las asociadas a carbonos metilénicos y la señal que aparece en $\delta = 129,9$ ppm es la única señal asociada a carbonos metínicos. (La ampliación de RMN DEPT-135 aparece en el espectro 10. Anexos).



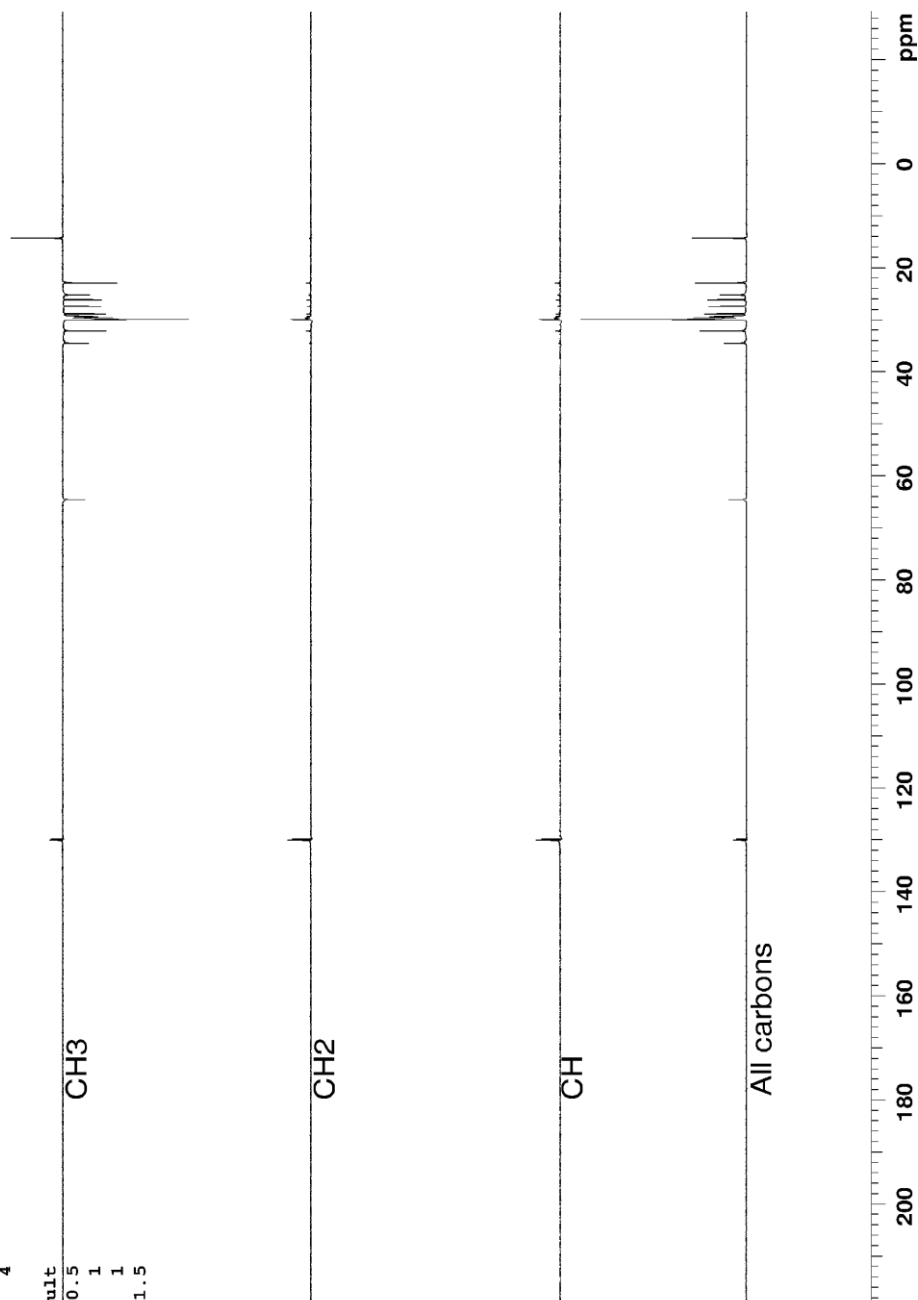
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C para EH1.

IPG_07004_CDCl3_25C_DEPT_400MHz

Pulse Sequence: DEPT

exp23 DEPT

DEPT	140.0	ACQUISITION ARRAYS
j1xh	array	mult
mult	arrayed	arraydim
SPECIAL	not used	i
temp	32	1
gain	20	2
spin	1	3
PROCESSING	1.00	4
lb	not used	mult
fn	not used	0.5
SPECTRUM		1
wp	24999.2	1.5
sp	-2955.7	
rp	-766.4	
lp	-418.6	
ai	no ph	
REFERENCE		
rfl	2956.5	
rfp	0	
PLOT		
wc	69	
sc	0	
vs	125	
hzm	363.63	
th	20	



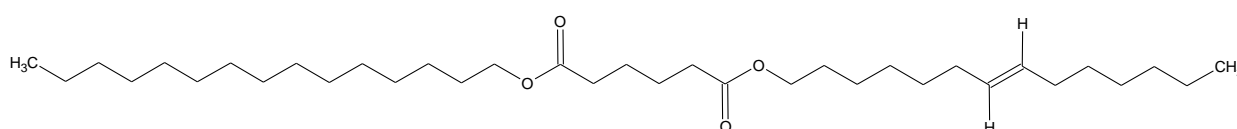
Espectro 9. Espectro DEPT de RMN ^{13}C para EH1.

El espectro 11, de masas LRMS ESI (+) para EH1, tomado en cloroformo, muestra dos picos, uno correspondiente a m/z 550 y otro a m/z 522, estos valores proporcionan los pesos moleculares de los componentes mayoritarios de EH1, y la diferencia entre ellos es de 28 uma.

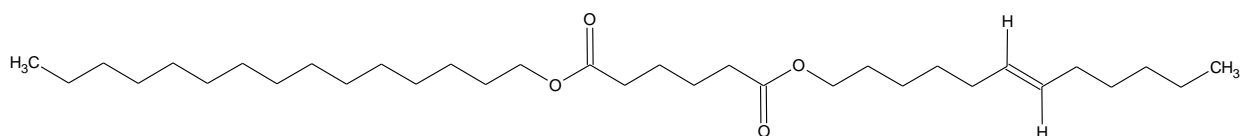
La fórmula molecular que se propone para el pico de ion molecular de 550 uma es $C_{35}H_{66}O_4$, para esta fórmula se tiene un grado de insaturación de 3 y para el pico de ion molecular de 522 uma la fórmula molecular que se propone es $C_{33}H_{62}O_4$ que presenta un grado de insaturación de 3. A los picos de ion molecular de 550 y 522 uma, se les realizó un experimento de MS-MS ESI (+) (espectros 12 y 13) para ambos se observó un pico común en m/z 298, esto podría decir que ambos compuestos cuentan con un fragmento común de 298 uma, este fragmento es mostrado en los espectros 12 y 13 respectivamente.

Adicionalmente se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas GC-MS. El cromatograma de gases es mostrado en el espectro 14, donde se confirmó la presencia de dos compuestos mayoritarios en EH1, son los correspondientes a los picos 11 y 14 del cromatograma, que aparecen a 28,070 y 29,079 minutos respectivamente.

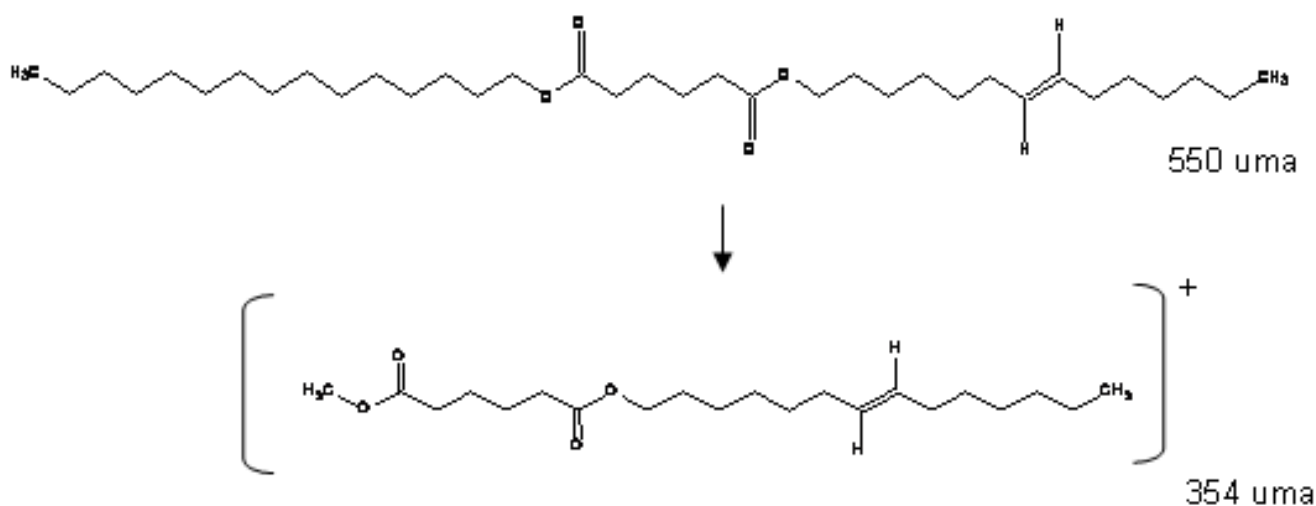
De manera de contar con herramientas para justificar los picos observados en los espectros 15 y 16 se proponen las siguientes estructuras para los compuestos I y II que forman parte de la fracción EH1.



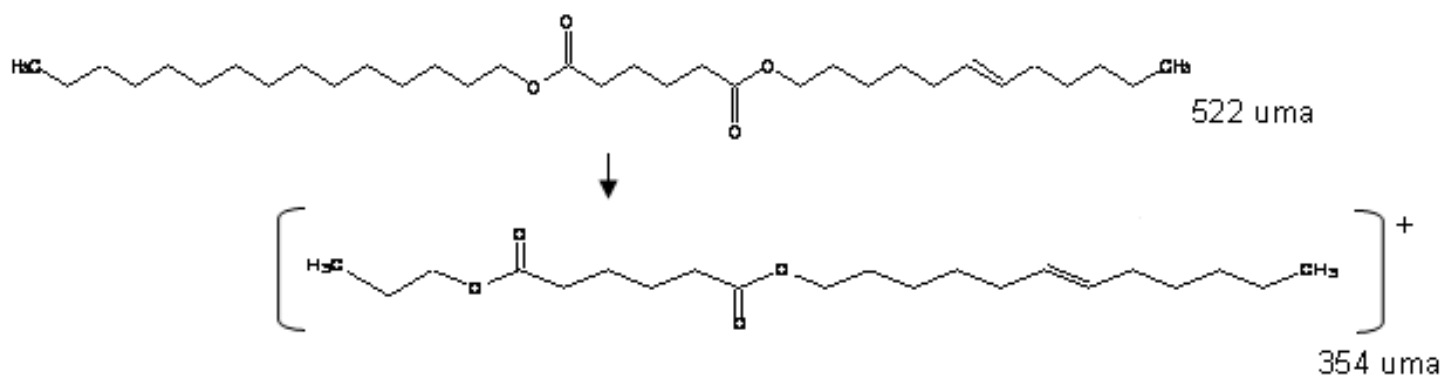
I ($C_{35}H_{66}O_4$)

II ($\text{C}_{33}\text{H}_{62}\text{O}_4$)

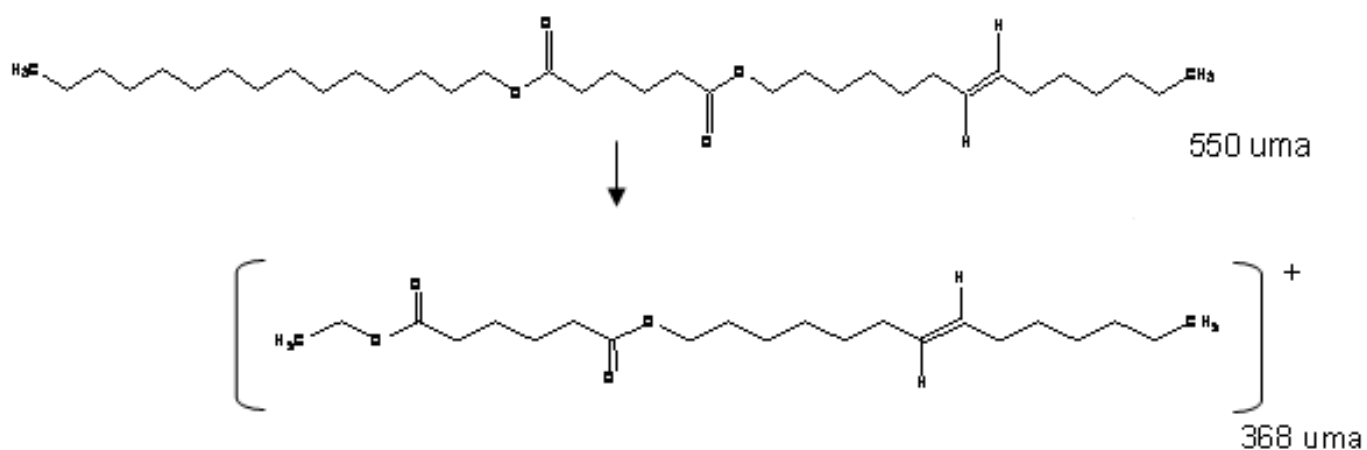
Los espectros 15 y 16, son los espectros de masas donde se muestra la fragmentación de los compuestos correspondientes a los picos 11 y 14 (28,070 y 29,081 minutos) del cromatograma que aparece en el espectro 14. En ambos, se observan pérdidas de fragmentos catorce una las cuales se pueden asociar a fragmentos de $-\text{CH}_2-$ de la cadena lineal. Se observan fragmentos comunes a ambos espectros a valores de m/z : 43, este pico se puede asociar a la fragmentación de una cadena lineal en C_3H_7^+ . Los fragmentos de las pérdidas siguientes se encuentran sumando fragmentos de CH_2 al fragmento del ion propilo, éstos picos aparecen a m/z 57, 71, 85, 99, 113 y 127. El fragmento de 127 una es $\text{C}_9\text{H}_{19}^+$, luego se puede justificar el pico a m/z 354 (espectro 16) de las estructuras que se proponen con la siguiente fragmentación, primero para m/z 550:



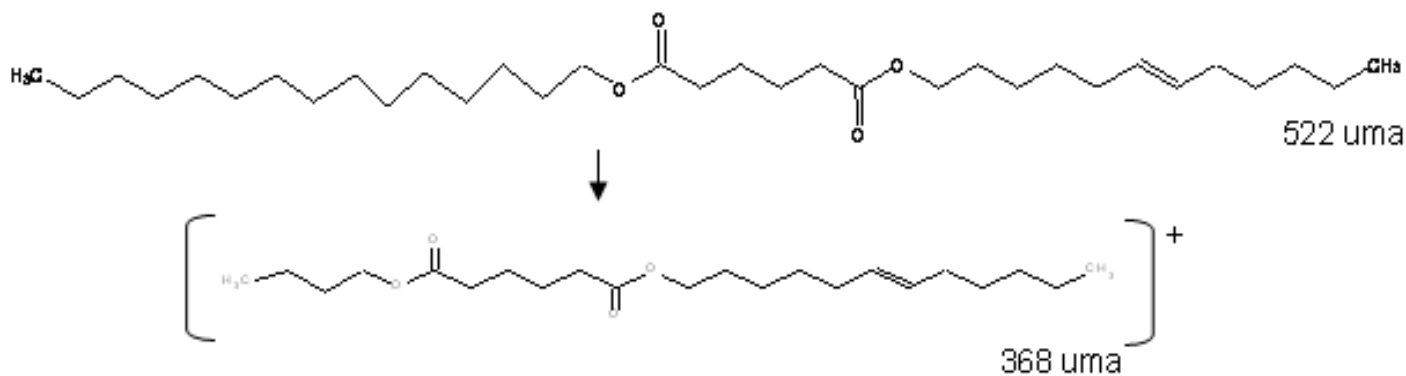
En el caso de m/z 522:



Con ambas estructuras de los posibles compuestos presentes en la fracción EH1, se logra justificar la mayoría de los picos que se observan en los espectros 15 y 16, muchos de ellos son comunes para ambos. En el espectro 16 se puede justificar el pico a m/z 368, para ambas estructuras propuestas, de la siguiente manera, primero para m/z 550:

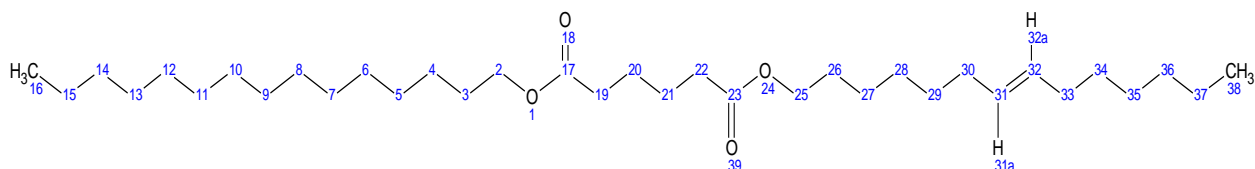


En el caso de m/z 522:

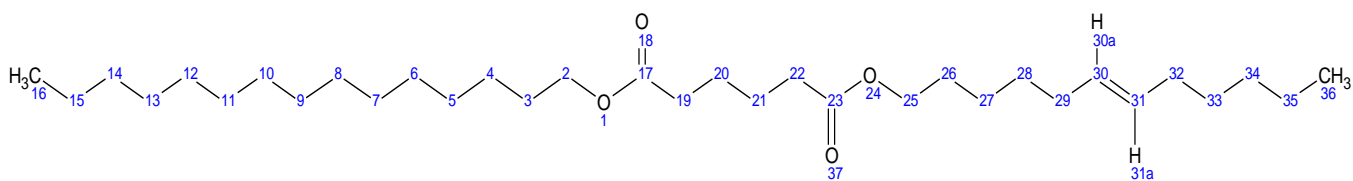


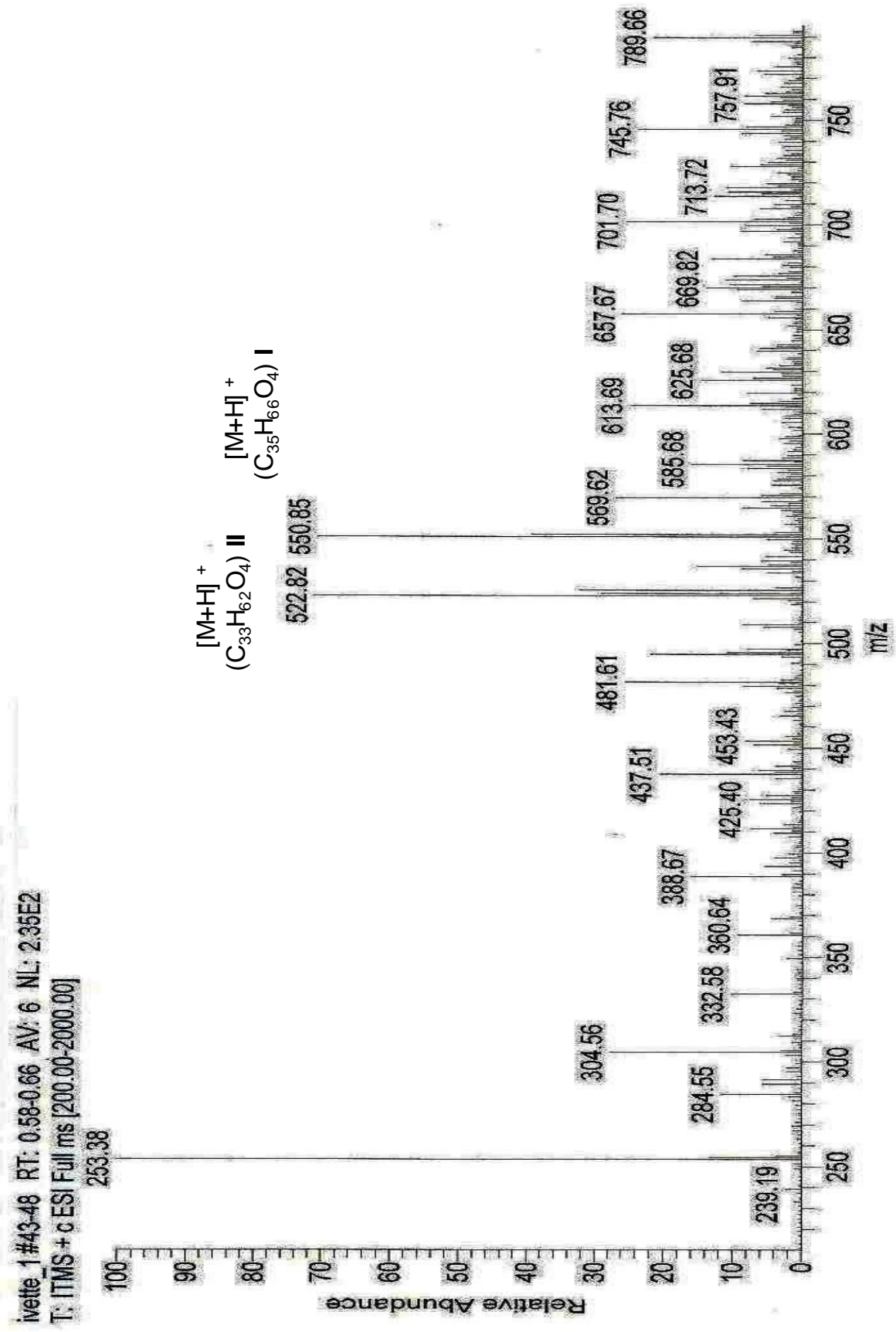
Con base en toda la información analizada, se proponen las siguientes estructuras para los compuestos presentes en la mezcla de compuestos EH1:

Compuesto I (m/z 550 uma, $C_{35}H_{66}O_4$):

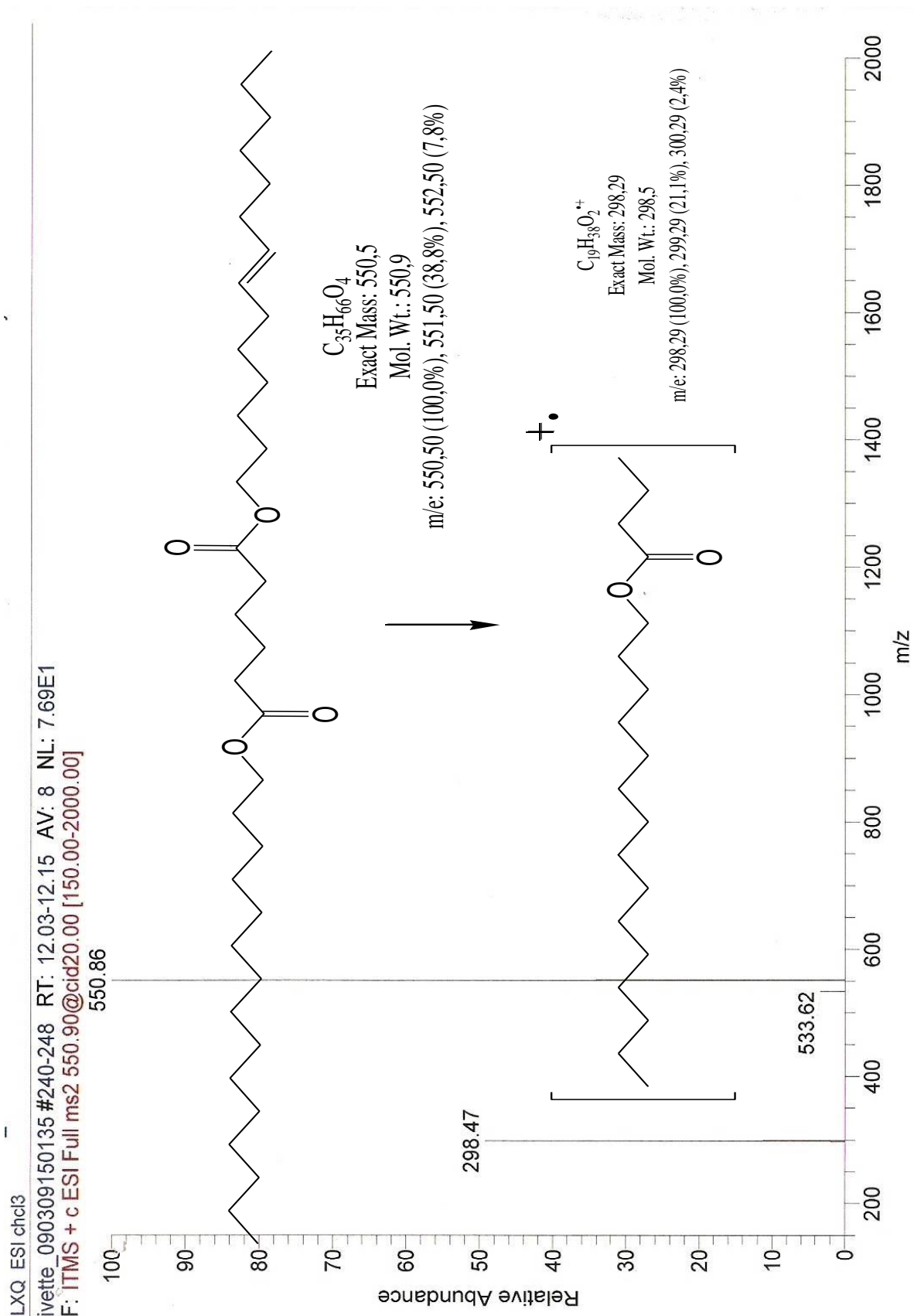


Compuesto II (m/z 522 uma, $C_{33}H_{62}O_4$):

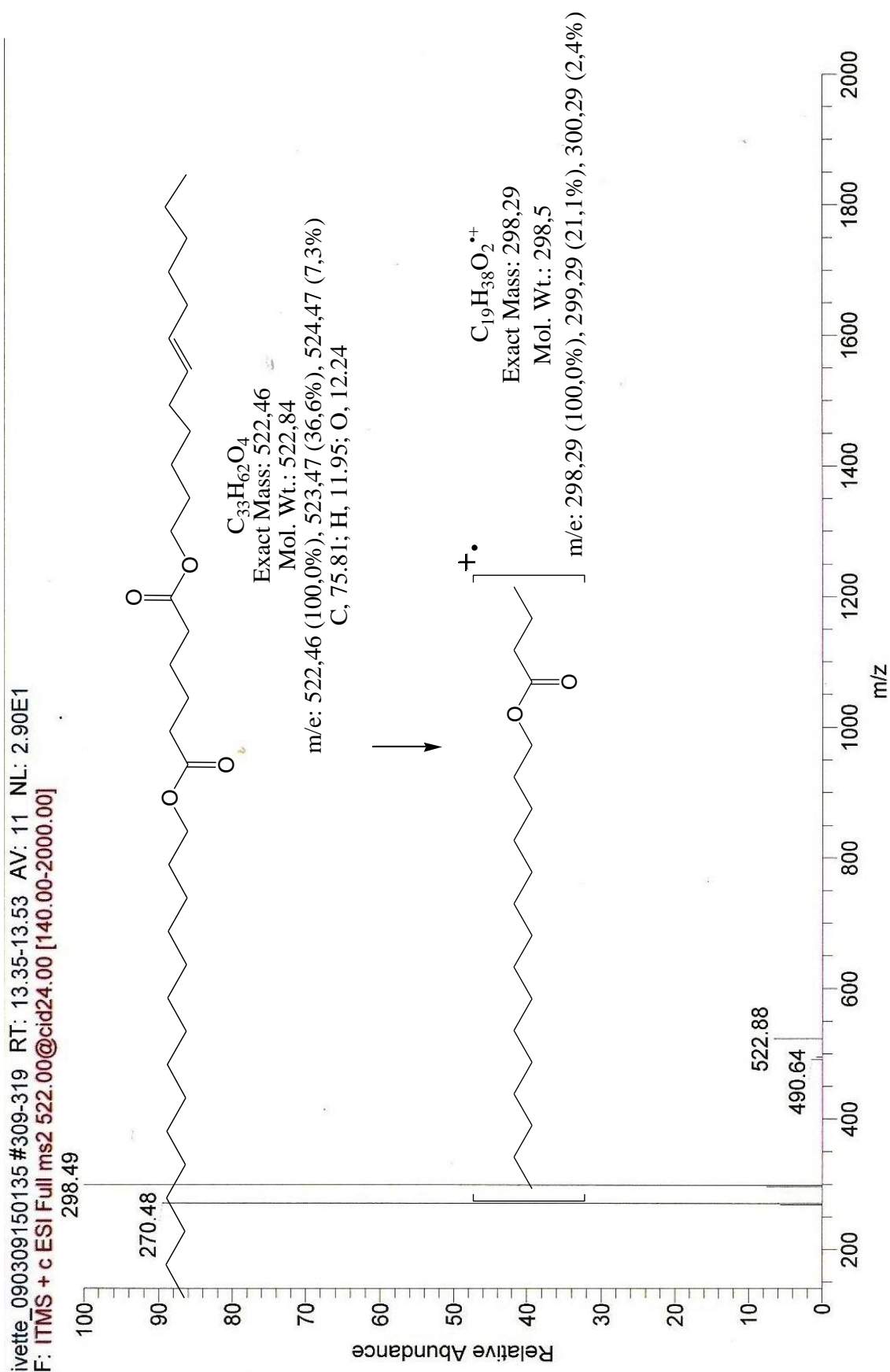




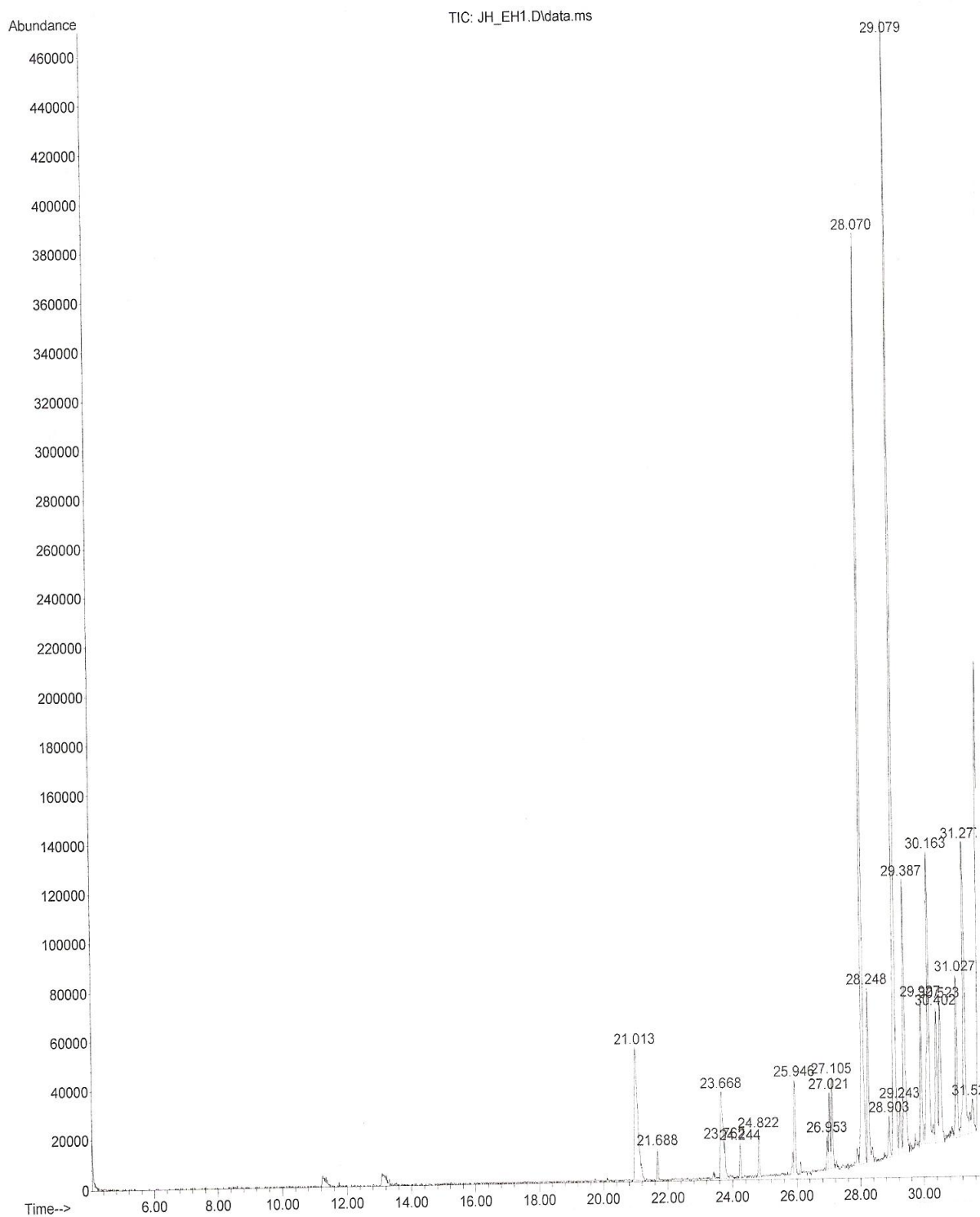
Espectro 11. Espectro de masas LRMS- ESI (+) para EH1.



Espectro 12. Espectro de masas MS-MS ESI (+), para $m/z = 550$ uma.

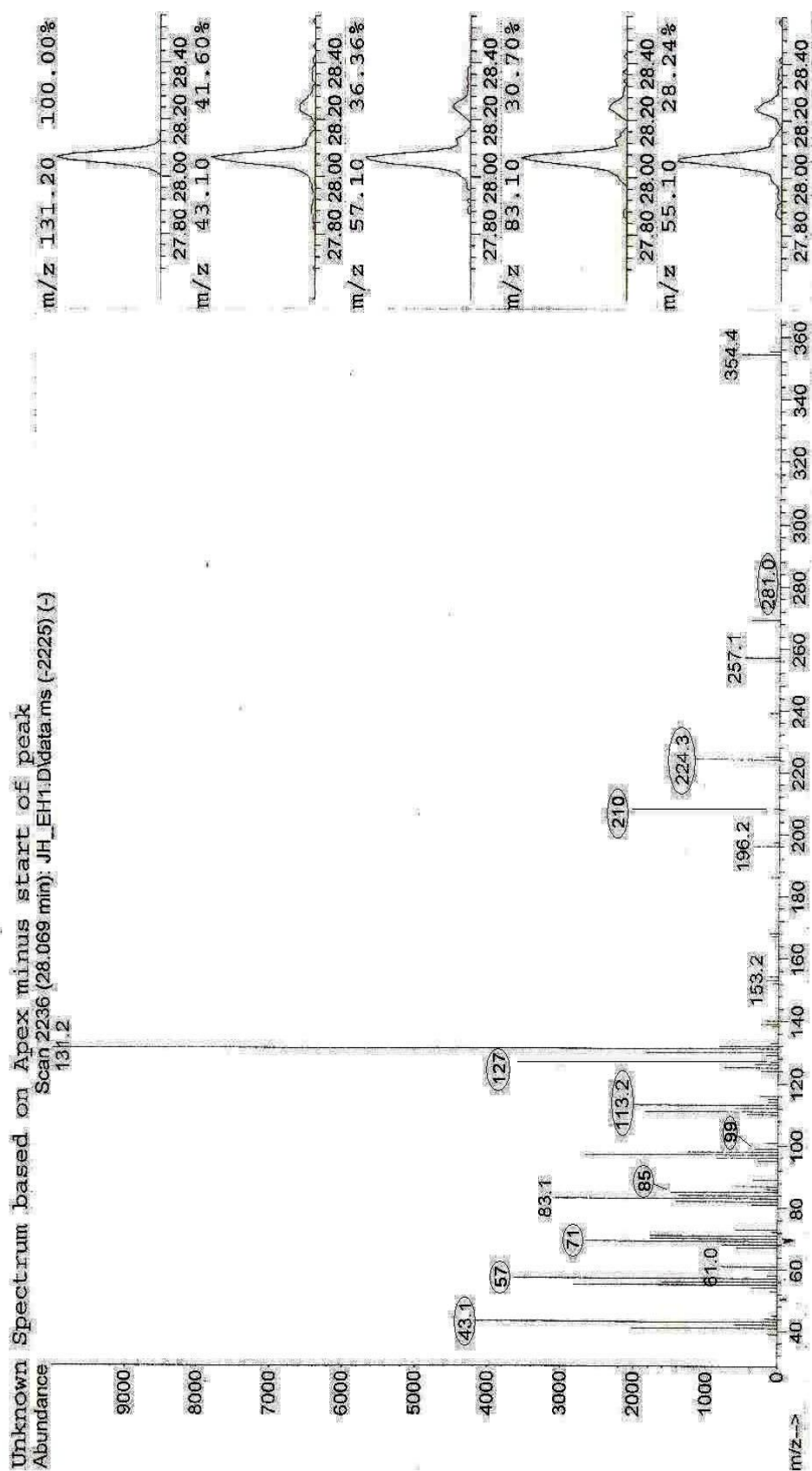


Espectro 13. Espectro de masas MS-MS ESI (+), para m/z= 522 uma.



Espectro 14. Cromatograma de gases para EH1.

Library Search Report - ChemStation Integrator



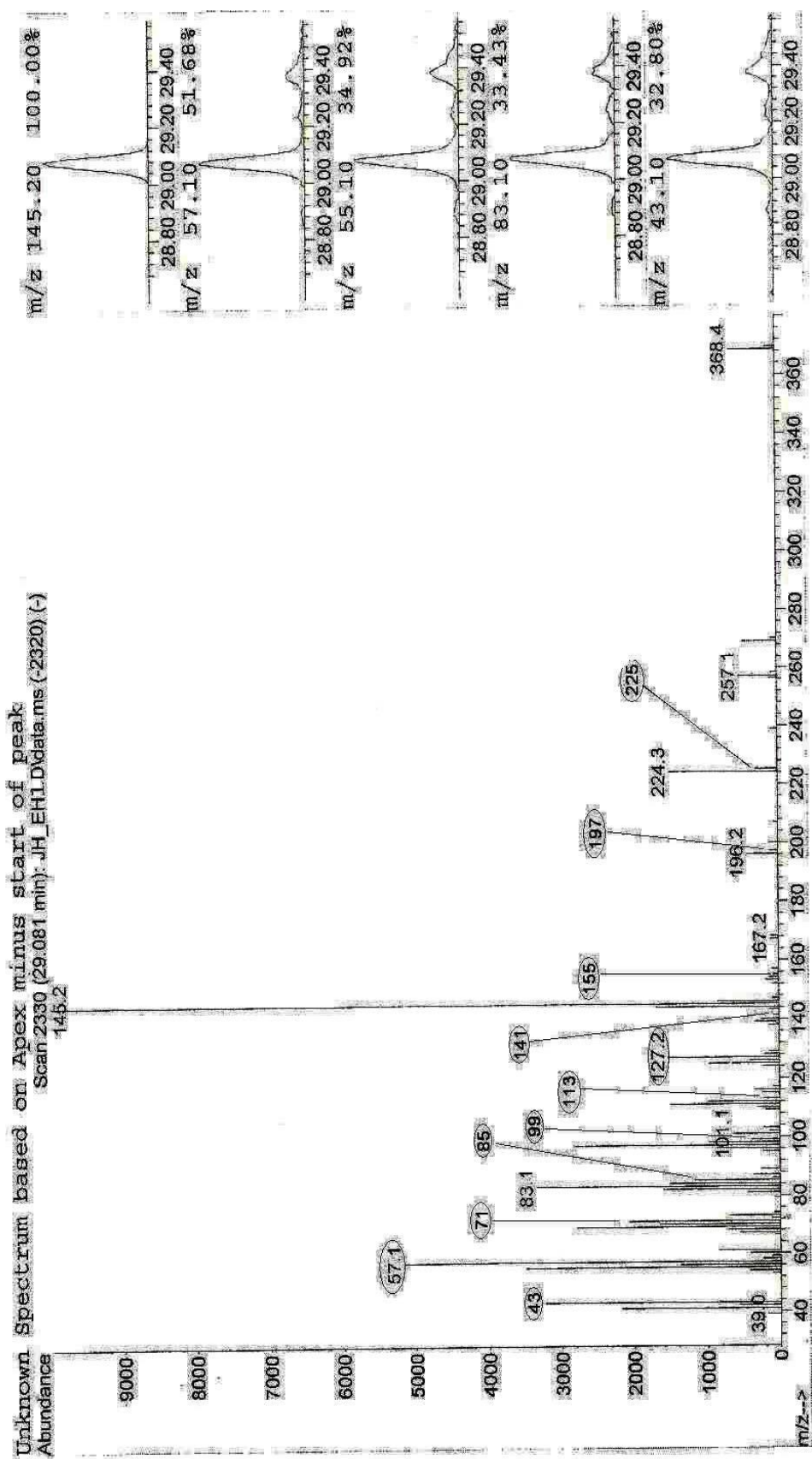
Data File: C:\msdchem\1\DATA\PIña_UCV\JH_EH1.D

Sample : muestra UCV Piña

Peak Number: 11 at 28.069 min Area: 12641389 Area % 18.75

Espectro 15. Espectro de masas para el pico 11, a 28.069 min de EH1, según el espectro 14.

Library Search Report - ChemStation Integrator



Espectro 16. Espectro de masas para el pico 14, a 29.081 min de EH1, según el espectro 14.

Tabla 15. Asignaciones de ^1H -RMN (270 MHz) y ^{13}C -RMN (67,5 MHz), para las estructuras de los compuestos I y II propuestos.

Posición	I (m/z: 550 uma)		II (m/z: 522 uma)	
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2, 25	4,04	64,49	4,04	64,49
3, 26	1,68	(29,24- 29,77)	1,68	(29,24- 29,77)
4, 27	1,24	28,73	1,24	28,73
5, 6, 7, 8, 9	1,24	27,27	1,24	27,27
10, 11, 12, 13, 14	1,24	26,02	1,24	26,02
15	1,24	22,77	1,24	22,77
16	0,86	14,20	0,86	14,20
17, 23		174,08		174,08
19, 22	2,27	34,49	2,27	34,49
20, 21	1,68	25,11	1,68	25,11
28	1,24	28,73	1,24	(29,24- 29,77)
29	1,24	(29,24- 29,77)	1,99	32,00
30	1,99	32,00	a. 5,67	129,94
31	a. 5,67	129,94	a. 5,67	129,94
32	a. 5,67	129,94	1,99	32,00
33	1,99	32,00	1,24	(29,24- 29,77)
34	1,24	(29,24- 29,77)	1,24	27,27
35	1,24	28,73	1,24	22,77
36	1,24	27,27	0,86	14,10
37	1,24	22,77		
38	0,86	14,10		

Los espectros en dos dimensiones permitieron establecer las correlaciones más relevantes para las estructuras propuestas.

Las asignaciones reportadas en la tabla 15 se obtuvieron de las correlaciones observadas en el espectro 17, del experimento de RMN HSQC, que muestra las correlaciones entre protones y carbonos hasta un enlace. Las correlaciones se encuentran siguiendo la línea que va de la coordenada del espectro protones hasta el punto donde intersecta la línea que va a la coordenada del espectro de carbonos, (La ampliación del espectro RMN HSQC se encuentra en el espectro 18. Anexos).

Adicionalmente se realizaron experimentos de RMN TOCSY (de donde se obtuvieron las correlaciones protón- protón a uno y hasta dos enlaces) y RMN HMBC (de donde se obtuvieron las correlaciones entre protones y carbonos hasta dos y tres enlaces), las correlaciones se hicieron en los espectros 19 y 22. (Las ampliaciones del espectro RMN TOCSY se encuentran en los espectros 20 y 21, las del espectro RMN HMBC se encuentran en los espectros 23, 24 y 25. Anexos).

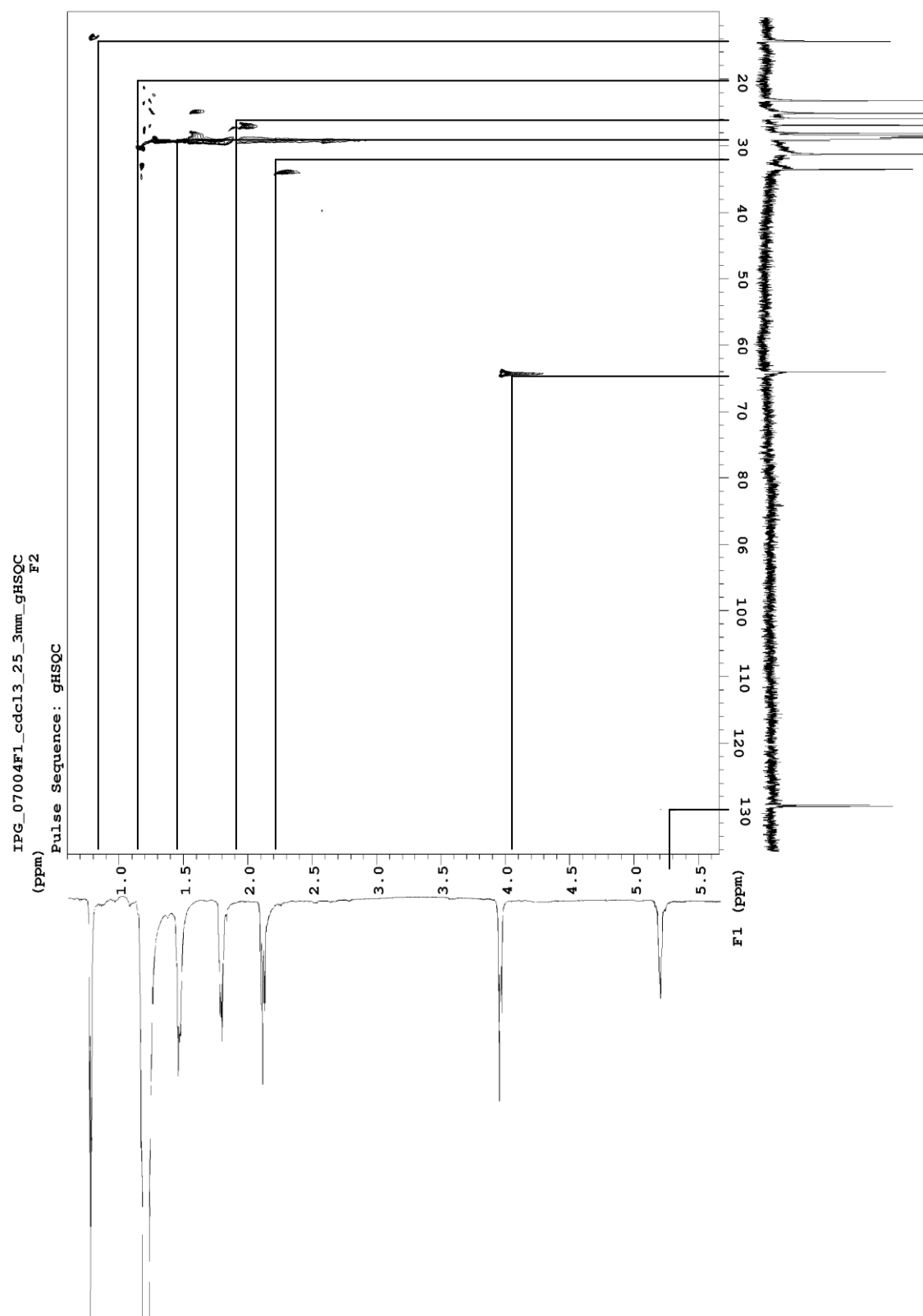
En el caso de los espectros de RMN TOCSY, como las dos coordenadas son del espectro de protones, las correlaciones se encuentran partiendo del eje de las ordenadas hasta llegar al extremo de la línea que une los protones que se están correlacionando, se sigue la línea y luego se vuelve en el camino de regreso al eje de las ordenadas, los valores en el eje de las ordenadas son los valores de los desplazamientos químicos que se asocian a los protones que se están correlacionando.

En el caso de los espectros de RMN HMBC, Las correlaciones se encuentran siguiendo la línea que va de la coordenada del espectro protones hasta el punto donde intersecta la línea que va a la coordenada del espectro de carbonos.

En las figuras 16, 17, 18, 19, 20 y 21, se muestran las correlaciones más relevantes que se hicieron en las moléculas de las estructuras propuestas como I y II.

En el espectro 26 se muestra el espectro de protones, con las asignaciones de protones para las moléculas propuestas como I y II.

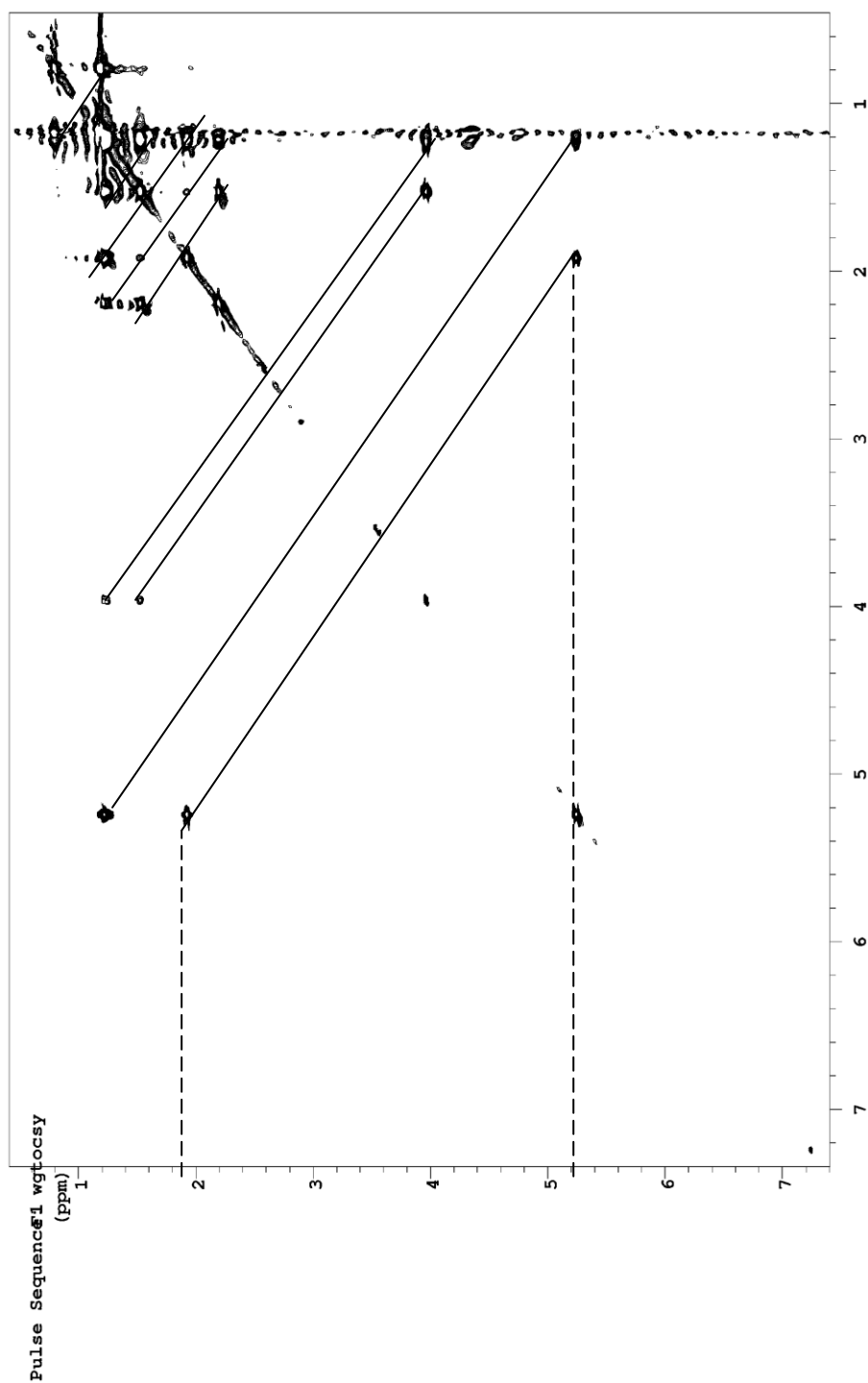
En el espectro 27 se muestra el espectro de carbono, con las asignaciones de carbono para las moléculas propuestas como I y II.



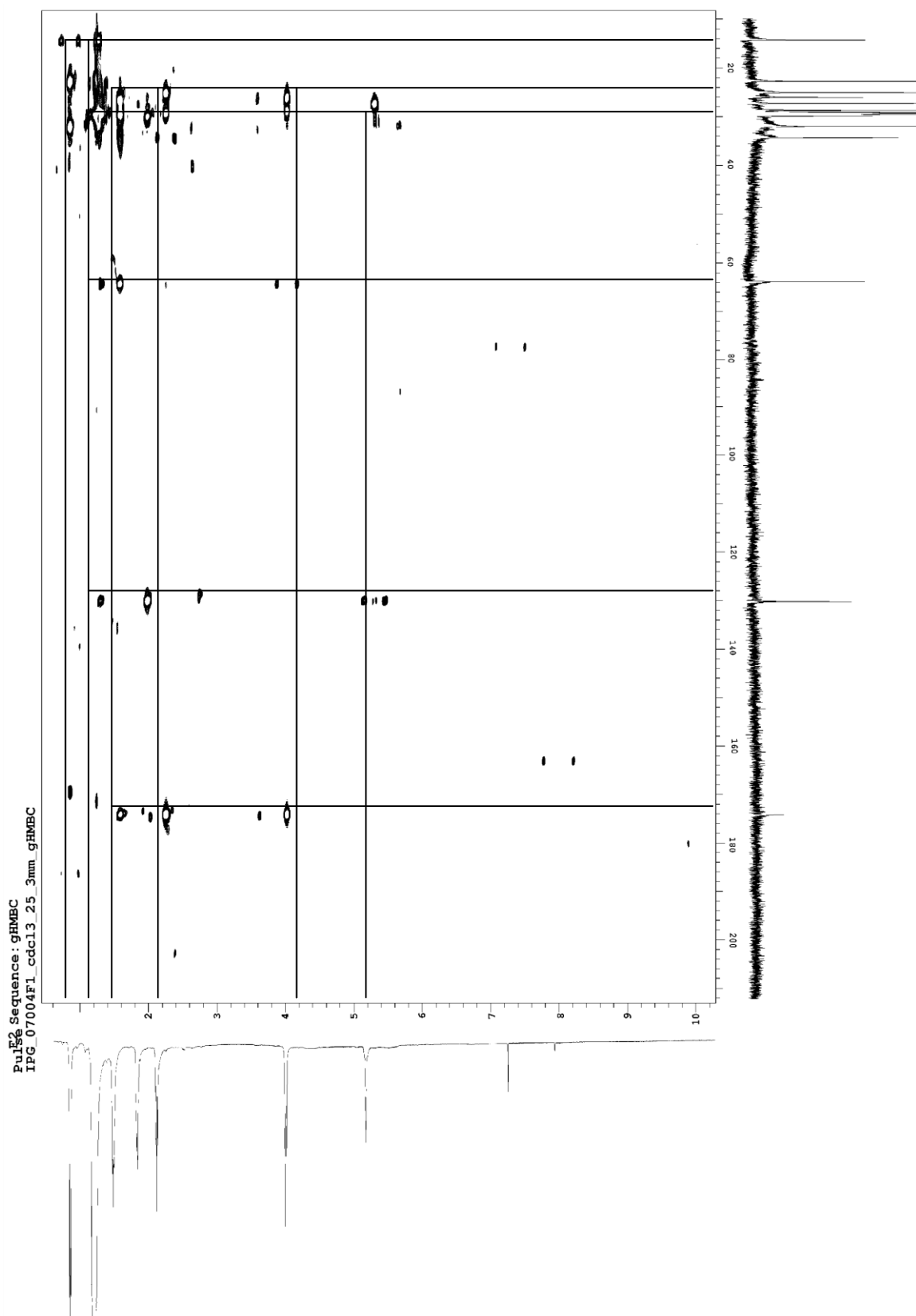
Espectro 17. Espectro de RMN HSQC para EH1.

IPG_07004F1_cdcl3_25_3mm_tocsy

Sample directory:
File: PROTON



Espectro 19. Espectro de RMN TOCSY para EH1.



Espectro 22. Espectro de RMN HMBC para EH1.

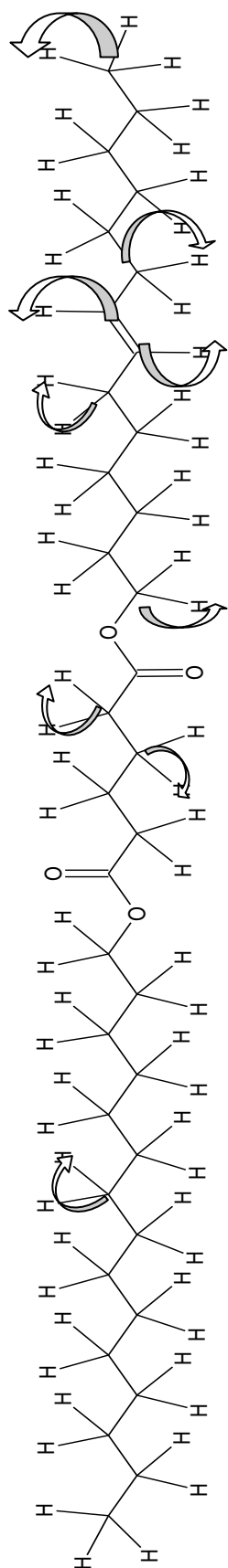


Figura 16. Correlaciones HSQC, I ($C_{35}H_{66}O_4$).

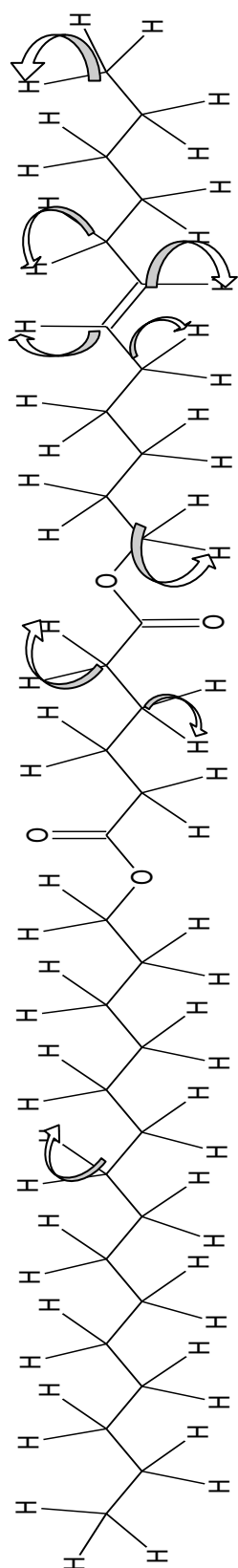


Figura 17. Correlaciones HMQC, II ($C_{33}H_{62}O_4$).

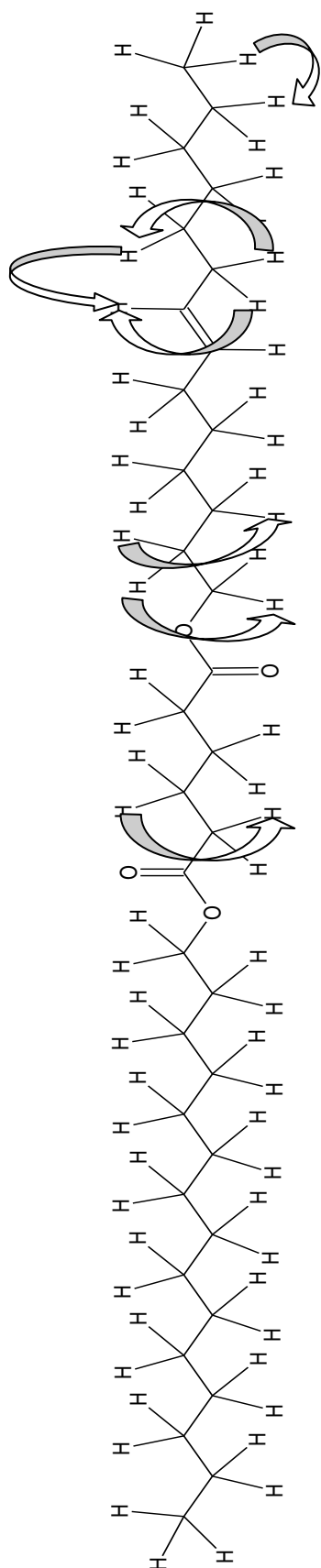


Figura 18. Correlaciones TOCSY, I ($C_{35}H_{66}O_4$).

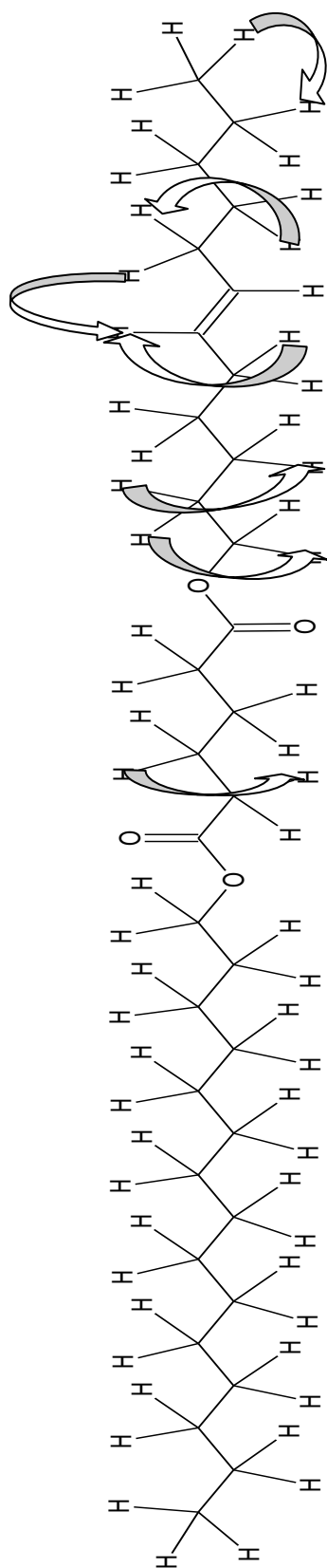


Figura 19. Correlaciones TOCSY, II ($C_{33}H_{62}O_4$).

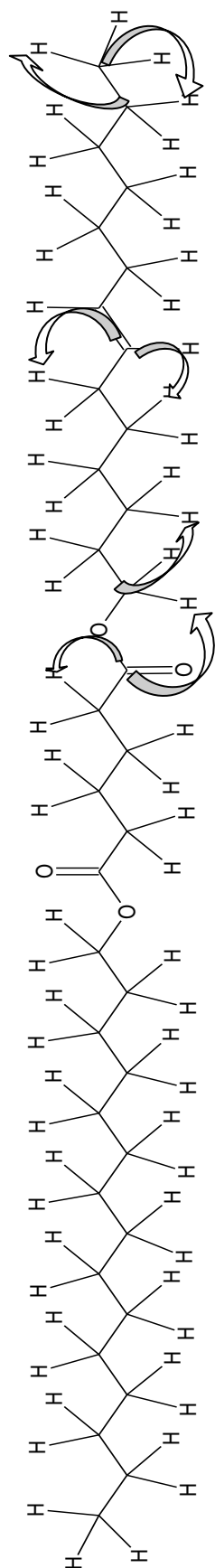


Figura 20. Correlaciones HMBC, I ($C_{35}H_{66}O_4$).

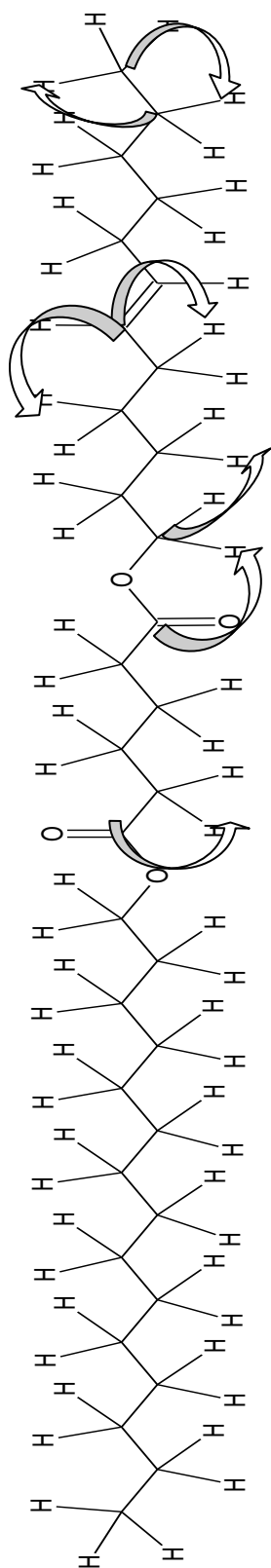
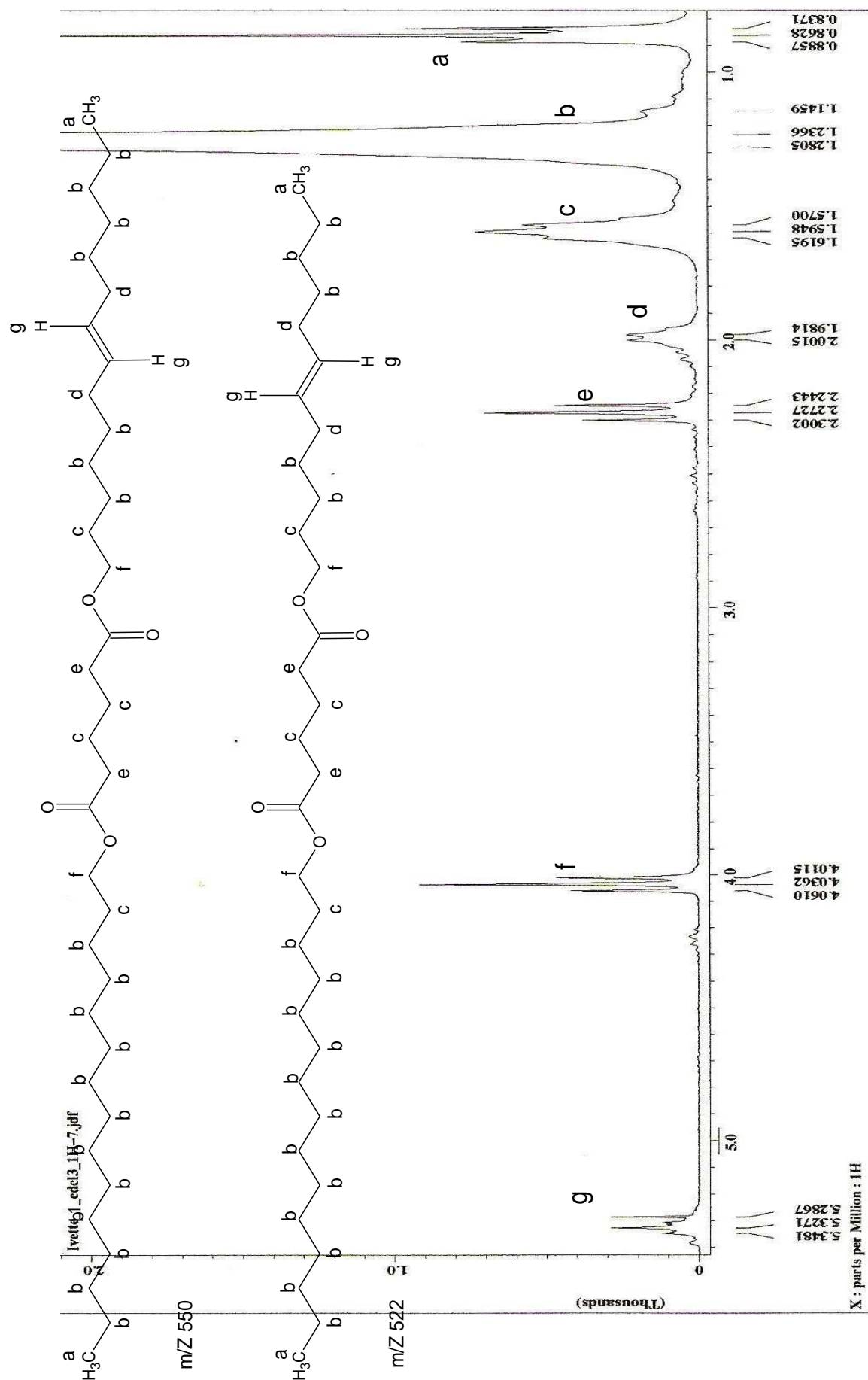
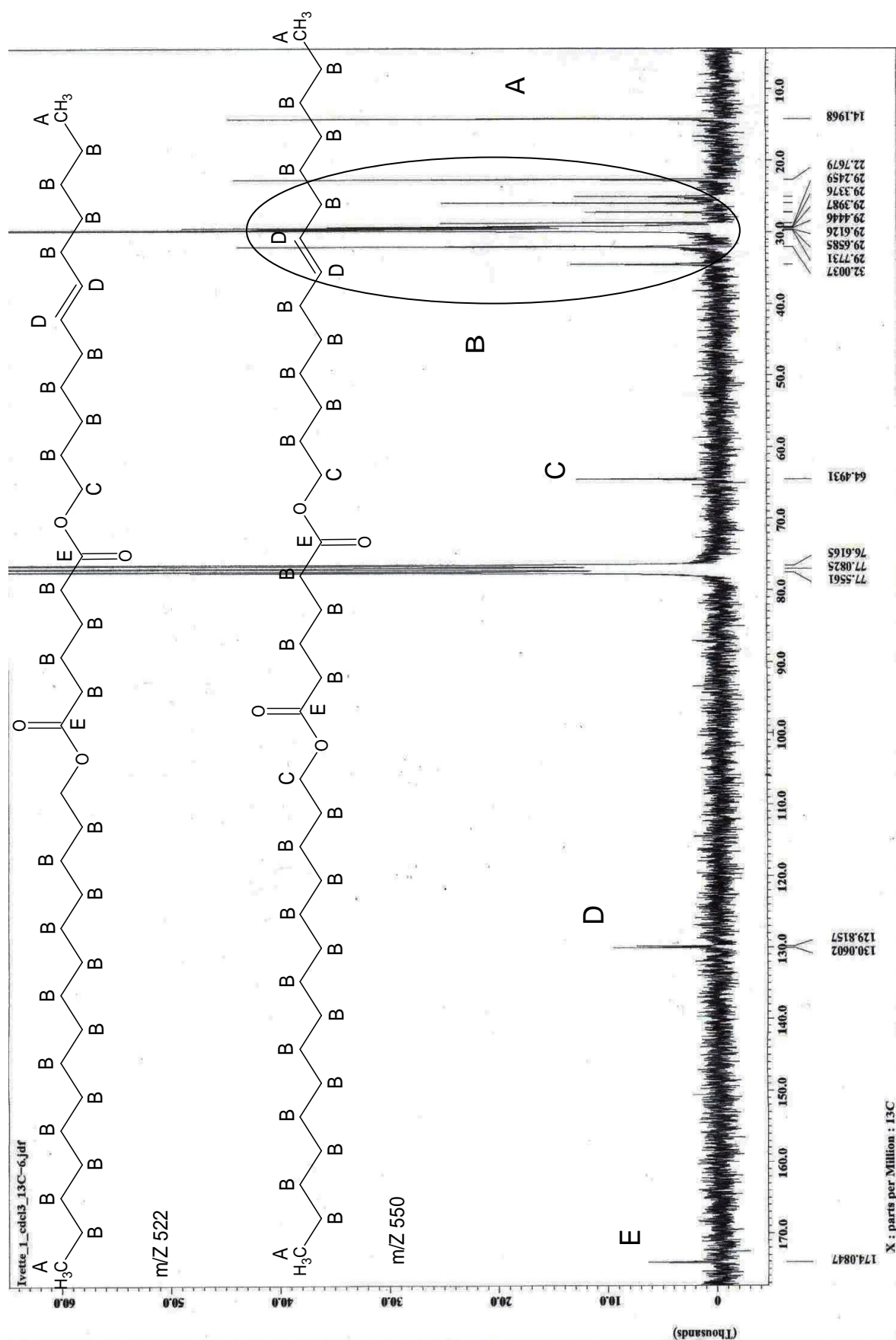


Figura 21. Correlaciones HMBC, II ($C_{33}H_{62}O_4$).



Espectro 26. Espectro de RMN ^1H para EH1 con la asignación de protones en la estructura del compuesto.



Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C para EH1 con la asignación de carbonos en la estructura del compuesto.

IV.1.2. Discusión de resultados obtenidos para el ensayo de mortalidad de *Artemia salina*.

Las sustancias que producen toxicidad se califican como tóxicas. Se habla de toxicidad crónica cuando la exposición prolongada a una sustancia, en dosis normalmente moderadas causa un daño orgánico mensurable pero no provoca la muerte del organismo. Se habla de toxicidad aguda cuando una exposición única al agente tóxico causa un daño orgánico mensurable que puede provocar la muerte. Los agentes tóxicos pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica, a aquellos de origen orgánico se les denomina toxinas y algunos son de carácter proteico.^[42]

El ensayo de mortalidad de los camarones de *Artemia salina* proporciona un indicio del nivel de toxicidad del material que es ensayado. Este ensayo se aplicó al crudo metanólico CM y a los extractos EH, ED, ES y EA, en los resultados mostrados en la tabla 4, se observa un índice de toxicidad alto para CM y para EH, exhibiendo valores en ambos casos mayores o iguales a 60,00 %. En el caso de ED se observa un índice de toxicidad moderado con un valor de 48,79 % y para los extractos ES y EA se observa un índice de toxicidad bajo, exhibiendo valores en ambos casos menores a 30,00 %. Estos resultados pueden indicar que el índice de toxicidad obtenido para el crudo metanólico CM es en gran parte debido a la presencia de los componentes presentes en el extracto de hexano, aunque de igual manera no se puede desligar la influencia de los extractos de diclorometano, sec-butanol y del extracto acuoso, que pueden también ejercer un efecto aditivo a la toxicidad observada para CM.

A la fracción EH1 también se le realizó el ensayo de *Artemia salina*. Para esta mezcla, se observó que a concentraciones de 1 y 10 ppm no hubo efecto tóxico, mientras que a 100 ppm se evidenció un efecto tóxico bajo alcanzando un valor de 11,8 %, a una concentración de 1000 ppm se encontró una moderada toxicidad (46,4 %), estos datos se reportaron en la tabla 14 y en la figura 15 se observa el

comportamiento no lineal del crecimiento de la toxicidad de la fracción EH1 con la concentración.

IV.1.3. Discusión de resultados obtenidos para el ensayo de difusión en discos de papel, técnica de Kirby y Bauer.

Se realizó el análisis del crudo metanólico CM, y de los extractos EH, ED, ES y EA en bacterias gram positivas y gram negativas, con el propósito de analizar si los componentes presentes en cada uno de ellos posee actividad antibacterial. En este ensayo no se observó la presencia de halos de inhibición para CM, EH, ED, ES ni para EA. Estos resultados indican que en la especie *Pseudopterogorgia americana* que se colectó en costas venezolanas, no se encuentran componentes con capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, éstos resultados se obtuvieron empleando concentraciones de los extractos y de CM de 10, 100, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm.

IV.1.4. Discusión de resultados obtenidos para el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa.

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) es una enzima localizada predominantemente en el retículo endoplasmático (RE) del hígado y del riñón y cataliza el paso final tanto de la gluconeogénesis como de la glucólisis, convirtiendo la glucosa-6-fosfato (G-6-P) en glucosa (G) y fosfato inorgánico (Pi).^[15]

El proceso de inhibición se puede llevar a cabo principalmente en dos sitios, en el transportador T1 (proteína transportadora de sustrato glucosa-6-fosfato), esto va a ocurrir en el caso donde se tienen microsomas intactos, donde no se han colocado histonas al medio de reacción. Otro sitio donde se puede llevar a cabo la

inhibición es directamente sobre la sub- unidad catalítica (SUC), esto va a ocurrir en el caso donde se tienen microsomas rotos, donde se han colocado histonas al medio de reacción con el fin de obtenerlos.

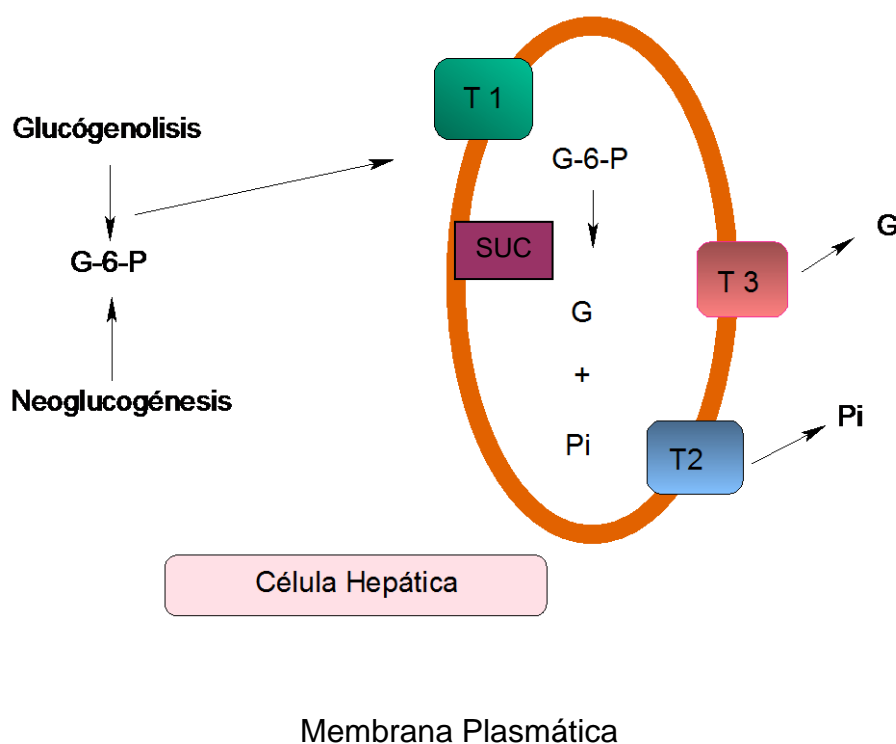


Figura 6. Diagrama esquemático del metabolismo de la glucosa hepática.^[16]

CM, EH, ED, ES y EA, fueron evaluados en el ensayo de inhibición de la enzima G-6-Pasa, obteniendo los valores que se reportan en la tabla 5, la inhibición de CM arrojó valores altos, de 50,00 % en microsomas intactos y de 95,50 % en microsomas rotos, en la fase inicial. Para descartar la posibilidad que el fosfato inorgánico (Pi) pudiera estar ejerciendo inhibición tanto sobre el transportador T1 como en la subunidad catalítica (Figura. 6), se removió todo posible Pi que pudiera estar contenido en CM a través de una columna de intercambio iónico y se le repitió el ensayo al material eluído de columna, este material se rotuló como crudo metanólico CM sin fosfato. Al observar los porcentajes de inhibición para CM ahora sin

fosfato, (25,00 % en microsomas intactos y 27,30 % en microsomas rotos), se observa una disminución notable en comparación a los valores de CM inicial, esto indicó que efectivamente había presencia de fosfato en CM y los valores de los porcentajes de inhibición del mismo eran muy altos debido a que el Pi por tener cierta similitud estructural con el sustrato (glucosa-6- fosfato) estaba actuando como inhibidor de la enzima tanto en el transportador T1 como en la sub- unidad catalítica. Con respecto a los valores obtenidos para CM_{sin fosfato}, se tienen resultados similares tanto en microsomas rotos como en microsomas intactos, lo que sugiere, que la inhibición de la enzima se lleva a cabo tanto en el transportador T1 como en la subunidad catalítica.

Al observar los valores de porcentaje de inhibición obtenidos para EH, ED, ES y EA, se tiene que el valor más alto de inhibición se obtuvo para EH tanto con microsomas rotos (69,10 %) como con microsomas intactos (67,50 %),. El valor más bajo de inhibición se obtuvo para ED tanto con microsomas rotos 23,41 % como con microsomas intactos (56,69 %). Los valores de porcentaje de inhibición obtenidos para ES y EA estuvieron entre (59,12 y 61,42) %, siendo éste un grado de inhibición significativo ya que en cualquier caso es mayor al 50,00 %. Para el caso de los extractos EH, ES y EA, los valores correspondientes a la inhibición en microsomas intactos se asemejan a los valores encontrados para la inhibición en microsomas rotos, implicando que la actividad se pudiera estar produciendo en el mismo grado en el transportador T1 y en la subunidad catalítica. Los resultados discutidos se encuentran graficados en la figura 14.

En la tabla 14 se reportan los resultados obtenidos para la fracción EH1, donde está presente la mezcla de compuestos I y II, en función de nm Pi/h x mg de proteína, para el experimento con microsomas intactos el valor que se obtuvo fue 0,014 nm/h x mg y para el experimento con microsomas rotos el valor que se obtuvo fue 0,19 nm/h x mg, este resultado muestra que en el caso en que se emplearon microsomas intactos hubo menor cantidad de Pi producido (0,014 nm/h x mg) en la

reacción y por tanto hubo mayor inhibición de la enzima (65,0 %), en comparación con el caso en que se emplearon microsomas rotos donde se observó mayor cantidad de Pi producido (0,19 nm/h x mg), que conlleva consigo un menor porcentaje de inhibición de la enzima (13,6 %). Para la mezcla de compuestos I y II, la inhibición de la enzima se da de manera efectiva sólo en el transportador T1.

Otro factor considerado fue la latencia, ésta se considera como una característica común de las enzimas asociadas a membrana y se define como el porcentaje de la actividad presente en vesículas membranosas totalmente rotas que no se expresa en las no tratadas. Las fracciones microsomales y de envoltura nuclear están constituidas por una mezcla de vesículas con membranas intactas y otras con membranas rotas y se denominan preparaciones no tratadas. Cuando a las preparaciones se les adiciona histonas la integridad de la vesícula se pierde, el sustrato tiene libre acceso a la subunidad catalítica y la preparación se denomina rota. La actividad de la enzima en vesículas intactas se puede estimar substrayendo la actividad del componente roto de la actividad de las vesículas no tratadas.^[43]

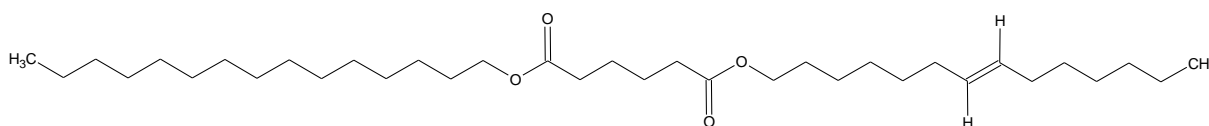
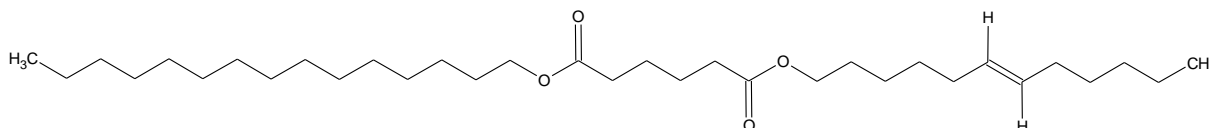
El valor obtenido para la latencia de la enzima fue del 92,6 %, en concordancia con los valores observados en la actividad inhibitoria sobre la enzima, la cual fue mayor cuando se emplearon microsomas intactos en comparación a microsomas rotos,

Con base en los resultados obtenidos, se considera que los compuestos presentes en EH1 pudieran tener cierta relevancia en el tratamiento de la hiperglicemia que presentan los pacientes que padecen diabetes mellitus tipo II.

CAPÍTULO V.

V.1. CONCLUSIONES.

Se reportan dos nuevos metabolitos secundarios del extracto de hexano del coral blando Venezolano *Pseudopterogorgia americana*, los compuestos I y II, presentes en la fracción EH1. Las estructuras se proponen con base en los datos espectroscópicos y espectrométricos obtenidos, las cuales se muestran a continuación:

I ($C_{35}H_{66}O_4$)II ($C_{33}H_{62}O_4$)

Debido a que los compuestos I y II son estructuralmente muy similares La separación efectiva de los mismos no se pudo hacer a través de la técnica de cromatografía en columna. Sin embargo, se pudo realizar un análisis efectivo de los mismos a través de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La caracterización de los compuestos I y II se realizó a través del análisis de los datos obtenidos de los espectros de masas y de resonancia magnética nuclear en una y dos dimensiones.

La mezcla de dichos compuestos resultó ser moderadamente tóxica en el ensayo de mortalidad de *Artemia salina* para una concentración de 1000 ppm (46,4 %).

En la especie *Pseudopterogorgia americana* colectada en costas Venezolanas no se encontraron componentes capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, para concentraciones de la muestra de 10, 100, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm.

La mezcla de compuestos I y II, presentó actividad en la inhibición sobre la enzima G-6-Pasa, bloqueando la entrada de la glucosa-6-fostato a la sub- unidad catalítica a través del transportador T1 con un valor de 65,0 %. Este valor es significativo en el ensayo realizado por lo que pudiera tener aplicabilidad en la disminución de los niveles de glicemia, para tratar la diabetes mellitus tipo II.

V.2. RECOMENDACIONES.

En este trabajo especial de grado se analizaron algunas fracciones del extracto de hexano del coral blando venezolano *Pseudopterogorgia americana*, se sugiere:

- Realizar el análisis de las fracciones restantes.
- Realizar la evaluación de los compuestos encontrados en otros ensayos biológicos, de manera de aportar información sobre la actividad biológica de la especie coralina *Pseudopterogorgia americana* colectada en costas Venezolanas.

V.3. GLOSARIO.

Acetogenina: Cada uno de los compuestos orgánicos contruidos con unidades repetidas de dos carbonos derivadas del ácido acético. En sentido estricto, sólo se habla de acetogeninas en el caso de los policétidos, en los que se pueden reconocer con bastante claridad las unidades de ácido acético. En sentido amplio, el grupo incluye también los terpenoides, esteroides y ácidos grasos. La síntesis de las acetogeninas tiene lugar por condensaciones sucesivas cabeza-cola de moléculas de ácido acético, activado como acetil-CoA. El policétido formado puede ciclarse por condensaciones aldólicas o por condensaciones de Claisen, dando un gran variedad de productos naturales, generalmente fenoles aromáticos.

Amibocitos: Células con pseudópodos localizadas en el mesohilo de las esponjas.

Antibióticos: Dícese de los agentes que destruyen o inhiben el crecimiento y desarrollo de determinados microorganismos. En medicina, se concibe como la sustancia química producto de una biosíntesis específica de determinados microorganismos (mohos, hongos, bacterias, etc.), cuya acción sobre otros microorganismos conduce a la destrucción o a la inhibición de su desarrollo. Los antibióticos actúan por inhibición de la síntesis de la pared celular de las bacterias, de la síntesis de proteínas al actuar sobre los ribosomas, y también por su intervención sobre el metabolismo intermediario.

Antígeno: Término general para designar toda sustancia que introducida en el organismo animal, provoca la formación de anticuerpos. Generalmente son de naturaleza proteica.

Axis: Segunda vértebra del cuello, sobre la cual se verifica el movimiento de rotación de la cabeza.

Biosíntesis: Síntesis de los componentes moleculares de las células por los organismos vivos. La energía necesaria para ello proviene generalmente de la hidrólisis del ATP.

Bipinada: Hoja cuyos folíolos, en vez de simples, son pinnados, es decir que se articulan en un tallo central formando ángulo recto y en numerosas ramificaciones.

Cenénquima: Estructura calcárea de mesoglea extendido entre los pólipos de una colonia de antozoos.

Citoplasma: Parte del protoplasma de la célula que rodea el núcleo, limitada por una membrana celular, llamada también membrana plasmática. Está formado por una sustancia fundamental semifluida en la que se encuentran dispersos en gran número los diferentes orgánulos celulares.

Coccidios: Grupo de esporozoos que viven generalmente en el interior de las células, como parásitos. Muchas especies son agentes causantes de enfermedades en los animales domésticos y (raras veces) en el hombre (coccidiosis).

Cromatina: Nombre que recibe el material cromosómico en estado de interfase. Está constituida por proteínas y ácidos nucleicos y tiene carácter basófilo, por lo que se la puede teñir con colorantes básicos

Diterpeno: Molécula que contiene 20 átomos de carbono, se pueden tener varios arreglos, lineales, bicíclicos y tricíclicos, entre otros.

Ectodermo: Hoja blastodérmica o germinada externa, del embrión de los animales, de la que derivan los tejidos epidérmico y nervioso.

Escindir: Cortar, dividir, separar.

Escisiparidad: Forma de reproducción asexual por la cual el individuo se segmenta longitudinal o transversalmente en dos.

Espículas: Cuerpo diminuto, a veces microscópico, de naturaleza calcárea o silíceo, que constituye el tejido de sostén (esqueleto) de muchos invertebrados.

Esporulación: Forma de reproducción asexual de los vegetales pluricelulares, en la que células no sexuales (esporas) se multiplican para dar lugar a nuevos seres pluricelulares, los cuales, a su vez, originan otros similares a la primera generación.

Esteroides: Cada uno de los compuestos químicos cuya característica común es poseer el sistema tetracíclico del perhidrociclopentanofenantreno. Los esteroides se encuentran en todos los organismos vivos, en los que desempeñan importantes funciones biológicas. Fármaco: Es toda sustancia química purificada utilizada en el tratamiento, cura, prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado.

Filogenia: Origen y desarrollo evolutivo de las especies, y en general, de las estirpes de seres vivos.

Glicoproteína: También llamadas glucoproteínas, son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono, simples o compuestos. Tienen entre otras funciones el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de la membrana plasmática.

Glutati3n: Trip3ptido natural constituido por 3cido glutam3nico, ciste3na y glicina; puede obtenerse sint3ticamente. Act3a como sistema redox biol3gico en el metabolismo. Su bios3ntesis, en el hombre y los animales, tiene lugar en el h3gado.

G3nada: 3rganos gametog3nicos (productores de gametos) de los animales pluricelulares.

Histonas: Son prote3nas b3sicas que rompen la integridad de las estructuras microsomales.

Hipostoma: Elevaci3n c3nica del 3pice de un p3lipo donde se localiza la boca.

Huso: Estructura fusiforme compuesta de fibras musculares estriadas, incluidas en una vaina de tejido conjuntivo.

IC₅₀: Concentraci3n que inhibe el crecimiento del 50 % de la poblaci3n que esta siendo probada.

Lipoprote3na: Son complejos macromoleculares esf3ricos, est3n formadas por un n3cleo que contiene l3pidos apolares (colesterol esterificado y triglic3ridos) y una capa externa polar formada por fosfol3pidos, colesterol libre y prote3nas (apolipoprote3nas). Estas lipoprote3nas se clasifican en diferentes grupos seg3n su densidad, a mayor densidad menor contenido en l3pidos.

Lugol: Soluci3n acuosa Yodoyodurada.

Mesenterio: Cualquiera de los pliegues peritoneales que encubren diversos 3rganos internos y los mantienen fijos en su posici3n.

Mesoglea: Sustancia gelatinosa que se halla entre el ectodermo y endodermo en el cuerpo de los celentéreos o cnidarios. En la forma pólipo representa el mesodermo y en la forma medusa sufre modificaciones hasta llegar casi a desaparecer.

Metabolitos primarios: Son productos bioquímicos que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos y proteínas, entre otros.

Metabolitos secundarios: Se define como aquel compuesto que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza.

Metazoario: Animal que posee como los vertebrados, órganos celulares diferenciados.

Morfología: Estudio de las formas o estructuras de los seres vivos, ya sea atendiendo a su proceso evolutivo o a los tipos existentes.

Nematocisto: Cada una de las vesículas urticantes de los celentéreos, consistente en una pequeña cápsula intracelular, que contiene un filamento punzante por el que se destila un líquido irritante.

Opérculo: Pieza generalmente redondeada que cierra determinadas aberturas de los seres vivos.

Osículo: Estructura dura con forma de hueso que tiene funciones de fijación y sostén.

Período Cámbrico: Comenzó hace alrededor de 542 millones de años, es la primera de seis etapas de la Era Primaria, llamada también Era Paleozoica. Terminó hace

unos 488 millones de años, para dar paso al Ordovícico. El Cámbrico constituye una de las grandes divisiones de la geología histórica (la rama de la geología que estudia las transformaciones que ha sufrido la Tierra desde su formación).

Pétreo: De la calidad de la piedra.

Pólipo: Animal de estructura simple que puede vivir solitario o formando colonias.

Protozoarios: Son organismos microscópicos, unicelulares eucarióticos; heterótrofos, que viven en ambientes húmedos o directamente en medios acuáticos, ya sean salobres o de aguas dulces.

Sésil: Dícese de aquel animal fijado sobre el sustrato, sedentario.

Sesquiterpeno: Molécula que contiene 15 átomos de carbono, presentan una gran diversidad esquelética como resultado de la gran facilidad de reorganizarse que poseen estas estructuras.

Sifonoglifo: Serie de células flageladas dispuestas en la faringe de varios grupos de celentéreos, cuya misión es mantener una corriente de agua hacia la cavidad gastrovascular y facilitar de esta manera la respiración.

Taxonomía: Ciencia que estudia la clasificación de los organismos según sus semejanzas y diferencias.

Toxina: Tipo de sustancia deletérea que tiene un importante papel en la producción de enfermedades por microorganismos.

Zooxantella: Célula animal con algas simbióticas amarillas en el citoplasma, como en algunos radiolarios, corales y actinas.

V.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] Scheuer Paul. J. *Chemistry Of Marine Natural Products*. Academic Press. New York. **1973**.
- [2] Burger Alfred. *Medicinal Chemistry*. Interscience publishers, INC. Segunda edición. New York. **1960**.
- [3] Albornoz M. Américo. *Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela. Caracas. **1980**.
- [4] Fenical William. *J. Nat. Prod.* **1987**. Vol. 50, pp.1001-1008.
- [5] Rodríguez Abimael. D. *Tetrahedron*. **1995**. Vol. 51, pp. 4571-4618.
- [6] Marine Natural Products Research Group Home Page. UNZ Auckland. http://www.che.auckland.ac.nz/brent/mnprg_intro.htm. **2001**.
- [7] Jiménez José. C, Marfil Marta, Francesca Andrés. M, Cuevas Carmen, Alvarez Mercedes y Albericio Fernando. *Productos Naturales de Origen Marino. Investigación y ciencia*. Editorial Prensa Científica. N° 365. Febrero **2007**.
- [8] Burdin Jean Claude. *Las Bacterias*. Fondo de Cultura Económica. México. **1980**.
- [9] <http://www.fundaciondiabetes.org>. Diabetes. **2007**.

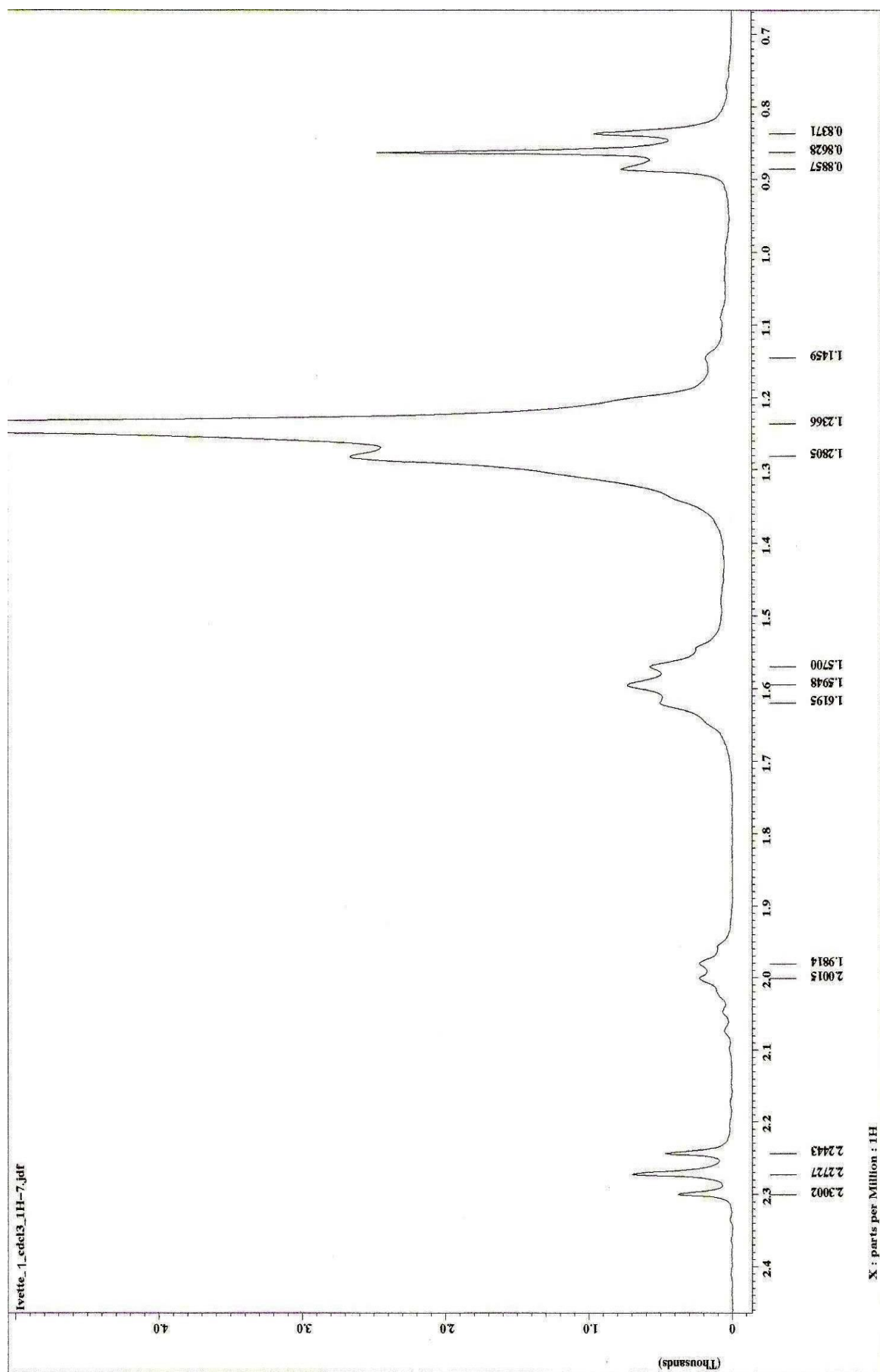
- [10] **"World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications."** Geneva: WHO; 1999. Disponible en PDF. **2007.**
- [11] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001214.htm>. **2007.**
- [12] <http://www.cincopordia.com.mx/html/secciones/salud>. **2007.**
- [13] http://www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_diabetes_sp/gesta.cfm. **2007.**
- [14] Nelson, D. L. and Cox, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 4^{ta} Edición. **2004.** Cap 14.
- [15] McCormack, J.G., Westergard, N., Kristiansen, M., Brand, C.L and Lau J. **Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy.** Current Pharmaceutical Design. **2001.** Cap 7. 1451-1474.
- [16] Burchell, A., Hume, R. and Burchell, B. **A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system.** Clinical Chimica Acta. **1998.** Vol 173. 183-192.
- [17] Estrada, O., Hasegawa, M., González-Mujica, F., Motta, N., Perdomo, E., Solórzano, A., Méndez, J., Méndez, B. and Zea, E. **Evaluation of flavonoids from Bauhinia megalandra leaves as inhibitors of glucosa-6-phosphatase system.** Phytotherapy Research. **2005.** Cap 19. 859-863.

- [18] Marcano Deanna, Hasegawa Masahisa. *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas. **2002**. Cap 1. 55-57.
- [19] McLaughlin Jerry, Colman-Saizarbitoria Trina, Anderson Jon. *"Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales"*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*. **1995**. Vol 18, N° 4.
- [20] Barnes Robert. *Zoología de Invertebrados*. Tercera edición. Nueva editorial Interamericana. México. **1977**. Cap 5. 84-131.
- [21] <http://www.unep-wcmc.org/isdb/taxonomy/tax-species-result.cfm?displaylanguage=ENG&source=animals>. *Descripción taxonómica de la especie Pseudopterogorgia americana*. **2007**.
- [22] <http://jrscience.wcp.muohio.edu/caracas-03/day4/jantheil/pseudopterogorgia-american.html>. *Pseudopterogorgia americana*. **2007**.
- [23] http://es.wikipedia.org/wiki/Johann_Friedrich_Gmelin. *Friedrich Gmelin*. **2007**.
- [24] Ramirez Villaroel, P. *Corales de Venezuela*. Universidad de Oriente. Porlamar. **2001**. 219 pp.
- [25] Bayer. F. M. *The Shallow-water Octocorallia of The West Indian Region. Stud Fauna Curaçao and Other Caribbean Islands*. **1961**. 12.1-373.
- [26] http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/octocorals/pseudopterogorgia_american.html. *Imagen de la especie Pseudopterogorgia americana*. **2007**.

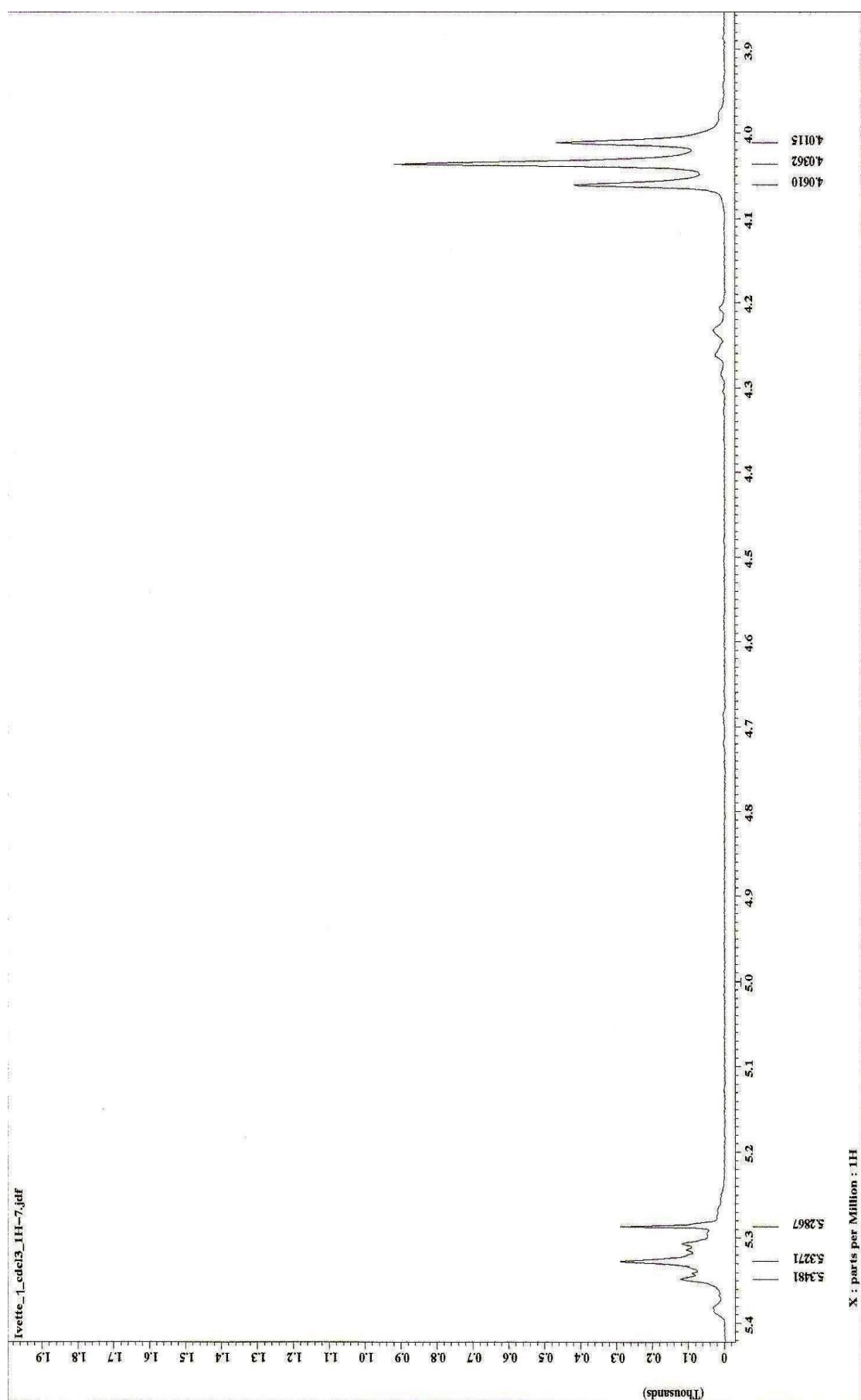
- [27] Weinheimer A. J, Metzner E. K y Mole M. L, Jr. *Tetrahedron*. **1973**. Vol. 29, pp. 3135-3136.
- [28] Izac Richard. R, Bandurraga Maury. M, Wasylyk John. M, Duna Fred. W y Fenical William. *Tetrahedron*. **1982**. Vol. 38, pp. 301-304.
- [29] Chan Wilfred. R, Tinto Winston. F y Moore Ruth. *Tetrahedron*. **1990**. Vol. 46, pp. 1499-1502.
- [30] Miller Samuel. L, Tinto Winston. F, Yang Ji-Ping, McLean Stewart y Reynolds William. F. *Tetrahedron*. **1995**. Vol. 36, pp. 1227-1228.
- [31] Rodríguez Abimael. D y Boulanger Anna. *J. Nat. Prod.* **1996**. Vol. 59, pp. 653-657.
- [32] Rodríguez Abimael. D y Boulanger Anna. *J. Nat. Prod.* **1997**. Vol. 60, pp. 207-211.
- [33] Rodríguez Abimael. D, Rivera Jocelyn y Boulanger Anna. *Tetrahedron*. **1998**. Vol. 39, pp. 7645-7648.
- [34] Rodríguez Abimael. D, Boulanger Anna, Martínez José R y Huang Songping D. *J. Nat. Prod.* **1998**. Vol. 61, pp. 451-455.
- [35] Richardson Patricia. L, Rodríguez Abimael. D, Boulanger Anna y Huang Songping. D. *Acta Cryst.* **1998**. C54, pp. 66-68.

- [36] Naz Samina, Kerr Russel. G y Narayanan Ramaswamy. *Tetrahedron*. **2000**. Vol. 41, pp. 6035-6040.
- [37] Meyer. B. N, Ferrigni. N. R, Jacobsen. J. E, Nichols. D. E y McLaughlin. J. L. *Planta Medica*. **1982**. Vol. 45. pp. 31-34.
- [38] Marcucci. O, González-Mujica. F, Pérez-Ayuso. *Acta Cient. Venezolana*. **1988**. Vol. 34, pp.105-117.
- [39] Lowry. O, Rosebrough. H, Farr. A, Randall. R. *J. Biol. Chem*. **1951**, Vol. 193, pp. 209-220.
- [40] Markwell. M, Hass. S, Bieber. L, Tolbert. N. **1978**. Vol. 87. pp. 206-210.
- [41] William. B, Wilson. K. "Principios y técnicas de Bioquímica" Editorial Omega, Barcelona. **1981**.
- [42] Biblioteca de consulta Microsoft Encarta. **2003**.
- [43] González- Mujica, Freddy. *Investigación clínica*. **2008**. Vol. 49(2). pp.169-180.

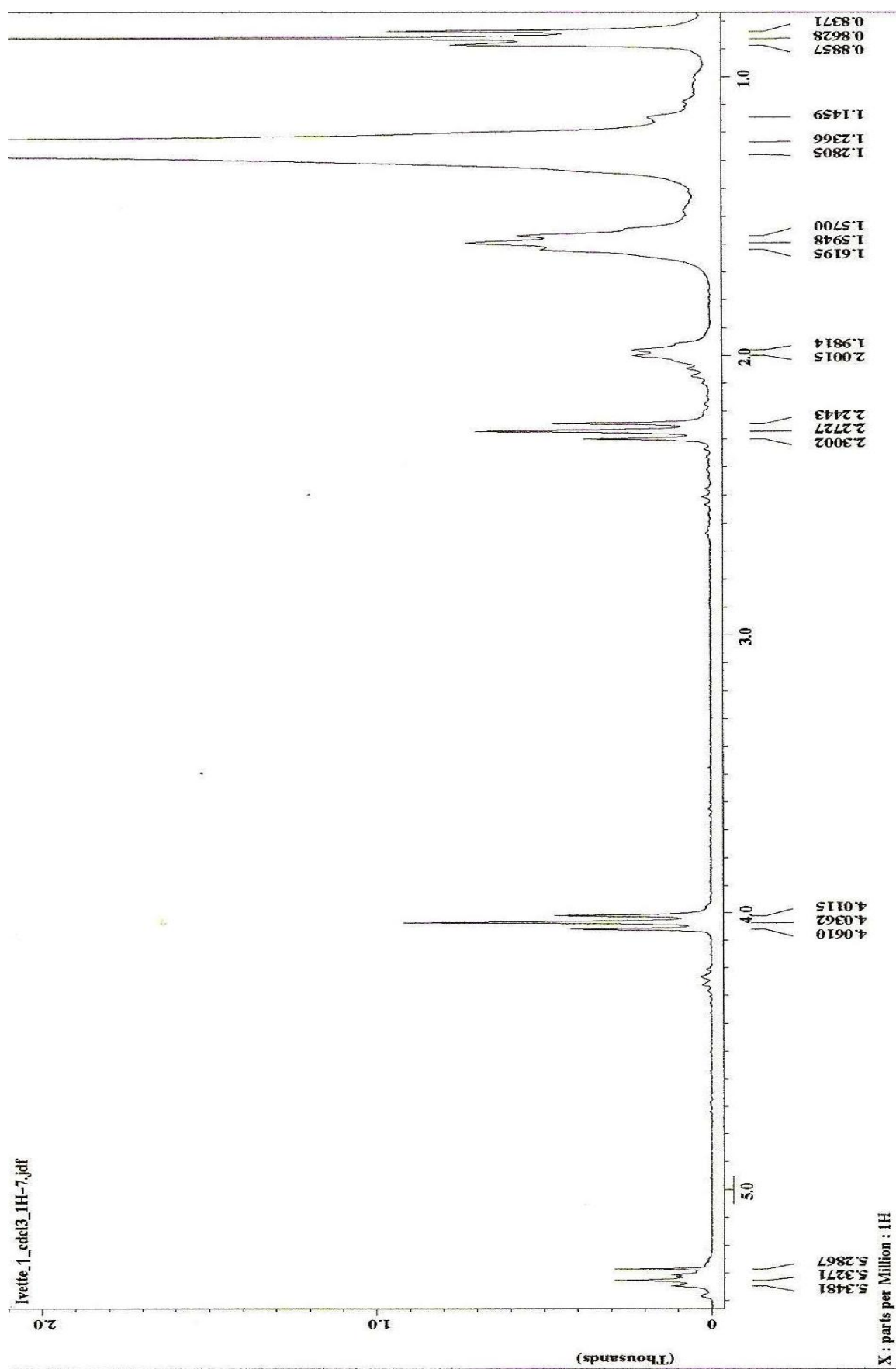
V.5. ANEXOS.



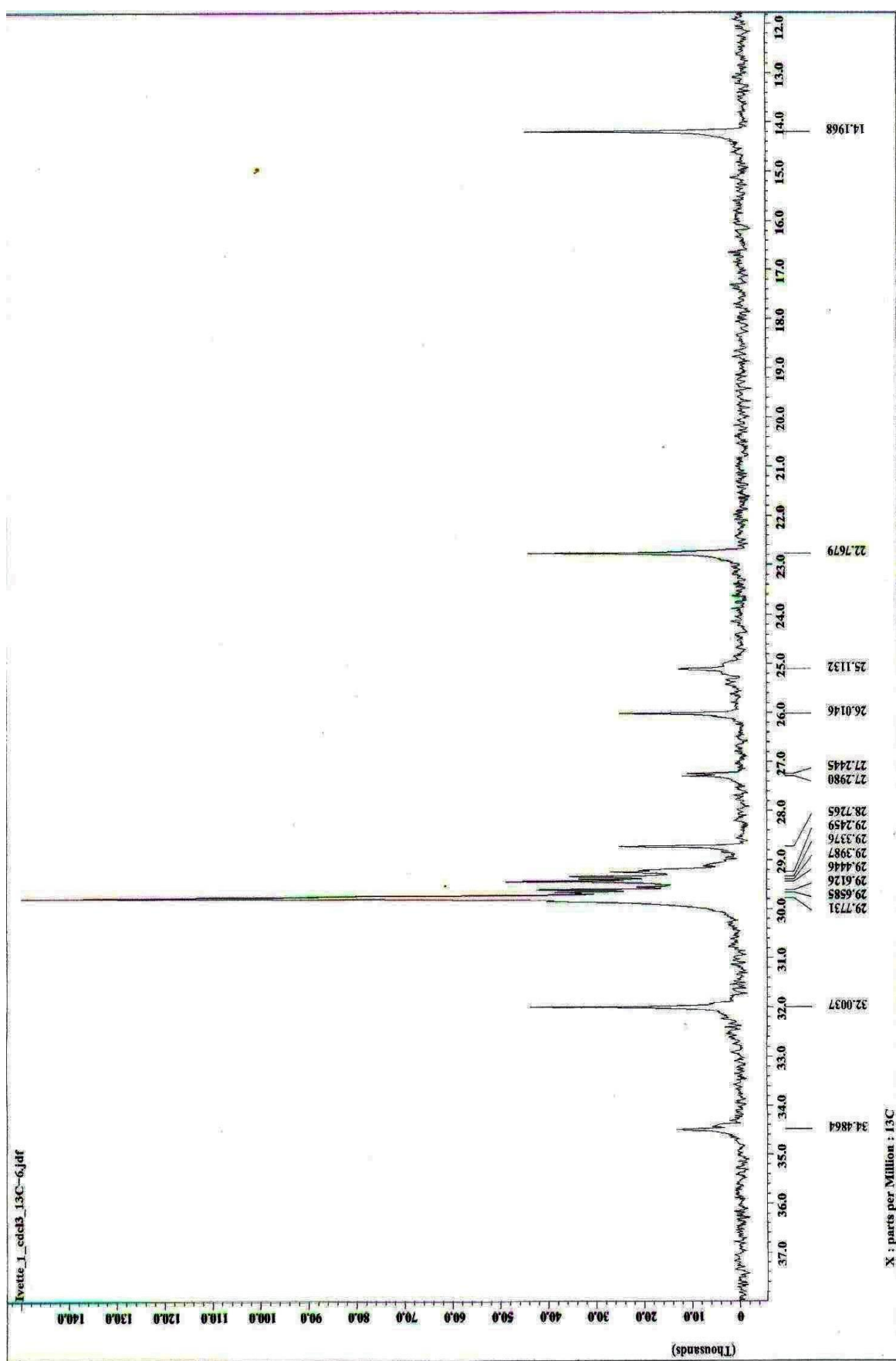
Espectro 3. Espectro de RMN ^1H ampliado (0,7 - 2,4) ppm, para EH1.



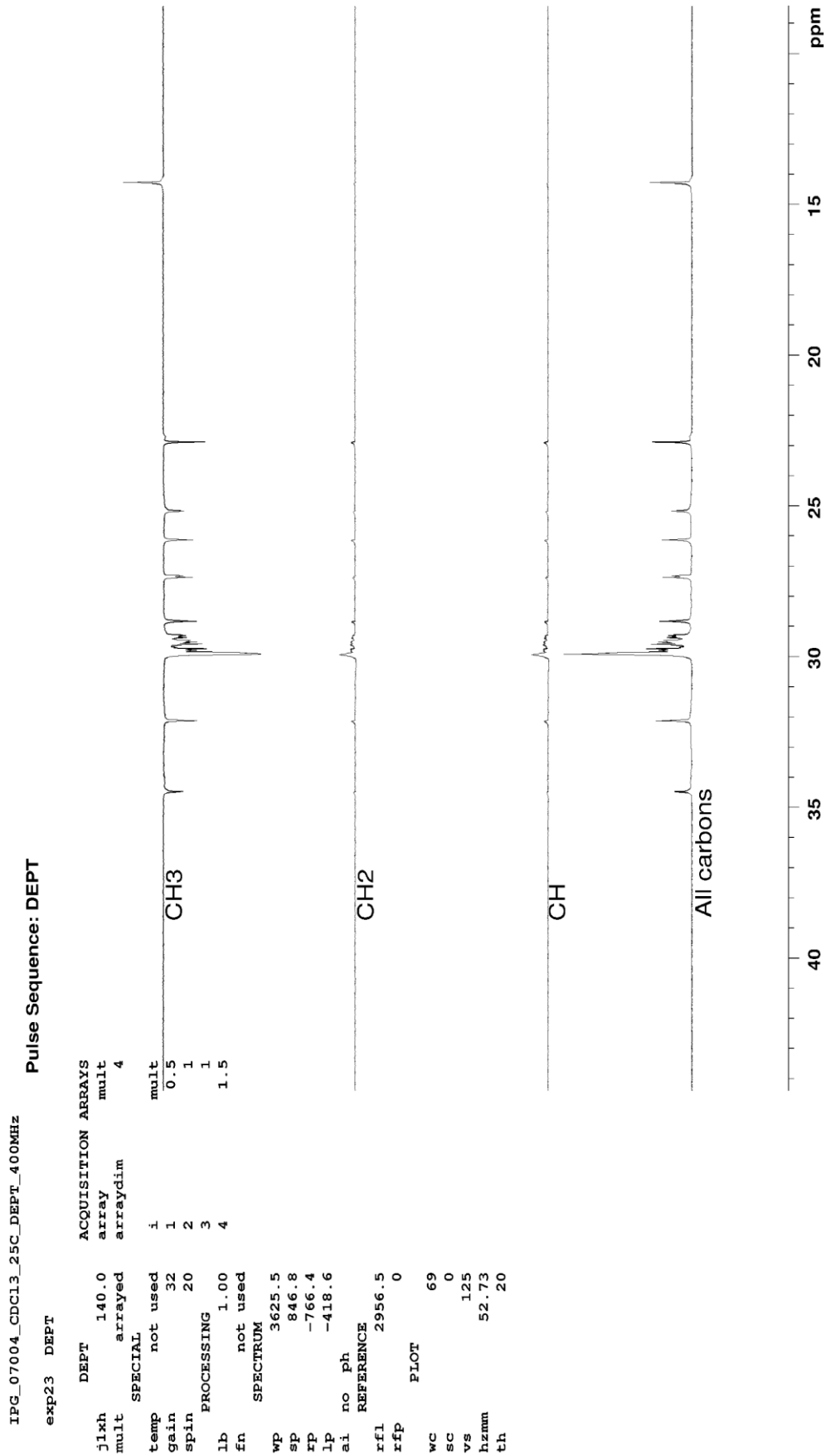
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H ampliado (3,9- 5,4) ppm, para EH1.



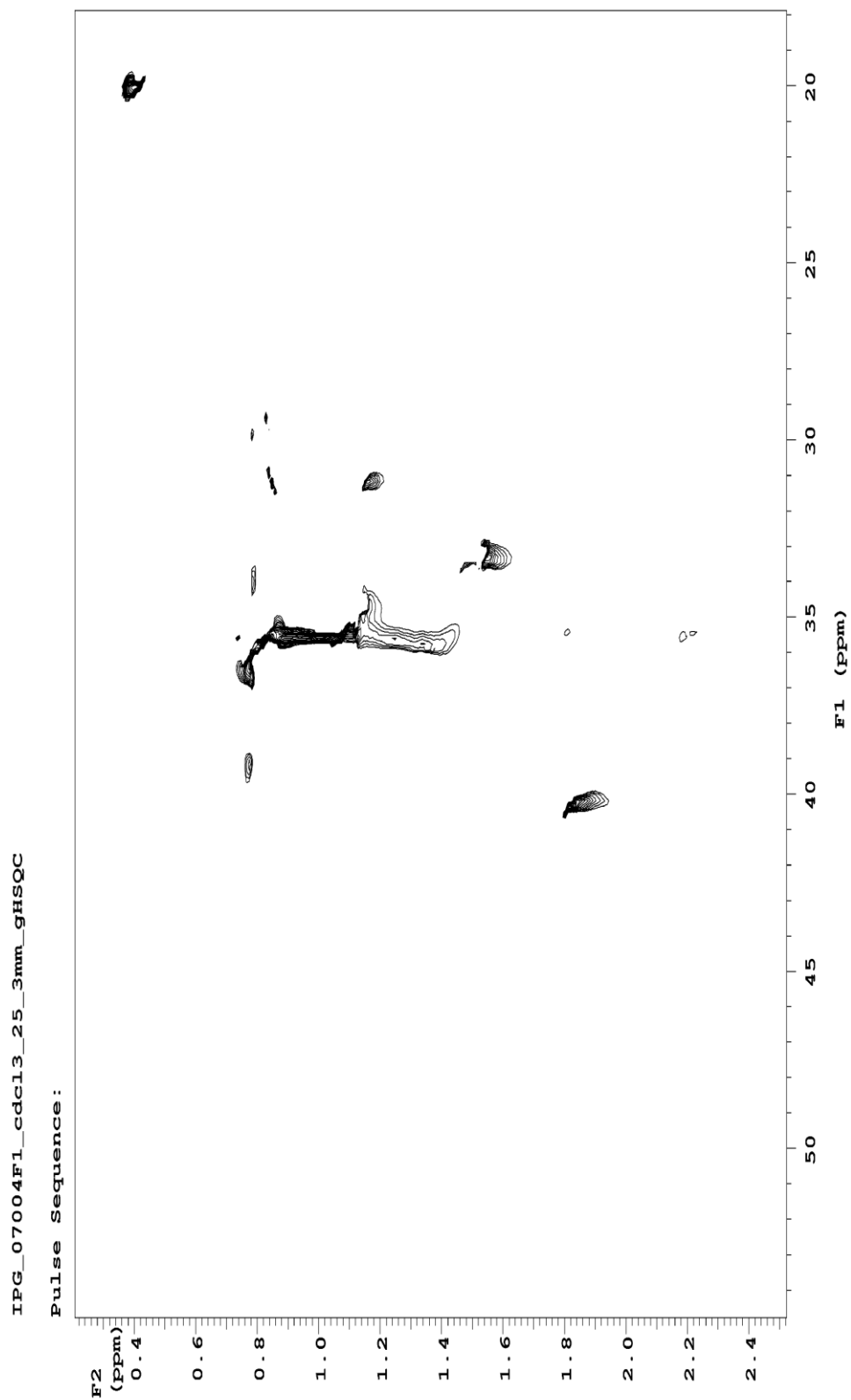
Espectro 5. Espectro de RMN ^1H ampliado (0,8-5,4) ppm, para EH1.



Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C ampliado (12.0- 37.4) ppm, para EH1.



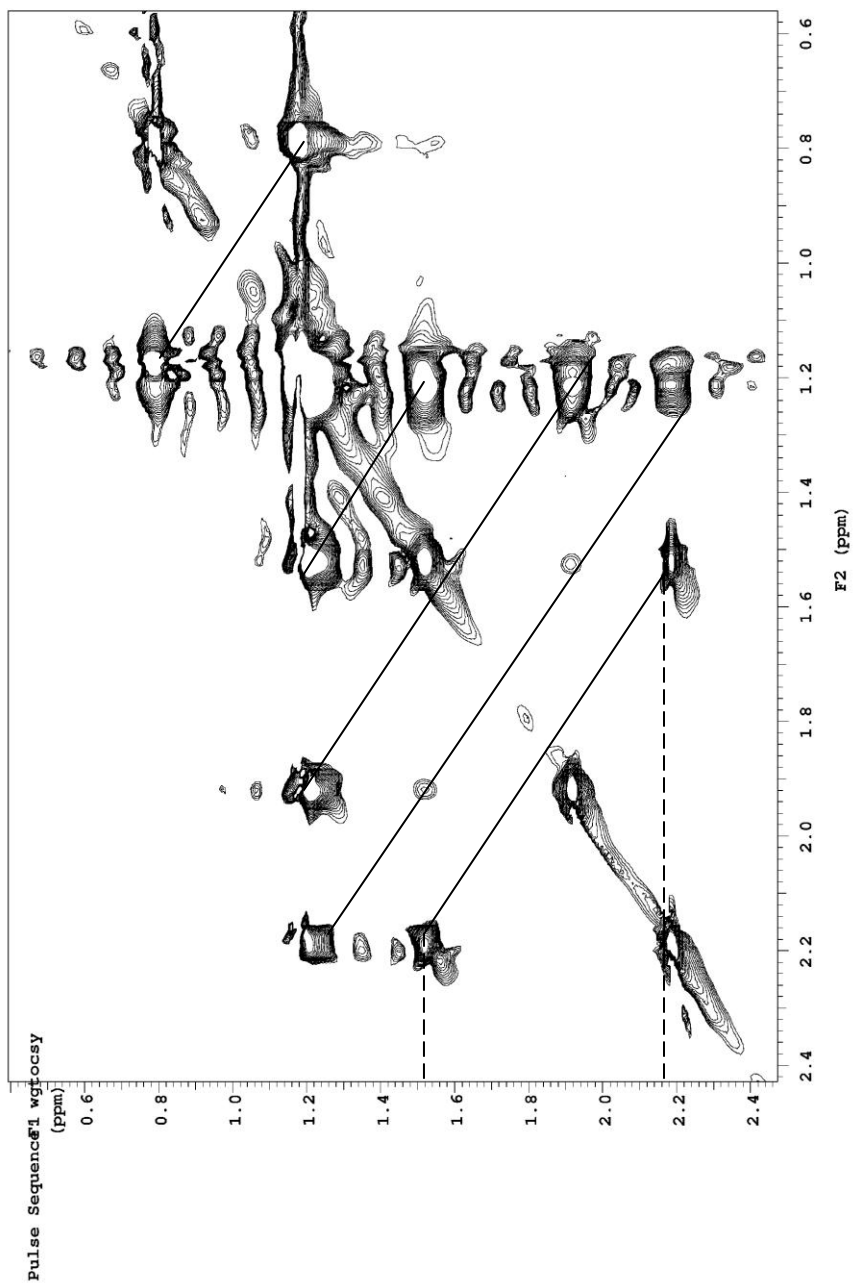
Espectro 10. Espectro DEPT de RMN ¹³C ampliado (10- 45) ppm, para EH1.



Espectro 18. Espectro de RMN HSQC ampliado ((18-54), (0.3-2.5)) ppm, para EH1.

IPG_07004F1_cdcl3_25_3mm_tocsy

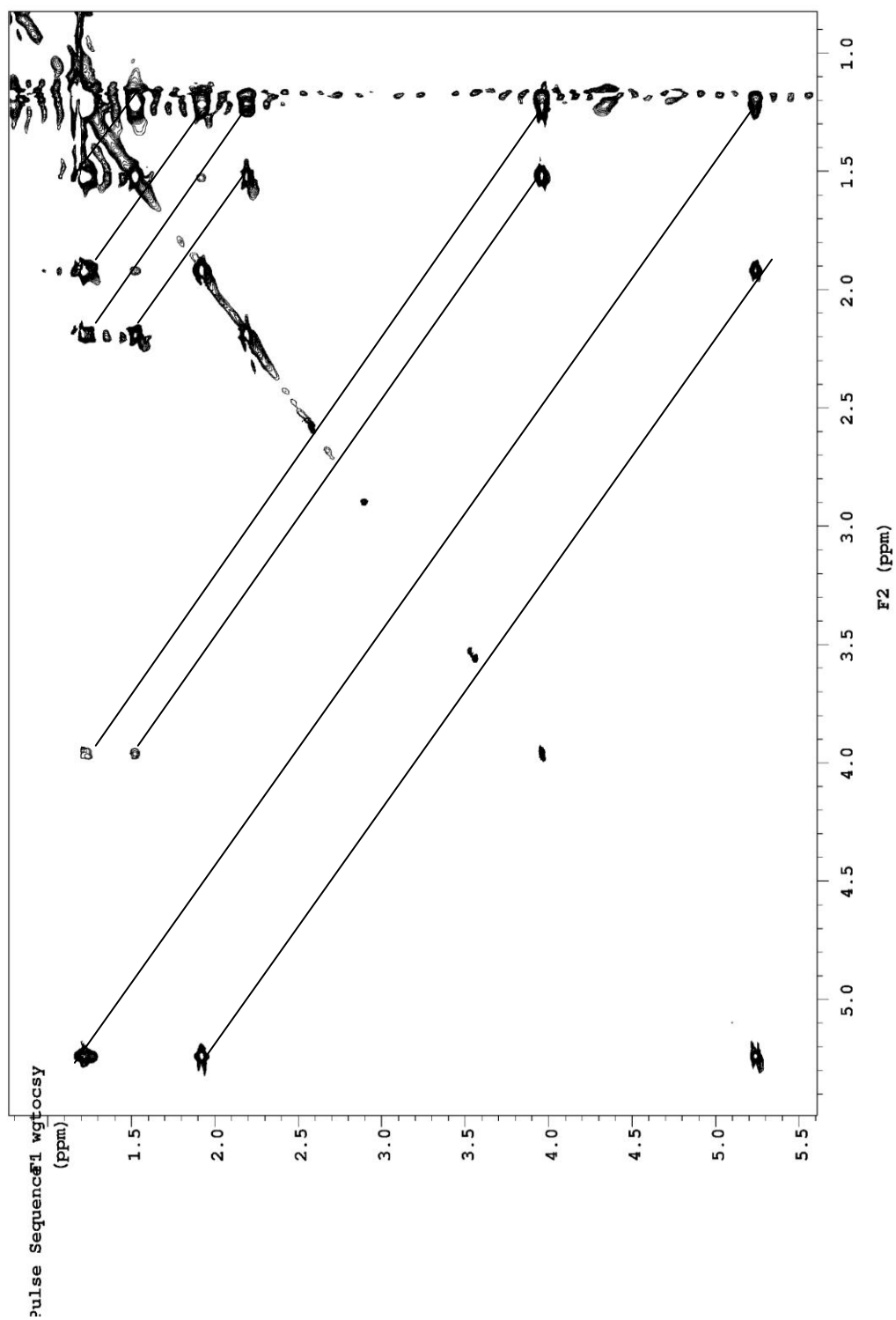
Sample directory:
File: PROTON



Espectro 20. Espectro de RMN TOCSY ampliado ((0.9- 2.4), (0.4- 2.4)) ppm, para EH1.

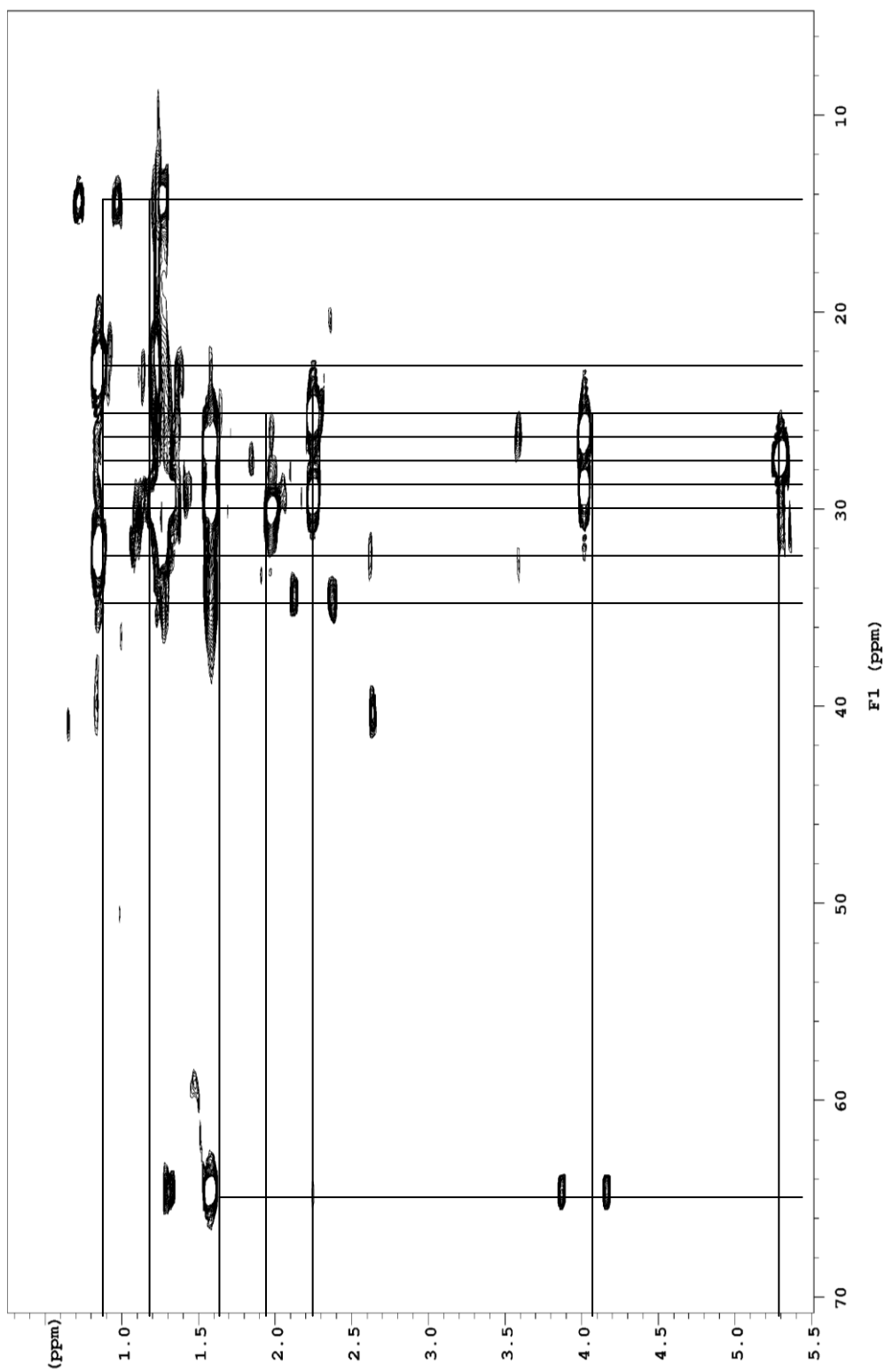
IPG_07004F1_cdcl3_25_3mm_tocsy

Sample directory:
File: PROTON

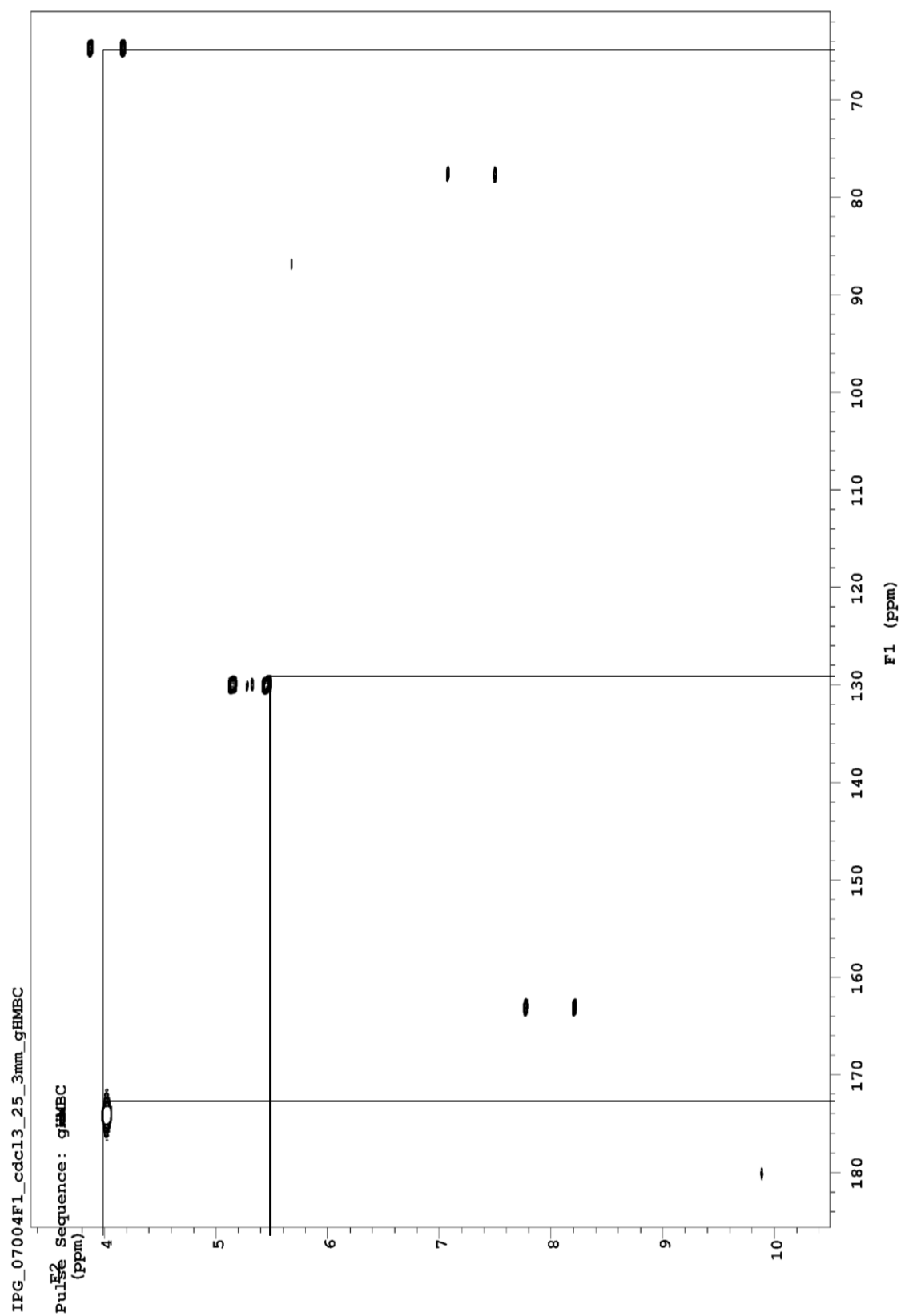


Espectro 21. Espectro de RMN TOCSY ampliado ((0.9- 5.4), (0.8- 5.5)) ppm, para EH1.

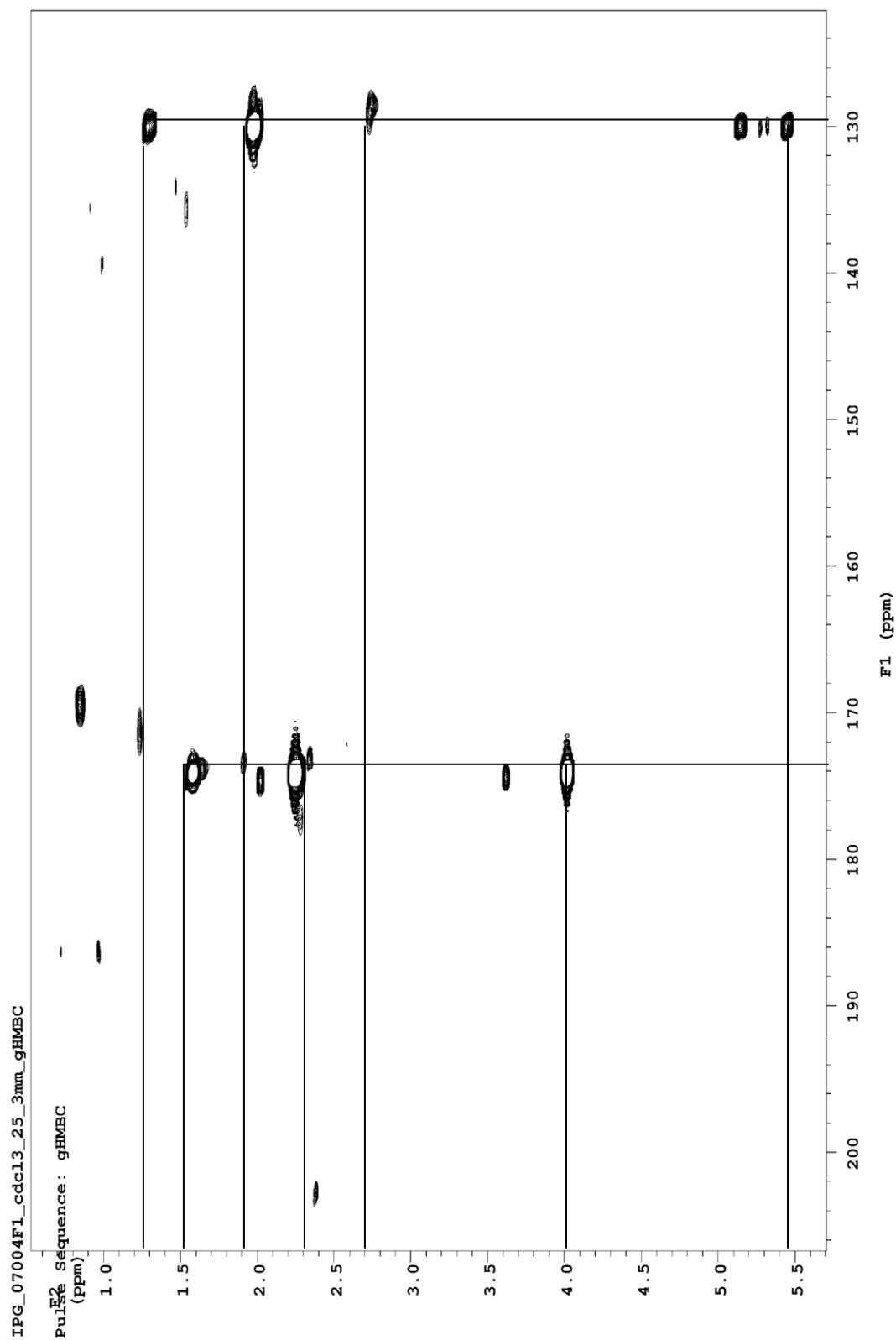
IPG_07004F1_cdcl3_25_3mm_gHMBC
PulF2 Sequence: gHMBC



Espectro 23. Espectro de RMN HMBC ampliado ((6- 70), (0.3- 5.5)) ppm, para EH1.



Espectro 24. Espectro de RMN HMBC ampliado ((62- 184), (3.4- 10.4)) ppm, para EH1.



Espectro 25. Espectro de RMN HMBC ampliado ((124- 206), (0.6- 5.7)) ppm, para EH1.

V.6. AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a Dios, porque en él encontré la fe necesaria para transitar con éxito por los caminos y las situaciones que se han presentado a lo largo de mi vida hasta ahora.

A mis padres, Yolanda M. Vargas de Martínez y Jesús R. Martínez, por inculcarme valores y apoyar las decisiones que he tomado hasta ahora, gracias a ustedes soy una profesional. A mis hermanos Harrison, Jana y Yessika Martínez por ayudarme a adquirir el carácter y el valor que tengo hoy día. A mi tía Hilde Vargas y mis primas lindas Laura y Lauribel, por ser como una mamá y unas hermanitas para mí. A mis queridos sobrinos, María Daniela, Yackson, Jesús Daniel, Stephany y el pequeño Vladimir, por quererme tanto como los quiero yo y hacerme vivir sus aventuras de niños.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela, máxima casa de estudios del país, por ser mi casa, sin restricciones de tiempo. Aquí se desarrolló mi sueño.

Quiero agradecer a la Dra. Ivette Piña Gómez, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Química del Mar, por siempre escuchar y valorar mi opinión, además de hacer que la investigación se realizase de la mejor manera posible. Gracias por la amistad que me ha brindado, espero retribuirla de la misma manera.

A mis jurados, Dra. María Antonieta Ranaudo y Dra. María Luisa Serrano, quienes asumieron un rol crítico y objetivo ante la propuesta, el desarrollo y la culminación de esta investigación.

A los profesores que me acompañaron durante mi historia como preparadora del Laboratorio fusionado II de Química Orgánica, Dr. Masahisa Hasegawa, Dr. Gustavo Cabrera, Dra. María Lupe Márquez y Lic. Mariana Graterol.

A la Prof. Nancy Prieto por reforzar mi interés en la química, por sus sabios consejos que siempre llevaré conmigo.

A la Dra. Sheila Márquez Pauls, por su participación como pieza clave para la identificación del coral objeto de estudio en este Trabajo Especial de Grado, y por aclarar muchas dudas que se presentaron en el inicio de la investigación.

A la Lic. Sandra Duque, por la realización de los ensayos biológicos. Por siempre mostrar disposición a mejorar las cosas a su alrededor, tocando los corazones de muchas personas y cambiando sus vidas siempre para mejor, gracias por adoptarme como tu hija y estar allí siempre para aconsejarme y apoyarme en mis decisiones, Merci beaucoup.

Al Dr. Freddy González-Mujica, por dirigir la realización de parte de los ensayos de actividad biológica y por estar pendiente del desarrollo general del estudio.

A mis amigos, María Gabriela Contreras, Lusmery Fernández, Yesimar González y Jesús Eduardo Hernández por formar parte de mi vida, por apoyarme en momentos de felicidad y en los momentos más tristes que he tenido que afrontar, siempre han estado allí conmigo y espero seguir contando con ustedes por mucho tiempo más.

A mis amigos, Oscar Escobar, Raymundo Arú, Clarimar Camacho, Anabel Espinoza, Clara Palma, Vanesa Duarte, Henry Wuyke, Nairobi Pescador, Sergio

Salazar, Gonzalo Valdivieso, Yorbin González, Williams Colina, Lourdes Moreira, Ysbeth Galindez, Roberto Morillo, Mariana Graterol, Rohonald Lorenzo, Narlha Muñoz, Wilmer Mejias, Gabriel Hernández, Freddy Hernández, Eliécer Marrero, Kattyan Suárez, Daniela Velazco, Juan Pablo Murillo, Mercedes Rosales, Mery Pereira, Manuel Franco, Ulimer Paredes, Luis Daniel Ávila, Diana Pachón, Luisa Aristimuño, Arquímedes González, Yarot Avendaño, entre muchos otros que pasaron por mi vida llenándola de alegría, colocando una sonrisa en mi rostro y haciendo que mis días en la Universidad estuvieran llenos de momentos agradables, esos que siempre recordaré con nostalgia y cariño. Espero contar con ustedes por mucho tiempo. Siempre estarán en mi corazón, los apreciaré y querré mucho.

Con esta página se cierra el capítulo de un etapa más en mi vida, pero a la vez se abre otro nuevo en el cual trataré de alcanzar nuevas metas pero siempre manteniendo las ganas de hacer algo bueno por la gente. Ya no seré bachiller sino Licenciada en Química, pero nunca dejaré que eso defina quien soy. Una vez más gracias a todos por ser parte de mí.

Yusbeyka Massiel Martínez Vargas.