



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio de bioprospección de octocorales de los géneros  
*Eunicea* y *Plexaura* del caribe colombiano, como fuente  
de metabolitos con actividad antiinflamatoria**

**Luis Eduardo Reina Gamba**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2011

# **Estudio de bioprospección de octocorales de los géneros *Eunicea* y *Plexaura* del caribe colombiano, como fuente de metabolitos con actividad antiinflamatoria**

**Luis Eduardo Reina Gamba**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Química**

Director:

Químico, M.Sc., Ph.D. Freddy Alejandro Ramos R.

Asesor:

Químico Farmacéutico, Ph.D. Luis Fernando Ospina G.

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2011

*Dedicado especialmente a mis padres y a mis hermanas, artífices de todo esto,  
y a todos aquellos que equilibran la balanza con esfuerzo y tenacidad, aquellos que no se dejan  
vencer ante nada ni ante nadie.*

***"Lo imposible es el fantasma de los tímidos y el refugio de los cobardes".***  
***Napoleón***

# Agradecimientos

A Dios, por quien todo es posible...

A mis padres y hermanas por ser el motor de todo esto, nada de lo cual hubiese sido posible sin ellos.

A moni por su amor, su enorme apoyo y comprensión, por acompañarme e iluminar esta senda.

A los profes Freddy Alejandro Ramos y Leonardo Castellanos...*mis padres en la ciencia*, por la confianza, la exigencia, la orientación y la formación.

A todos los integrantes del grupo de investigación "Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia" por su ayuda en acción y/u omisión.

A Diani por su extraordinaria colaboración, Jairo, Jose, Hebelín, Katavalde, Chuni por su compañía, ayuda y consejos.

A Charles, los Juan Carlos, Cesar, Angie Vivieth y CÍA., por el oxígeno que permitió la vida en este tiempo, por el polo a tierra.

A quienes de algún modo contribuyeron a la realización de este trabajo y por olvido omito.

A Colciencias por la financiación del proyecto: "Bioprospección de octocorales del Caribe Colombiano. Fase II. Familias Plexauridae y Anthothelidae". Proyecto Código: 1101-521-28468 (Contrato 321-2011), que permitió mi subsistencia el último semestre.

A la Universidad Nacional de Colombia y el programa de apoyo a estudiantes de Maestría como Auxiliares de Docencia.

A los profesores Luis Fernando Ospina y Marcela Aragón del Departamento de Farmacia, por la orientación, apoyo y disposición de los laboratorios en los ensayos de actividad antiinflamatoria.

A la Dra. Magnolia Vanegas del FIDIC por los espectros de DC.

A los profesores Luz Mary Salazar, Ivonne Nieto y Wilman Delgado, de los cuales fui auxiliar docente.

Al lab. de macromoléculas por permitirme sus instalaciones para llevar a cabo algunas de las reacciones llevadas a cabo en este trabajo.

## Resumen

La evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*, mediante el ensayo de edema auricular inducido por TPA, de los extractos de ocho especies de octocorales pertenecientes al género *Eunicea* y dos pertenecientes al género *Plexaura* recolectadas en el Caribe Colombiano, permitió identificar a los extractos de *E. fusca* y *P. homomalla* como fuente de compuestos antiinflamatorios por su alta actividad en dicho ensayo. A partir del estudio químico de *E. fusca* se logró obtener un nuevo compuesto denominado fuscósido E, junto con el fuscósido B, el fuscol, el (+)-germacreno D y una mezcla de cuatro esteroides. Del extracto de *P. homomalla* se aislaron las prostaglandinas (15*R*)-PGA<sub>2</sub>, (15*R*)-PGA<sub>2</sub> Me, (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub>, (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub> Me y (15*R*)-PGE<sub>2</sub>. La elucidación estructural de estos compuestos se llevó a cabo por estudios de RMN 1D y 2D. La configuración absoluta de todos los compuestos aislados fue determinada mediante métodos quiropticos y derivatización química. Los fuscósidos E y B, junto con las (15*R*)-PGA<sub>2</sub> y (15*R*)-PGE<sub>2</sub> presentaron, respectivamente, la mayor inhibición de la inflamación la cual fue comparable con la presentada por la indometacina, fármaco de referencia usado como control positivo, en el ensayo inicialmente mencionado.

**Palabras clave:** *Eunicea fusca*, *Plexaura homomalla*, fuscósidos, prostaglandinas, actividad antiinflamatoria.

## Abstract

The screening for *in vivo* anti-inflammatory activity, by testing in the TPA-induced ear edema model, of the extracts of eight octocoral species belonging to the genus *Eunicea* and two belonging to *Plexaura* genus collected from the Colombian Caribbean Sea resulted in the identification of *E. fusca* and *P. homomalla* extracts as a source of inflammatory compounds by its high activity in this test. From the chemical study of *E. fusca* a new compound named fuscocide E, together with fuscocide B, fuscol, (+)-germacrene D and a mixture of four sterols were isolated. From the extract of *P. homomalla* the prostaglandins (15*R*)-PGA<sub>2</sub>, (15*R*)-PGA<sub>2</sub> Me, (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub>, (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub> Me and (15*R*)-PGE<sub>2</sub> were isolated. The structural elucidation of these compounds was carried out by 1D and 2D NMR analysis. The absolute configuration of all isolated compounds was determined by chiroptical methods and chemical derivatization. The fuscocide E and B, together with (15*R*)-PGA<sub>2</sub> and (15*R*)-PGE<sub>2</sub> showed, respectively, the stronger activity as inhibitors of the inflammation, comparable with that of the indomethacin, a drug used as reference and positive control in the above mentioned bioassay.

**Keywords:** *Eunicea fusca*, *Plexaura homomalla*, fuscocides, prostaglandins, anti-inflammatory activity.

## Contenido

	Pág.
Resumen	III
Lista de figuras	VI
Lista de tablas	VII
Lista de Símbolos y Figuras	VIII
Introducción	1
<b>1. Capítulo 1. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de Algunos Extractos de Octocorales de los Géneros <i>Eunicea</i> y <i>Plexaura</i></b>	<b>3</b>
1.1. Generalidades sobre el proceso inflamatorio	3
1.1.1. Inflamación	3
1.1.2. Proceso Inflamatorio	4
1.1.3. Inflamación Crónica	5
1.1.4. Agentes Inflamatorios	6
1.1.5. Búsqueda de Compuestos Antiinflamatorios y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria	7
1.1.6. Productos Naturales Marinos como Agentes Antiinflamatorios	8
1.1.7. Compuestos Antiinflamatorios Aislados de Octocorales	9
1.1.8. Géneros <i>Eunicea</i> y <i>Plexaura</i>	15
1.2. Resultados y Discusión	17
1.3. Metodología	19
1.3.1. Material Animal	19
1.3.2. Extracción de Octocorales	19
1.3.3. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de los Extractos	19
1.3.4. Análisis Estadístico	20
<b>2. Capítulo 2. <i>Eunicea fusca</i>: Aislamiento e Identificación de Compuestos y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria</b>	<b>21</b>
2.1. Generalidades	21
2.1.1. Descripción Morfológica	21
2.1.2. Estudios Químicos	21
2.1.3. Actividad Farmacológica de los Fuscósidos	22
2.2. Resultados y Discusión	23
2.2.1. Análisis Químico	23
2.2.2. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria	31
2.3. Metodología	32
2.3.1. General	32
2.3.2. Material Animal	33

2.3.3. Extracción del octocoral <i>E. fusca</i>	33
2.3.4. Fraccionamiento del Extracto Total	34
2.3.5. Reacciones de Derivatización	34
2.3.6. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de los compuestos E1-E4	35
2.3.7. Datos espectroscópicos de los compuestos aislados	36
<b>3. Capítulo 3. <i>Plexaura homomalla</i>: Aislamiento e Identificación de Prostaglandinas y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria</b>	<b>37</b>
3.1. Generalidades	37
3.1.1. Descripción Morfológica	38
3.1.2. Estudios Químicos	39
3.1.3. Actividad Farmacológica de las Prostaglandinas	41
3.2. Resultados y Discusión	48
3.2.1. Análisis Químico	48
3.2.2. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria	61
3.3. Metodología	64
3.3.1. General	64
3.3.2. Material Animal	65
3.3.3. Extracción del octocoral <i>P. homomalla</i>	65
3.3.4. Fraccionamiento del Extracto Total	65
3.3.5. Reacciones de conversión y Derivatización	66
3.3.6. Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de los compuestos P1, P1a-P5	67
3.3.7. Datos espectroscópicos de los compuestos aislados y obtenidos	68
<b>Conclusiones</b>	<b>69</b>
<b>Producción Científica</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>72</b>
<b>Anexos</b>	<b>79</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.1.</b> Respuesta Inflamatoria Aguda	5
<b>Figura 1.2.</b> Algunos blancos terapéuticos de los compuestos con acción antiinflamatoria	7
<b>Figura 1.3.</b> Fotografías de <i>Eunicea</i> sp. y <i>Plexaura</i> sp	16
<b>Figura 1.4.</b> Porcentaje de inhibición de los extractos de los octocorales en el edema Auricular inducido por TPA	17
<b>Figura 2.1.</b> Fotografía de <i>Eunicea fusca</i>	21
<b>Figura 2.2.</b> Compuestos aislados del octocoral <i>Eunicea fusca</i>	22
<b>Figura 2.3.</b> Estructura plana y algunas correlaciones 2D-RMN para el compuesto E1	25
<b>Figura 2.4.</b> Algunas correlaciones NOESY y configuración relativa para E1	26
<b>Figura 2.5. a.</b> Espectro de DC de E1b. <b>b.</b> Fuscósido E (E1)	26
<b>Figura 2.6.</b> Fuscol (E2), Fuscósido B (E3), peracetato del Fuscósido B (E3a)	29
<b>Figura 2.7.</b> (+)-Germacreno D (E4)	30
<b>Figura 2.8.</b> Esteroles (E5-E10) aislados de <i>E. fusca</i>	30
<b>Figura 2.9.</b> Actividad antiinflamatoria de los compuestos E1-E4 obtenidos de <i>E. fusca</i>	31
<b>Figura 2.10.</b> Diagrama de Aislamiento de <i>E. fusca</i>	35
<b>Figura 3.1.</b> Fotografía de <i>P. homomalla</i>	38
<b>Figura 3.2.</b> Estructura plana y algunas correlaciones 2D-RMN para el compuesto P1	49
<b>Figura 3.3.</b> Estructura plana de los compuestos P2-P4	52
<b>Figura 3.4.</b> Estructura plana de P5 (PGE <sub>2</sub> )	52
<b>Figura 3.5. a.</b> Algunas correlaciones NOESY y configuración relativa para P1. <b>b.</b> Curva de DC de P1	54
<b>Figura 3.6. a.</b> Valores $\Delta\delta$ (R-S) para los ésteres MPA de P2. <b>b.</b> PGB <sub>2</sub> (P1a). <b>c.</b> Curva de DC de PGB <sub>2</sub> (P1a)	55
<b>Figura 3.7.</b> Reacciones de interconversión para la determinación absoluta de los compuestos P1-P5 aislados de <i>P. homomalla</i>	56
<b>Figura 3.8.</b> Compuestos P2-P4	57
<b>Figura 3.9.</b> PGE <sub>2</sub> (P5)	57
<b>Figura 3.10.</b> PGB <sub>2</sub> (P1a)	58
<b>Figura 3.11.</b> Compuestos P1b y P3a	59
<b>Figura 3.12.</b> Actividad antiinflamatoria de los compuestos P1, P1a-P5 obtenidos de <i>P. homomalla</i>	61
<b>Figura 3.13.</b> Diagrama de Aislamiento de <i>P. homomalla</i>	67



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.1.</b> Compuestos de origen marino y algunos derivados con actividad antiinflamatoria	8
<b>Tabla 1.2.</b> Compuestos aislados de corales y algunos análogos con actividad antiinflamatoria	14
<b>Tabla 2.1.</b> Desplazamientos en RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) y - <sup>13</sup> C (100 MHz) para E1 y E1a, en CDCl <sub>3</sub> ; δ en ppm, J en Hz	24
<b>Tabla 2.2.</b> Desplazamientos en RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) y - <sup>13</sup> C (100 MHz) para E2, E3 y E3a en CDCl <sub>3</sub> ; δ en ppm, J en Hz	28
<b>Tabla 2.3.</b> Desplazamientos en RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) y - <sup>13</sup> C (100 MHz) para E4 y reportados para el (+)-germacreno D, en CDCl <sub>3</sub> ; δ en ppm, J en Hz	29
<b>Tabla 2.4.</b> Efectos de los compuestos aislados de <i>E. Fusca</i> sobre el edema auricular inducido por TPA	31
<b>Tabla 3.1.</b> Eicosanoides aislados de <i>P. homomalla</i> y algunos derivados hemisintéticos	40
<b>Tabla 3.2.</b> Fármacos basados en prostaglandinas	42
<b>Tabla 3.3.</b> Algunos derivados hemisintéticos de prostaglandinas	44
<b>Tabla 3.4.</b> Prostaglandinas con actividad antiinflamatoria	47
<b>Tabla 3.5.</b> Desplazamientos en RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) y - <sup>13</sup> C (100 MHz) para P1, P2 y P3 en CDCl <sub>3</sub> ; δ en ppm, J en Hz	51
<b>Tabla 3.6.</b> Desplazamientos en RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) y - <sup>13</sup> C (100 MHz) para P4 y P5 en CDCl <sub>3</sub> ; δ en ppm, J en Hz	53
<b>Tabla 3.7.</b> Desplazamientos en RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) y - <sup>13</sup> C (100 MHz) para P1a, P1b y P3a en CDCl <sub>3</sub> ; δ en ppm, J en Hz	60
<b>Tabla 3.8.</b> Efectos de los compuestos aislados de <i>P. homomalla</i> sobre el edema auricular inducido por TPA	62

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas y Acrónimos

<i>Símbolo</i>	<i>Término</i>
$[\alpha]_D$	Rotación óptica
<i>Ac</i>	Acetilo
<i>AcOEt</i>	Acetato de etilo
<i>CC</i>	Cromatografía en columna
<i>CCD</i>	Cromatografía en capa delgada
<i>CGAR</i>	Cromatografía de gases de alta resolución
<i>CLAE</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<i>COSY</i>	Correlation Spectroscopy
<i>D</i>	Doblete
<i>d.i.</i>	Diámetro interno
<i>Dd</i>	Doble doblete
<i>DCC</i>	Diciclohexilcarbodimida
<i>DEPT</i>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<i>DMAP</i>	Dimetilaminopiridina
<i>DHU</i>	Diciclohexilúrea
<i>Dt</i>	Doble triplete
<i>EM</i>	Espectrometría de masas
<i>ESI</i>	Ionización por Electrospray
<i>HMBC</i>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<i>HMQC</i>	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
<i>HSQC</i>	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
<i>Hz</i>	Hertz
<i>IE</i>	Ionización electrónica
<i>IL</i>	Interleucina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>LPS</i>	Lipopolisacárido
<i>HRESIMS</i>	High Resolution electrospray mass spectry
<i>M</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
<i>Me</i>	Metilo
<i>MeOH</i>	Metanol
<i>MPO</i>	Mieloperoxidasa
<i>MPA</i>	Ácido metoxifenilacético
<i>NOE</i>	Efecto nuclear Overhauser
<i>PNMs</i>	Polimorfonucleares
<i>PG</i>	Prostaglandina
<i>s</i>	Singlete
<i>t</i>	Triplete

---

<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>TPA</i>	Tetradecanoilforbol acetato
<i>UV/Vis</i>	Ultravioleta visible
$\Delta$	Desplazamiento (RMN)
$\lambda$	Longitud de onda

---



## Introducción

La inflamación es un proceso natural del cuerpo que se produce con el fin de eliminar estímulos que comprometen el funcionamiento del organismo, ésta respuesta es generada por traumatismos o por agentes nocivos de tipo químico, físico o microbiológico, la cual incluye reacciones nerviosas, vasculares, humorales y celulares dentro del sitio lesionado, que se caracterizan por generar una rápida alteración en los niveles de varias proteínas plasmáticas [1, 2]. Esta respuesta puede ser local o sistémica y se produce para brindar una rápida protección limitando el daño al sitio de la agresión mientras se destruye o inactiva el agente proinflamatorio [3]. El proceso inflamatorio puede ser agudo o crónico, el primero es de corta duración y se presenta en dos fases, una temprana caracterizada por la producción de mediadores como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, factor activador de plaquetas (PAF), proteínas plasmáticas, y una fase tardía relacionada con la infiltración de neutrófilos y producción de especies de oxígeno reactivas (EOR) [4]. La inflamación crónica en cambio es permanente o recurrente y se encuentra asociada al influjo de macrófagos, agranulocitos, eosinófilos, basófilos, y de mayor cantidad de neutrófilos con la respectiva producción y liberación de mediadores moleculares [5], contribuyendo al daño tisular y generando una condición patológica que se encuentra relacionada con numerosas enfermedades como el asma crónica, esclerosis múltiple, arterioesclerosis múltiple, psoriasis, artritis, reumatismo y otras enfermedades autoinmunes, que afectan a gran parte de la población en el mundo. Además, la hipótesis que vinculaba la inflamación crónica con el desarrollo del cáncer ha sido soportada mediante estudios clínicos y es ahora globalmente aceptada, pues se ha estimado que las infecciones y las reacciones inflamatorias están vinculadas a un 15 – 20% de todas las muertes por cáncer, esto sin tener en cuenta que hay muchos aspectos del complejo inflamatorio que permanecen desconocidos como también su incidencia en las diferentes enfermedades con las que se encuentra vinculado [5, 6].

Dado que el proceso de la respuesta inflamatoria es complejo resulta imposible pensar en un compuesto que actúe deteniendo todos los efectos perjudiciales de la inflamación, ya que cada enfermedad presenta características propias e integradas por múltiples factores, cada uno de los cuales se convierte en el objetivo de los diferentes agentes antiinflamatorios, entre los que se encuentran aquellos de tipo biológico, los corticosteroides y los AINES (antiinflamatorios no

esteroidales) que tienen el inconveniente de generar graves efectos secundarios en los pacientes tratados. Además, el uso de éstos últimos está limitado a ciertos episodios inflamatorios y su uso está restringido en pacientes con patologías características (anticoagulados, rinitis, asma, úlcera, etc.) [7]. Este panorama ha hecho que la búsqueda de compuestos con la capacidad de presentar mejores efectos farmacológicos y de disminuir los efectos perjudiciales asociados a la inhibición de alguno de los mecanismos de la cascada inflamatoria, continúe en todo el mundo desde las diferentes áreas de la química medicinal, dentro de las cuales, los productos naturales se han caracterizado por ser la mayor fuente de compuestos con este tipo de actividad, además de actuar en diferentes puntos del proceso inflamatorio.

En lo que se refiere a los productos naturales marinos lo anterior se soporta en el hecho de que los organismos de origen marino como esponjas y octocorales han demostrado ser una fuente interesante de compuestos que se han caracterizado no solo por poseer estructuras novedosas sino también por presentar diversa y potente actividad biológica [8]. Esto ha abierto el panorama para su uso en el campo terapéutico, pues una variedad de estos compuestos se encuentran en estudios en fase clínica como antibacteriales, anticancer, antivirales, antihipertensivos, antifúngicos, antidiabéticos y antiinflamatorios, siendo esto último enfoque del presente trabajo. Esta diversidad de compuestos se atribuye a que estos organismos sésiles han desarrollado diversas estrategias para su supervivencia, entre las que se encuentra la producción de metabolitos que les permiten por ejemplo defenderse de depredadores, evitar ser colonizados, competir por espacio u obtener alimento, entre otros [9]. Todos estos son objetivos biológicos, por lo tanto no es de sorprender que los compuestos producidos por organismos marinos presenten actividad en especies terrestres.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la búsqueda de compuestos antiinflamatorios se abordó en el presente trabajo desde la perspectiva de los compuestos producidos por octocorales de los géneros *Eunicea* y *Plexaura*. En este sentido, un *screening* de varias especies de estos géneros, permitió detectar varios octocorales con actividad antiinflamatoria promisoria. Posteriormente, el estudio químico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los metabolitos obtenidos de los octocorales *E. fusca* y *P. homomalla*, los más activos, permitió determinar a los fuscósidos y las prostaglandinas, producidos por ellos respectivamente, como compuestos con fuerte actividad antiinflamatoria. De esta manera se comprobó el gran potencial de esta clase de organismos, que se encuentran ampliamente distribuidos en las costas del mar Caribe Colombiano, como fuente de compuestos antiinflamatorios, con lo que se contribuye de manera significativa a los estudios de bioprospección de los octocorales del Caribe Colombiano como fuente de metabolitos con actividad antiinflamatoria, objetivo de este trabajo, proporcionando así no solo una fuente de compuestos que pueden servir para la investigación de nuevas dianas del proceso inflamatorio sino también el inicio del desarrollo de compuestos con real potencial terapéutico, generando así un valor agregado a la fauna marina del país, la cual en términos generales ha sido poco estudiada.

## Capítulo 1.

# Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de Algunos Extractos de Octocorales de los Géneros *Eunicea* y *Plexaura*

## 1.1 GENERALIDADES SOBRE EL PROCESO INFLAMATORIO

### 1.1.1 Inflamación

La inflamación se puede definir como la respuesta fisiológica del tejido vivo vascularizado frente a una agresión tisular, este mecanismo de respuesta es complejo y se desencadena por diversos estímulos causados por agentes microbiológicos como la presencia bacterias, virus, parásitos, hongos; agentes físicos como radiaciones, calor; agentes químicos como venenos; traumatismos, la presencia de cuerpos extraños, alteraciones vasculares como la isquemia, o alteraciones inmunitarias como la hipersensibilidad [1, 2]. Estos estímulos generan una respuesta inflamatoria que tiene tres componentes principales: El primero de ellos se refiere a los cambios hemodinámicos secuenciales en el flujo y el calibre de los conductos sanguíneos, que se caracterizan por una constricción arteriolar transitoria (se presenta a los pocos segundos de sufrir el estímulo), posterior vasodilatación mediada por PGE<sub>2</sub>, histamina/serotonina y producción de óxido nítrico (minutos a días), aumento del flujo sanguíneo por las arteriolas, y la apertura de nuevos lechos capilares y venulares en la zona afectada; el segundo componente es el incremento de la permeabilidad vascular, que se da por la contracción reversible de las células endoteliales la cual es ocasionada por acción de mediadores como histamina, bradiquinina y leucotrienos. Adicionalmente, este aumento de la permeabilidad se da por el incremento en la

transcitosis, proceso entendido como el transporte de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro a través del citoplasma de una célula; en el tercer componente se encuentran las modificaciones leucocitarias que incluyen la extravasación (rolling, activación, adhesión y migración transendotelial) de las células hematopoyéticas (neutrófilos, linfocitos, basófilos, entre otras), quimiotaxis, conglomeración y fagocitosis [10]. De esta manera una amplia gama de reacciones que incluyen la interacción de diversas células inflamatorias y diferentes mediadores químicos generan la respuesta inflamatoria, que es entendida como un proceso secuencial que se da en pro de eliminar el estímulo inflamatorio.

### 1.1.2 Proceso Inflamatorio

Una vez se ha dado el daño tisular, los sistemas de proteínas plasmáticas, quinina, de coagulación, fibrinolítico y de complemento son activados, los tres primeros mediante la activación del factor Hageman, induciendo vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular. Además los macrófagos activados por las proteínas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y algunas quimioquinas comienzan su acción fagocítica y liberación de las citoquinas IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  induciendo coagulación, incremento en la permeabilidad vascular y la producción de quimioquinas, leucotrienos y prostaglandinas, principalmente PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  [1]. Simultáneamente y por acción de las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a (proteínas del sistema de complemento) los mastocitos liberan histamina, otras prostaglandinas como PGD<sub>2</sub> y leucotrienos; todo este conjunto provoca entre otras reacciones que los macrófagos previamente sésiles se desprendan de sus ligaduras y se aglomeren en la fuente del estímulo. Al mismo tiempo, grandes cantidades de neutrófilos, que son los leucocitos predominantes en la respuesta inflamatoria, empiezan a invadir el área inflamada desde el torrente sanguíneo en un proceso que dura aproximadamente una hora [1-4]. Esto se logra mediante un proceso denominado extravasación que inicia por el incremento en la expresión de las moléculas de adhesión celular (CAMs-por sus siglas en inglés *cell adhesion molecules*-) en las células endoteliales y en los neutrófilos, permitiendo de ésta manera que éstos últimos “rueden” sobre las células endoteliales en dirección del flujo sanguíneo. Durante este lapso algunas quimioquinas (IL-8) actúan sobre la proteína-G de los neutrófilos induciendo el cambio conformacional de las CAMs, lo que genera la adhesión y posterior migración transendotelial. De esta manera los neutrófilos y posteriormente de manera similar los linfocitos y otros leucocitos logran atravesar el endotelio para llegar hasta el sitio exacto donde se produjo el estímulo que desencadenó la respuesta inflamatoria [1, 2].

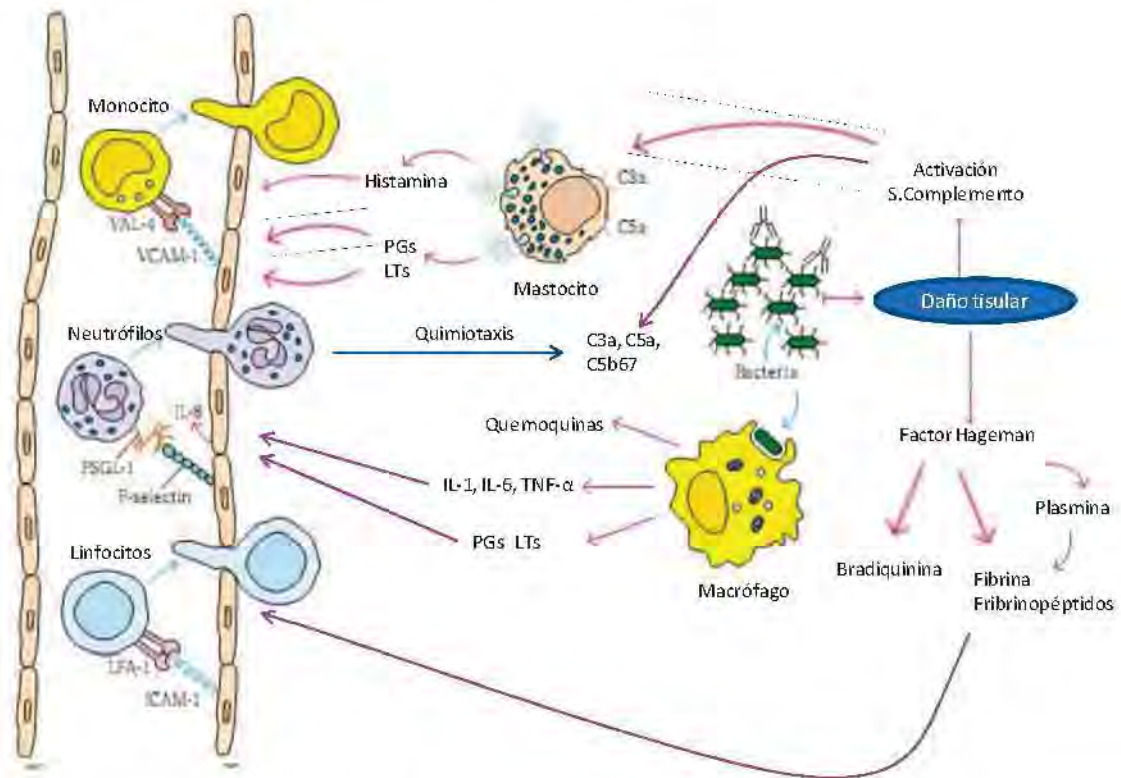
Una vez en el tejido, los neutrófilos incrementan la cantidad de receptores para ciertos antígenos y quimioatrayentes como quimioquinas, productos del sistema de complemento (C3a, C5a, C5b67), fibrinopéptidos, prostaglandinas y leucotrienos [1, 11], con lo que aumentan su tasa fagocítica y estimulan la liberación de enzimas proteolíticas como mieloperoxidasas –MPOs-, elastasas, colagenasas, fosfolipasas [11, 12] y de especies reactivas de oxígeno [1] (EOR) y de nitrógeno (ENR) [13, 14]. No obstante estos productos cuando se producen en exceso pueden contribuir al daño tisular [1, 15].

El proceso continúa con la neutrofilia, que es el aumento de neutrófilos en la sangre, y es consecuencia de la presencia de los mediadores moleculares serotonina e histamina que entran en el torrente sanguíneo y se transportan a la médula ósea, en donde actúan sobre los capilares



de la médula y sobre neutrófilos almacenados para que estos se movilicen de inmediato al torrente sanguíneo, lo que pone a disposición del área inflamada mas neutrófilos [3, 16].

Las citoquinas liberadas en el proceso inflamatorio facilitan la extravasación de este tipo de células junto con eosinófilos, basófilos y monocitos (los cuales invaden el área inflamada más lentamente que los neutrófilos) cuya concentración aumenta como consecuencia de la estimulación que sufren las células madre comprometidas (granulocíticas y monocíticas), no obstante se requiere entre 3 y 4 días antes de que los monocitos y granulocitos recién formados puedan abandonar la médula. Si el estímulo proveniente de la zona inflamada no se detiene, la médula continúa la producción de estas células, sobre todo monocitos en grandes cantidades (50 veces más de lo normal) durante meses o años [3] (fig. 1.1).



**Figura 1.1.** Respuesta inflamatoria aguda (tomado y adaptado de [1]). C3a, C5a, C5b67: Proteínas del sistema de complemento. PGs: Prostaglandinas. LTs: Leucotrienos. IL-1, IL-6, IL-8: Interleucinas. TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa. VCAM, ICAM, PSGL-1, LFA-1: Moléculas de adhesión celular.

### 1.1.3 Inflamación Crónica

Cuando el estímulo que generó la respuesta inflamatoria persiste, ya sea por la capacidad de los patógenos para evadir el sistema inmune, por enfermedades que intervienen en su eliminación como neumonías y úlceras pépticas o por enfermedades del sistema inmune como por ejemplo el lupus, la cascada de eventos fisiológicos que trae consigo la inflamación continúa,

desembocando en un proceso patológico crónico que termina por contribuir al daño y al desgaste de los tejidos involucrados [1, 2].

La acumulación y activación de macrófagos son las principales características de la inflamación crónica; estos macrófagos liberan citoquinas, principalmente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que estimulan la proliferación de fibroblastos, la necrosis tisular, la hiperproducción de colágeno, la angiogénesis, la fibrosis y la formación de granulomas. Adicionalmente estas células liberan varias enzimas hidrolíticas y especies reactivas de oxígeno (EOR) y nitrógeno (ENR) que ocasionan graves daños a los tejidos circundantes [1, 2].

De esta manera la inflamación está implicada en enfermedades como el asma crónica [17], esclerosis múltiple, arterioesclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, artritis, reumatismo, colitis ulcerativa, enfermedad de Graves, diabetes mellitus, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de injerto contra el anfitrión (reacción que puede ocurrir en las personas que reciben trasplantes de órganos) y otras enfermedades autoinmunes que afectan a gran parte de la población en el mundo [6]. La artritis reumatoide por ejemplo afecta al 1% de la población mundial, siendo más prevalente en mujeres; la osteoartritis afecta al 9.6% de los hombres y al 18% de las mujeres de más de 60 años y se pronostica que para el 2020 sea la cuarta enfermedad causante de discapacidad [18].

Adicionalmente, la relación de la inflamación crónica con el desarrollo del cáncer ha sido soportada mediante estudios clínicos y se ha estimado que las infecciones y las reacciones inflamatorias están vinculadas a un 15 – 20% de todas las muertes por cáncer [19], esto sin tener en cuenta que hay muchos aspectos de la respuesta inflamatoria que permanecen desconocidos como también su incidencia en las diferentes enfermedades con las que se encuentra vinculado. De esta manera una aproximación al tratamiento de las enfermedades crónicas inflamatorias se puede dar mediante el control de alguno de los mecanismos de la respuesta inflamatoria sin alterar el normal desarrollo de esta respuesta fisiológica en la defensa del cuerpo contra agentes patológicos.

#### 1.1.4 Agentes Antiinflamatorios

La respuesta inflamatoria está compuesta por una amplia y compleja gama de reacciones que involucran diversas enzimas y mediadores químicos; cada componente de este proceso se convierte entonces en un posible objetivo para la acción farmacológica de compuestos antiinflamatorios. Dentro de estos objetivos se pueden resaltar los modelos que evalúan la inhibición de ciertas enzimas como las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>), y lipooxigenasas (5-LOX), además de receptores de citoquinas y quemoquinas, entre otros [20, 21] (Fig. 1.2).

De este modo para tratar los desordenes implicados en la inflamación se han usado principios activos biológicos como la  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ , proteína inhibitoria del factor de transcripción NF- $\kappa\text{B}$ , fármacos de síntesis como corticosteroides y antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Sin embargo, todos estos poseen graves efectos fisiológicos secundarios; los pacientes que han recibido terapias biológicas por ejemplo, adquieren mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiacas [22], los corticosteroides (hidrocortisona, betametasona, etc.) actúan en los primeros pasos de la

respuesta inflamatoria ocasionando graves efectos adversos tales como el hábito de Cushing (cara redondeada, boca estrecha, joroba supraclavicular, obesidad del tronco con las extremidades relativamente delgadas), hipertensión, hiperglicemia, debilidad muscular, aumento de la susceptibilidad a infecciones causado por la inmunosupresión, osteoporosis, glaucoma, trastornos psiquiátricos, detención del crecimiento, etc [7, 23]. Dentro de los AINES se encuentran al ácido acetil salicílico, el ibuprofeno, la indometacina, el acetaminofén, entre otros, los cuales pueden generar hepatotoxicidad y complicaciones asociadas a la inhibición de las dos isoformas de COX, específicamente COX-1, pues ésta regula la proliferación de las células y participa en la producción de las prostaglandinas que intervienen en procesos fisiológicos como la protección del epitelio gástrico y el mantenimiento del flujo renal, de este modo se presentan problemas como ulceración gastrointestinal, toxicidad renal y disfunción plaquetaria [24]. Además su uso está restringido en pacientes con patologías características (anticoagulados, rinitis, asma, úlcera, etc.) [7]. Esto pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos agentes antiinflamatorios que en primer lugar presenten menores efectos secundarios y en segundo lugar mejoren la eficacia de los que existen actualmente.

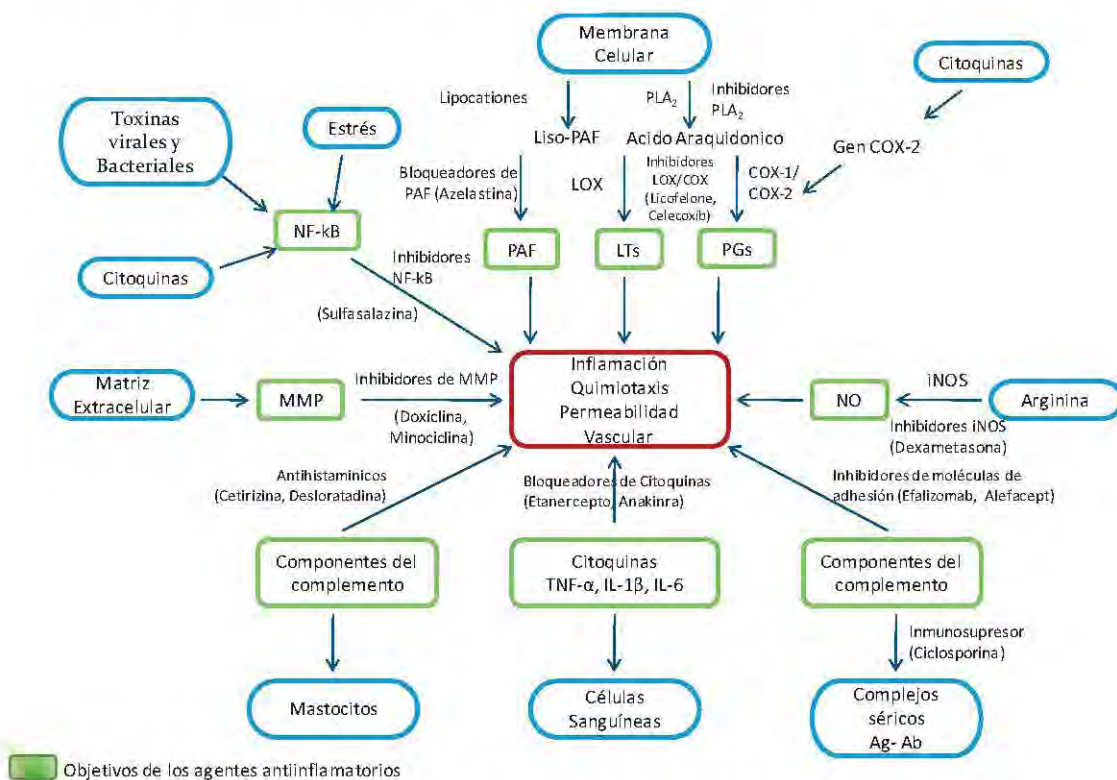


Figura 1.2. Algunos blancos terapéuticos de los compuestos con acción antiinflamatoria

### 1.1.5 Búsqueda de Compuestos Antiinflamatorios y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria

En la búsqueda de agentes antiinflamatorios el primer paso para evaluar una muestra es verificar que presente actividad antiinflamatoria, para lo que se han desarrollado modelos generales de *screening* que se realizan *in vivo* en ratones. Entre los más utilizados están el ensayo de edema

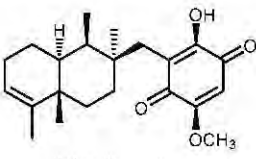
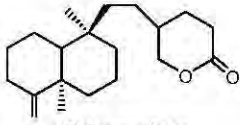
plantar inducido por carragenina y el ensayo de edema auricular inducido por TPA donde los ésteres de forbol (PMA -acetato de forbol miristato- y TPA -acetato de tetradecanoil forbol-) son usados como agentes inflamatorios [25]. Estos ensayos, que son efectuados en fase aguda, son empleados para extractos y fracciones ya que requieren cantidades pequeñas. Dependiendo de la disponibilidad de muestra los compuestos puros se pueden evaluar en los modelos antes mencionados con el fin de comprobar su actividad o bien se pueden evaluar en modelos *in vitro* que implican el uso de una cantidad de muestra del orden de los  $\mu\text{g}$ , además de ser sencillos y rápidos.

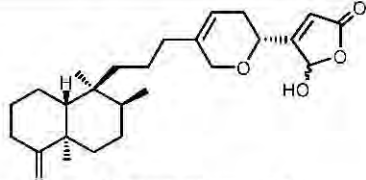

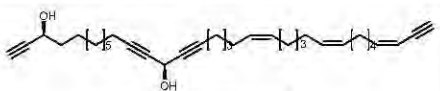
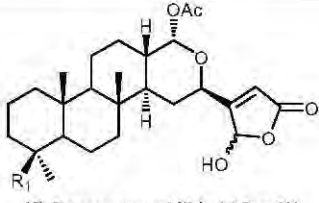
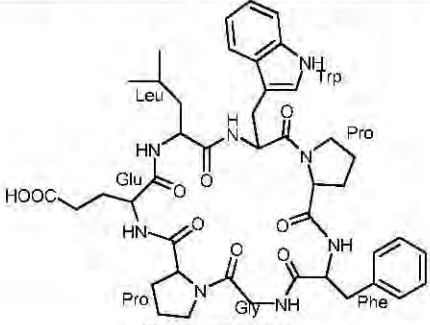
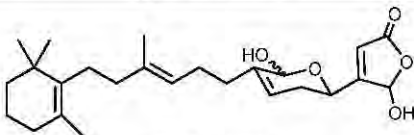
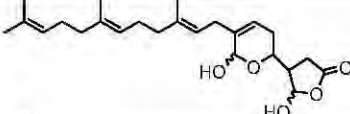
Una vez se ha comprobado la actividad, se evalúa la acción de las muestras frente a los mediadores moleculares de la inflamación, la cual se realiza mediante modelos específicos *in vitro*, que involucran la evaluación marcadores específicos de la presencia de neutrófilos como la actividad enzimática mieloperoxidasa, elastasa,  $\beta$ -glucuronidasa y lisozima [12, 26], de especies de oxígeno reactivas (EOR) [25] y nitrógeno (ENR) [14, 27], y de las enzimas fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ), ciclooxigenasas (COX) y lipoxigenasas (LOX) [25]. La evaluación de la actividad en estos ensayos se realiza mediante ensayos colorimétricos específicos que varían según los mediadores que se deseen evaluar [25].

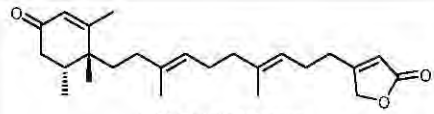
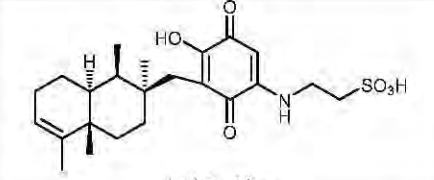
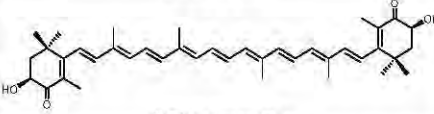

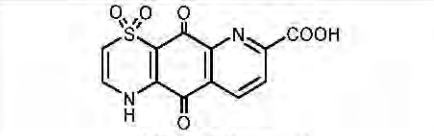
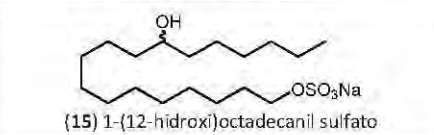
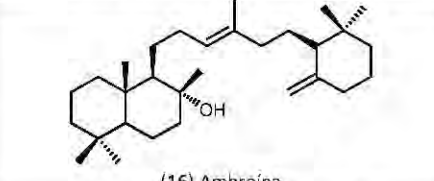

### 1.1.6 Productos Naturales Marinos como Agentes Antiinflamatorios

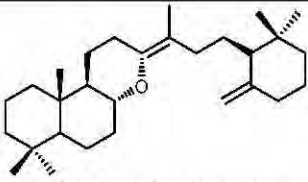
Aunque tradicionalmente las plantas han sido los organismos más ampliamente estudiados como fuente de compuestos con posible actividad antiinflamatoria [6], en las últimas décadas los productos naturales de origen marino han mostrado ser una fuente de compuestos cuya actividad antiinflamatoria ha mostrado ser comparable e incluso mejor que la presentada por fármacos de uso comercial. Dentro de los productos naturales marinos que poseen actividad antiinflamatoria y que han completado estudios preclínicos se encuentran la manoalida, las pseudopterosinas, la astaxantina, la bolinaquinona, el cavernólido, el cacospongionólido B, el cicloamflectano 2, la petrocortina A, los petrosaspongiólidos, la himenamida C, la escitonemina y la ciclointeinona (Tabla 1.1); algunos de estos compuestos no han superado las fases clínicas iniciales, otros han dado origen a análogos que continúan en estudios clínicos [28].

Tabla 1.1 Compuestos de origen marino y algunos derivados con actividad antiinflamatoria (Tomado y adaptado de [28])

Organismo/ Fuente	Compuesto	Actividad Farmacológica	M.A.M. <sup>a</sup>	Ref.
España <i>Dysidea sp.</i>	 (1) Bolinaquinona	Inhibición de iNOS, citoquinas y eicosanoides	Inhibición de sPLA <sub>2</sub> y 5-LOX	[29]
España <i>Fasciospongia cavernosa</i>	 (2) Cavernólido	Inhibición <i>in vitro</i> de TNF- $\alpha$ , NO y PGE <sub>2</sub>	Inhibición de sPLA <sub>2</sub> , iNOS y COX-2	[30]

Eponja	<i>Fasciospongia cavernosa</i>	 <p>(3) Cacospongionólido B</p>	NO, PGE <sub>2</sub> , TNF-α <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	Inhibición de NF-κB Aumento de IκB-α	[31]
Eponja	<i>Axinella</i> sp.	 <p>(4) Cicloamflectano 2</p>	Inhibición de NO	Inhibición de la vía de NF-κB	[32]
Eponja	<i>Petrosia</i> sp.	 <p>(5) Petrocortina A</p>	Inhibición de mediadores inflamatorios en macrófagos	Inhibición de NO y TNF-α	[33]
Eponja	<i>Petrosaspongia nigra</i>	 <p>(6) Petrosaspongiólido M R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub> Petrosaspongiólido N R<sub>1</sub>=CH<sub>2</sub>OAc</p>	Inhibición <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de NO, PGE <sub>2</sub> y TNF-α	Inhibición de Nuclear factor-κB y PLA <sub>2</sub>	[28]
Eponja	<i>Axinella carteri</i>	 <p>(7) Himenamida C</p>	Modulación de mediadores en neutrófilos y macrófagos	Inhibición de elastasa, PGE <sub>2</sub> y NO en neutrófilos y macrófagos	[34]
Eponja	<i>Luffariella variabilis</i>	 <p>(8) Manoalida</p>	Inhibición de mediadores inflamatorios	Inhibición de sPLA <sub>2</sub> , PLA <sub>2</sub> en líquido sinovial y PLA <sub>2</sub> en veneno de abeja	[35], [36], [37]
Derivado hemisintético		 <p>(9) Compuesto análogo de la Manoalida</p>	Inhibición de mediadores inflamatorios	Inhibición de PLA <sub>2</sub> en líquido sinovial y en veneno de abeja	[37]

Esponja	<i>Cacospongia linteiformis</i>	 (10) Ciclolinteína	Inhibición <i>in vitro</i> de NO y PGE <sub>2</sub>	Inhibición de la expresión de NF-κB, iNOS y COX-2	[38]
Esponja	Especies de <i>Dysidea</i>	 (11) Dysidina	Degranulación y producción de superóxido en leucocitos humanos Inhibición	Inhibición de sPLA <sub>2</sub>	[39]
Diversas especies marinas		 (12) Astaxantina	Inhibición de uveítis inducida por endotoxinas	Inhibición de NO, PGE <sub>2</sub> , TNF-α, IL-β e iNOS	[40], [41]
Cianobacterias marinas		 (13) Escitonemina	Inhibición del edema auricular inducido por TPA	Inhibición de rhPLK1 y rhPKCβ1	[42]
Ascidia	<i>Alpidium sp.</i>	 (14) Ascidiatiazona B	Inhibición de superóxido en neutrófilos	No determinado	[43]
Tunicado	Especímenes de la familia <i>Polyclinidae</i>	 (15) 1-(12-hidroxioctadecanil sulfato)	Inhibición de MMP-2	No determinado	[44]
Cachalote	<i>Physeter macrocephalus</i>	 (16) Ambreína	Liberación de elastasa en neutrófilos humanos	No determinado	[45]
Derivado hemisintético		 (17) Análogo de La Ambreína	Liberación de elastasa en neutrófilos humanos	No determinado	[45]

Derivado hemisintético	 <p>(18) Análogo de La Ambreina</p>	Liberación de elastasa en neutrófilos humanos	No determinado	[45]
------------------------	--	---	----------------	------

<sup>a</sup> Mecanismo de acción molecular

En modelos de inflamación aguda y crónica la bolinaquinona (**1**), un sesquiterpeno aislado de la esponja *Dysidea* sp., inhibió la liberación de citoquinas como TNF- $\alpha$ , la expresión de iNOS (en consecuencia la producción de NO), la generación de los eicosanoides leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (IC<sub>50</sub>=2.1  $\mu$ M) y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) a niveles más efectivos que la indometacina. Además, inhibió 5-LOX (IC<sub>50</sub>=1.3  $\mu$ M en comparación con el inhibidor selectivo de 5-LOX, ZM 230,487 con IC<sub>50</sub>=0.1  $\mu$ M) y la sPLA<sub>2</sub> del líquido sinovial humano en un nivel comparable con la manoalida [29] (Tabla 1.1).

A partir de la esponja *Fasciospongia cavernosa* se aislaron dos compuestos con actividad antiinflamatoria, el cavernólido (**2**) una C<sub>21</sub> terpenlactona, que mostró una potente inhibición de TNF- $\alpha$  (IC<sub>50</sub>=4.9  $\mu$ M en comparación con el control dexametasona de IC<sub>50</sub>=92.5 nM), NO (IC<sub>50</sub>=7.7  $\mu$ M en comparación con la dexametasona de IC<sub>50</sub>=120.5 nM), PGE<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub>=9.3  $\mu$ M en comparación con dexametasona IC<sub>50</sub>=8.7 nM) en pruebas *in vitro*. Esto como resultado de la inhibición de PLA<sub>2</sub> del líquido sinovial humano (IC<sub>50</sub>=8.8  $\mu$ M, en comparación con el control manoalida con un IC<sub>50</sub>=3.9  $\mu$ M, de iNOS, y de la expresión del gen que codifica para COX-2 en células intactas [30]. El segundo compuesto denominado cacospongionólido B (**3**) mostró inhibición de sPLA<sub>2</sub>, en modelos *in vivo* e *in vitro* (en macrófagos peritoneales de ratón) disminuyó la cantidad de NO, PGE<sub>2</sub> y TNF- $\alpha$ , así como la correspondiente expresión de sus genes. A nivel molecular inhibió la actividad del factor nuclear  $\kappa$ - de unión al DNA y aumentó la expresión de I $\kappa$ B- $\alpha$  (proteína inhibitoria del factor de transcripción NF- $\kappa$ B) [31] (Tabla 1.1).

De la esponja *Axinella* sp., se aisló el cicloamflectano 2 (**4**), el cual redujo la producción de NO (IC<sub>50</sub>= 0.1  $\mu$ M en comparación con el control dexametasona IC<sub>50</sub>= 0.02  $\mu$ M) y la liberación de elastasa (IC<sub>50</sub>= 3.2  $\mu$ M) sin afectar la liberación de TNF- $\alpha$ ; además, inhibió la vía del NF- $\kappa$ B, presentando actividad *in vivo* en neutrófilos humanos [32] (Tabla 1.1).

La petrocortina A (**5**) aislada de la esponja *Petrosia* sp. inhibió la liberación de TNF- $\alpha$  (IC<sub>50</sub>=2.35  $\mu$ M) y del NO proveniente de monocitos humanos con leucemia obtenidos de la línea celular U937, en un proceso que parece implicar la fosforilación de varias moléculas intracelulares de señalización [33] (Tabla 1.1).

El petrosaspongiólido M (**6**), un sesterterpeno aislado de la esponja *Petrosaspongia nigra* inhibió la producción de NO, PGE<sub>2</sub> y TNF- $\alpha$  de manera concomitante con NF- $\kappa$ B. Además, este compuesto inhibió la sPLA<sub>2</sub>, ya que mostró ser capaz de unirse de manera única y covalente al residuo amino terminal Ile-1 de esta enzima con un IC<sub>50</sub>=0.6  $\mu$ M. Los petrosaspongiólidos N-R que mostraron inhibición de PLA<sub>2</sub>, obtenida del veneno de abejas, comparten el mismo mecanismo y el mismo tipo de unión covalente a la fosfolipasa que presentó el petrosaspongiólido M [28] (Tabla 1.1).

La himenamida C (**7**) es un ciclopéptido aislado de la esponja *Axinella carteri* que inhibió, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , un 41.8% de la producción  $\text{PGE}_2$  y un 39.8% de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 activados con LPS; adicionalmente, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , causó la inhibición del 54.2% de la liberación de elastasa, en contraste con el 28.2% de inhibición que a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , produjo la ciclosporina, un ciclopéptido usado como estándar para la evaluación actividad inmunosupresiva. Estudios SAR de este compuesto indicaron un mecanismo de acción que no se basa en receptores (Tabla 1.1) [34].

La manoalida (**8**) un sesterterpeno aislado de la esponja *Luffariella variabilis* inhibió irreversiblemente  $\text{PLA}_2$  mediante la modificación de residuos de lisina ( $\text{sPLA}_2$   $\text{IC}_{50}=1.7 \mu\text{M}$ ,  $\text{PLA}_{2(\text{líquido sinovial})}$   $\text{IC}_{50}=3.9 \mu\text{M}$ ,  $\text{PLA}_{2(\text{veneno de abeja})}$   $\text{IC}_{50}=7.5 \mu\text{M}$ ). Su mecanismo de acción involucra la apertura del anillo de piranofuranosa, generando un compuesto  $\alpha,\beta$ -insaturado que puede reaccionar con los residuos de lisina de  $\text{PLA}_2$ , de esta manera se propuso que el grupo aldehído proveniente del hemicetal en el anillo dehidropiránico era esencial para inactivar irreversiblemente  $\text{PLA}_2$  [35]. Este compuesto fue licenciado por Allergan Pharmaceuticals, pero en estudios clínicos (fase II) se presentaron problemas en su formulación, debido a que cantidades suficientes del compuesto usado en las formulaciones no eran capaces de ser absorbidas por la piel. Sin embargo, se emplea comercialmente como estándar para ensayos de inhibición de la  $\text{PLA}_2$  [36]. Estas razones condujeron al desarrollo de análogos como el compuesto (**9**), que demostró ser un inhibidor de  $\text{PLA}_2$  más potente que la manoalida en líquidos sinoviales humanos y en veneno de abejas, además de presentar actividad comparable con la indometacina en el ensayo del edema plantar inducido por carragenina [37] (Tabla 1.1).

La ciclolinteinona (**10**) es un sesterterpeno aislado de la esponja *Cacospongia linteiformis*, el cual presentó inhibición de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , que es un factor de transcripción necesario para la inducción de iNOS y COX-2, generando así un descenso en la expresión de iNOS y COX-2, y la inhibición concomitante de  $\text{PGE}_2$  ( $\text{IC}_{50}=5.0 \mu\text{M}$ ) y NO ( $\text{IC}_{50}=5.0 \mu\text{M}$ ) en modelos *in vitro* [38] (Tabla 1.1).

La dysidina (**11**) aislada de especies del género *Dysidea*, presentó inhibición de las fosfolipasas  $\text{A}_2$  del líquido sinovial humano, del veneno de la serpiente naja naja, del páncreas porcino, del veneno de abeja, de la  $\text{PLA}_2$  citoplasmática de macrófagos de la línea celular 264.7, y de la  $\text{sPLA}_2$  ( $\text{IC}_{50}=2.0 \mu\text{M}$  en comparación con manoalida  $\text{IC}_{50}=3.9 \mu\text{M}$ ). Adicionalmente se encontró que era capaz de modular la degranulación y producción de superóxido en leucocitos humanos [39] (Tabla 1.1).

La astaxantina (**12**) es un caroteno encontrado en numerosos crustáceos, salmones y estrellas de mar; este compuesto fue capaz de bloquear la expresión de genes proinflamatorios como consecuencia de la supresión del factor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  [40]. En estudios de uveítis inducida por LPS se observó que la astaxantina producía efectos antiinflamatorios por supresión de NO,  $\text{PGE}_2$  y de las citoquinas  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  mediante el bloqueo directo de la enzima iNOS, donde 100 mg/Kg de astaxantina suprimían el desarrollo de la uveítis, resultando más potente que la prednisolona a una concentración de 10 mg/Kg [41]. Adicionalmente, fue capaz de suprimir la activación de las células T en células mononucleares periféricas en pacientes asmáticos en una magnitud comparable a la del dihidrocloruro de cetirizina y azelastina, antihistamínicos de uso común, sugiriendo su posible uso como antihistamínico solo o en combinación en formulaciones [40] (Tabla 1.1).



La escitonemina (**13**) aislada de cianobacterias marinas, presentó actividad antiinflamatoria y antiproliferativa *in vitro*; este compuesto inhibió las proteínas rhPLK1 ( $IC_{50}=2.3 \mu M$ ) y rhPKC $\beta$ 1 ( $IC_{50}=3.4 \mu M$ ), ésta última pertenece al grupo de las PKC $\beta$  que son mediadoras en el proceso inflamatorio y se encuentra relacionada con numerosas enfermedades relacionadas [42]. El hecho de que PLK1 esté relacionada estructuralmente con PKC $\beta$  indica que podría actuar probablemente por su habilidad de inhibir las quinasas serina/treonina. En modelos *in vivo* este compuesto redujo el edema auricular inducido por TPA en ratones con un  $IC_{50}=10.9 \mu g/oreja$  [42] (Tabla 1.1).

La ascidiatiazona B (**14**) aislada de ascidias *Alpidium sp.* en Nueva Zelanda, mediante ensayos *in vitro* demostró inhibición de la producción superóxido en neutrófilos humanos con un  $IC_{50}=0.44 \mu M$  en comparación con el control SOD de  $IC_{50}=0.65 \mu M$  [43]. El 1-(12-hidroxi)-octadecanil-sulfato de sodio (**15**) aislado de tunicados de la familia *Polyclinidae* presentó inhibición de MMP-2 (por sus siglas en inglés *matrix metalloproteinase-2*) con un  $IC_{50}=9.0 \mu g/mL$ , siendo esta enzima un blanco poco reportado en compuestos antiinflamatorios [44] (Tabla 1.1).

La ambreína (**16**) aislada del cachalote *Physeter macrocephalus*, inhibió la liberación de elastasa (proteasa de degradación tisular) por parte de neutrófilos humanos con un  $IC_{50(ambreína)}=4.6 \mu M$ ,  $IC_{50(genisteína)}=51.6 \mu M$ . El mismo efecto fue observado al realizar el ensayo con sus derivados **17** y **18** con un porcentaje de inhibición de 95.1% y 92.2% a  $10 \mu g/mL$ , respectivamente, en comparación con el 51.6% que presentó el control genisteína [45] (Tabla 1.1).

Los anteriores compuestos corresponden a solo algunos de los ejemplos más representativos de la capacidad de los organismos de origen marino de producir metabolitos con actividad antiinflamatoria, cabe resaltar también que estos compuestos han resultado activos en diferentes dianas de la respuesta inflamatoria, que incluyen la inhibición de diversas enzimas como PLA<sub>2</sub>, iNOS, MMP-2, además de la inhibición de mediadores proinflamatorios como diversas citoquinas, EOR y ENR.

### 1.1.7 Compuestos Antiinflamatorios Aislados de Octocorales

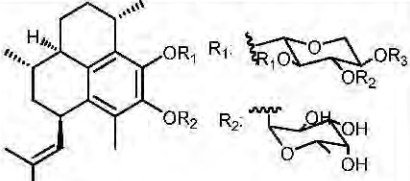
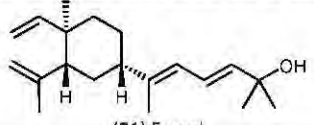
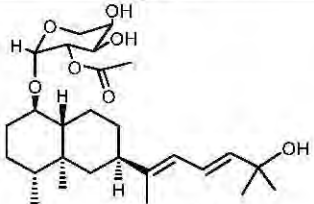
Los octocorales, también conocidos como corales blandos se han convertido en objetivo de la búsqueda de compuestos antiinflamatorios, pues son fuente de compuestos con estructuras novedosas que han mostrado actividad en diversas dianas del proceso inflamatorio, como lo son la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios, entre los que se encuentran por ejemplo prostaglandinas y leucotrienos, mediante la inhibición de algunas de las enzimas involucradas en el proceso como COX-2, LOX y PLA<sub>2</sub>. Un ejemplo de esto es el octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, del que se han aislado una variedad de diterpenos algunos de ellos tricíclicos glicosidados conocidos como pseudopterosinas, los cuales se han caracterizado por presentar actividad antiinflamatoria potente [46] (Tabla 1.2), su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de la biosíntesis de los eicosanoides por inhibición de PLA<sub>2</sub> de los leucocitos polimorfonucleares y su selectividad podría estar asociada al tipo de azúcar enlazado [47]. Modificaciones estructurales de la pseudopterosina A (**19**) condujeron al compuesto metopterosina (OAS1000) (**20**), el cuál mostró ser capaz de inhibir la síntesis de LTB<sub>4</sub> y fue sometido a estudios clínicos para el tratamiento de la dermatitis de contacto irritante por la firma OsteoArthritis Sciences Inc. [48]. Sin embargo, estos estudios no continuaron debido a la quiebra

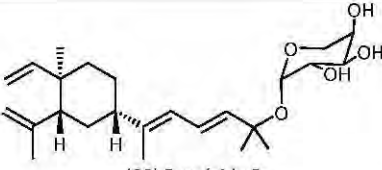
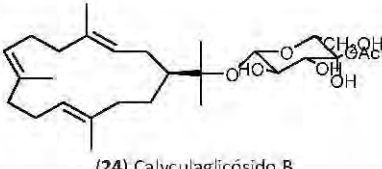
de ésta empresa. Adicionalmente, extractos semipurificados ricos en pseudopterosinas son usados como aditivos en cosméticos faciales bajo el nombre Resilence® (Tabla 1.2).

Otra clase de compuestos que han presentado actividad inflamatoria han sido obtenidos a partir del ocotocoral *Eunicea fusca* [49]. Estos compuestos son el fuscól (21), el fuscósido A (22) y el fuscósido B (23) (Tabla 1.2), estos dos últimos presentaron en el ensayo de edema auricular inducido por PMA, una reducción del edema del 85% y 52% respectivamente, frente al 80% y 30% que exhibieron la manolida y la indometacina respectivamente, ensayando todos los compuestos a una dosis de 50 µg. En estudios farmacológicos se pudo establecer que el fuscósido B inhibe selectivamente la transformación de ácido araquidónico a LTC<sub>4</sub> por inhibición de 5-LOX [50, 51].

De especímenes no clasificados del género *Eunicea* recolectados en la bahía de Santa Marta-Colombia se aislaron 3 cembránolidos conocidos como calyculaglicósidos, de los cuales el calyculaglicósido B (24) presentó actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular inducido por aceite de crotón (mezcla de ésteres de forbol) en un nivel comparable con la indometacina pero a la mitad de la concentración (77% de inhibición a 125 µg/oreja para el calyculaglicósido B, respecto a 76% de inhibición a 250 µg/oreja para la indometacina) (Tabla 1.2). De manera preliminar se pudo establecer que este compuesto era capaz de inhibir en un 40% la secreción de LTB<sub>4</sub> a una concentración de 10<sup>-5</sup> M afectando la producción de PGE<sub>2</sub>, sugiriendo que podría actuar inhibiendo la vía de la 5-LOX de manera diferente a como lo hace el fuscósido B [52].

Tabla 1.2. Compuestos aislados de corales y algunos análogos con actividad antiinflamatoria (Tomado y adaptado de [28])

Organismo	Compuesto	Actividad Farmacológica	M.A.M. <sup>a</sup>	Ref
<i>Pseudoptero-gorgia Elisabethae</i>	 <p>(19) Pseudopterosina A: R<sub>1</sub>= Xylose, R<sub>2</sub>=H (20) Methopterosina: R<sub>1</sub>= Xylose, R<sub>2</sub>=Me</p>	Inhibición del edema auricular inducido por TPA, microglia, inhibición de TX2	Inhibición de PLA <sub>2</sub> , de PMN y 5-LOX	[46-48]
<i>Eunicea fusca</i>	 <p>(21) Fuscól</p>	Inhibición de la liberación y biosíntesis de leucotrienos	No determinado	[51]
<i>Eunicea fusca</i>	 <p>(22) Fuscósido A</p>	Inhibición del edema auricular inducido por MPA	No determinado	[49]

<i>Eunicea fusca</i>	 <p>(23) Fuscósido B</p>	Inhibición del edema auricular inducido por MPA	Inhibición de 5-LOX	[49-51]
<i>Eunicea</i> sp.	 <p>(24) Calyculaglicósido B</p>	Inhibición de PGE <sub>2</sub> y LTB <sub>4</sub>	No determinado	[52]

<sup>a</sup> Mecanismo de acción molecular

En consideración a la revisión anterior se observa que la búsqueda de compuestos antiinflamatorios es un proceso continuo que en la actualidad tiende a orientarse a la búsqueda de compuestos que inhiban selectivamente tanto a las proteínas (IL-6, IL-8, etc.) como a las enzimas involucradas en la respuesta inflamatoria, ya sea bloqueando la acción de éstas o los productos generados por acción de éstas (EOR, ENR, entre otros). También se ha buscado la inhibición de diversos factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, interfiriendo de esta manera las vías de señalización de las células implicadas en la respuesta inflamatoria. La necesidad de nuevas moléculas que actúen como agentes terapéuticos con menores efectos secundarios es evidente y los productos naturales marinos entre los que se incluyen aquellos aislados de octocorales se perfilan como una fuente promisoriosa de estos, pues además de las esponjas y los microorganismos marinos, los octocorales son reconocidos por ser una interesante fuente de compuestos que se han caracterizado no solo por sus estructuras novedosas sino también por presentar diversa y potente actividad biológica.

### 1.1.8 Géneros *Eunicea* y *Plexaura*

Los octocorales del género *Eunicea* (Plexauridae) presentan espículas puntiagudas rectas o casi rectas que consisten en mayor o menor parte de husos alargados de color violeta pálido, o púrpura oscura. Las espículas de la superficie exterior son principalmente frondosas, alargadas y sobresalientes. La capa media contiene husos ordinarios, a menudo de gran tamaño. La parte superior tentacular está provista de espículas rectas o encorvadas. Los calyces están normalmente bien desarrollados y pueden sobresalir de forma prominente de la corteza. Los tentáculos parten del pólipo que, en muchos casos, puede retractarse dentro de la corteza de la región calycular [53] (figura 1.3a).

Dentro de los octocorales del género *Eunicea* que se encuentran en el mar Caribe están, *E. flexuosa*, *E. asperula*, *E. tourneforti*, *E. fusca*, *E. calyculata*, *E. laciniata*, *E. succinea*, *E. mammosa*, *E. clavigera*, *E. pinta*, *E. palmeri* y *E. knighti*, los cuales están ampliamente distribuidos en todas las localidades caribeñas, no obstante las tres últimas especies se concentran en la región norte del mar Caribe [54]. A excepción de *E. clavigera*, todas estas especies ha sido objeto de estudios químicos [8] incluyendo algunos hechos por nuestro grupo investigación que en los últimos 5 años ha estudiado varias especies de éste género [55] por lo que se ha podido establecer que

poseen principalmente compuestos de tipo cembrano y dolabelano. Sin embargo, también se encuentran compuestos como fuscósidos, cubitanos y sesquiterpenos de tipo asbestinano y briarano [8]. Estos compuestos se destacan por presentar diversos tipos de actividad biológica, a saber, antimalárica, antitumoral, inhibitoria del quórum sensing, antifouling y antiinflamatoria (fuscósidos y calyculaglicósidos) [8].

Cabe mencionar que muchos de estos octocorales se encuentran asociados a microorganismos simbióticos dentro de los que se destacan en el Caribe las bacterias fotosintéticas del género *Symbiodinium* [56]. Estos dinoflagelados poseen un alto grado de especificidad, ya que no solo dependen de la especie del coral, sino de su ontogenia, y su hábitat [57]. La importancia de la presencia de estos microorganismos simbióticos radica en el hecho de que han mostrado ser los verdaderos productores de algunos de los metabolitos presentes en el extracto del octocoral. Un ejemplo de ello es el fuscól (21) el cual es producido por una zooxantela simbiótica asociada al octocoral *E. fusca* [58], lo que sugiere que los compuestos que se extraen de una misma especie en diferentes áreas geográficas, pueden ser diferentes, tanto en su identidad como en su cantidad, puesto que es de esperarse que la comunidad de microorganismos sea diferente en diferentes localidades, tal y como ocurre con el octocoral *P. elisabethae* que al ser estudiado en las regiones de San Andrés y Providencia presentó diferencias en cuanto a la composición química de especímenes en éstas dos locaciones, además de diferencias al compararse estos resultados con los de los especímenes de Bahamas y cayos de Florida [59].



Figura 1.3. a. *Eunicea* sp. b. *Plexaura* sp. (tomado de [http://www.seascapestudio.net/reference/corals/eunicea\\_sp.jpg](http://www.seascapestudio.net/reference/corals/eunicea_sp.jpg))

En lo que se refiere al género *Plexaura* (Plexauridae), estos octocorales presentan colonias ramificadas las cuales se dividen normalmente en un solo plano. Sin embargo, este género tiene una apariencia arbustiva, una característica clara en *P. homomalla*, especie en la que el tallo central es de color negro, el cual es fácil de observar entre los pólipos de color crema o amarillos [53] (figura 1.3b).

El género *Plexaura* cuenta con cinco especies reportadas en el mar Caribe, siendo *P. flexuosa*, *P. homomalla* y *P. nina* especies encontradas en el país. Dentro de los estudios químicos llevados a cabo sobre estos octocorales se ha establecido que producen principalmente prostaglandinas. Es así como *P. homomalla* tiene la capacidad de producir diferentes tipos de prostaglandinas, cuyos ésteres se presentan en grandes cantidades (1.3 % del peso seco del coral) [60, 61]. No obstante no se han encontrado reportes en cuanto a su caracterización desde el punto de vista de actividad antiinflamatoria. De otro lado, en estudios que evaluaron el posible rol alelopático de

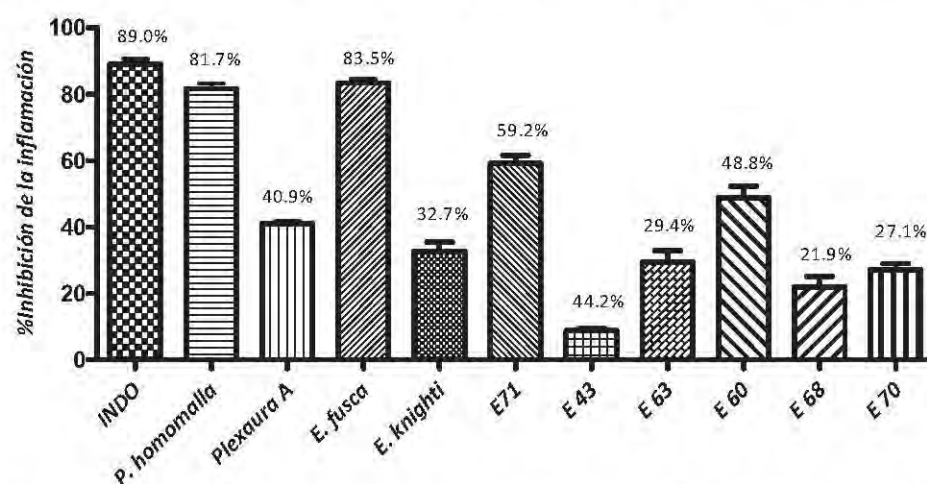
estos compuestos se pudo establecer que estas prostaglandinas estaban implicadas en la defensa química del coral contra la predación por parte de peces e invertebrados [62].

Adicionalmente a partir de especies de éste género han sido aislados esteroides [63] y lípidos de cadena ramificada, gama-lactonas y terpenoides de biosíntesis mixta [64]. Cabe mencionar además que la mayoría de estos estudios han sido llevados a cabo con octocorales recolectados en la Florida, Bahamas, Gran Caimán, Puerto Rico y Curazao, y que no se registran estudios de estos corales en la región Caribe Colombiana. Para finalizar es importante aclarar que el octocoral clasificado como *Plexaura flexuosa* ha sido reasignado al género *Eunicea* [65], lo cual coincide con los estudios que sobre la química de este octocoral han sido realizados, y que han establecido que ésta especie es fuente principalmente de cembranoides, característicos del género *Eunicea* [8].

Hasta este punto resulta evidente entonces no solo la importancia de la investigación del proceso inflamatorio (y su inhibición) si no también el potencial de los octocorales de los géneros que incluye este estudio, como fuente de compuestos capaces de inhibir el proceso inflamatorio. Con esto último como hipótesis se decidió evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos de diferentes especies de octocorales de los géneros *Eunicea* y *Plexaura* en un modelo general *in vivo* (edema auricular inducido) para poder establecer la capacidad de estos organismos de producir compuestos con actividad antiinflamatoria.

## 1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado el amplio número tanto de muestras a evaluar como de réplicas, se decidió dividir el ensayo en dos series. En primer lugar se evaluaron los octocorales *P. homomalla*, *E. fusca*, *Plexaura A*, *E. Knighti*, *E 71* y posteriormente se evaluaron los octocorales *E43*, *E63*, *E60*, *E68*, *E70*, todos éstos últimos pertenecientes exclusivamente al género *Eunicea*, los cuales se encuentran en proceso de clasificación. Los resultados de estos ensayos se presentan en la figura 1.4.



**Figura 1.4.** Porcentaje de inhibición de los extractos de los octocorales en el edema auricular inducido por TPA. Resultados expresados como el promedio del porcentaje de inhibición frente al vehículo  $\pm$  D.E. n=10. (Entre paréntesis los porcentajes de inhibición).

En la figura 1.4 se observa como en las dos series de ensayos el TPA provocó una fuerte inflamación en las orejas del ratón, así como el efecto antiinflamatorio logrado por la aplicación de la indometacina, fármaco que actúa inhibiendo la enzima COX [66], responsable de la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias, que son liberadas como consecuencia del estímulo inflamatorio. De esta manera se hace evidente la validez del experimento y los resultados obtenidos por acción de los extractos sobre el edema producido.

En general todos los extractos lograron inhibir en algún grado el desarrollo del edema producido por la aplicación del TPA. Sin embargo, *P. homomalla*, *Plexaura A*, *E. fusca*, *E 71*, y el extracto del octocoral *E 60* se destacan por presentar porcentajes de inhibición superiores al 40%, criterio usado para evaluar un extracto como promisorio [20], lo que confirma el amplio potencial que presentan los octocorales de los géneros *Eunicea* y *Plexaura* como posible fuente de metabolitos con actividad antiinflamatoria.

Los extractos que presentaron la mayor actividad fueron *E. fusca* y *P. homomalla*, reduciendo el edema hasta los niveles del control presentando porcentajes de inhibición similares a la indometacina, además de no observarse diferencias significativas entre éstos (\*\* $P < 0.01$ ). Este resultado es importante si se tiene en cuenta que la dosis a la que se evaluaron estos extractos (500  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ ) corresponde a la mitad de la dosis a la que se recomienda evaluar extractos crudos [25].

Estos resultados demuestran entonces que los extractos de estos dos octocorales podrían tener compuestos capaces de inhibir selectivamente alguno de los mecanismos desencadenantes de la respuesta física inflamatoria. En el caso específico de *E. fusca*, los estudios llevados a cabo por Fenical y colaboradores permitieron identificar a los fuscósidos, diterpenos glicosidados, algunos de los cuales presentan potente actividad antiinflamatoria [49]. De otro lado *P. homomalla* es un octocoral que se ha caracterizado por producir diversos tipos de prostaglandinas [60, 61], compuestos pro y antiinflamatorios, algunos de ellos encontrados en mamíferos. No obstante, luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica en bases de datos como Marinlit, Pubmed y Sci-Finder, no se han encontrado reportes en cuanto a la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los metabolitos aislados de este octocoral, ni tampoco estudios sobre la química de éste en la región de San Andrés y Providencia por lo que existe la necesidad de estudiar su composición química y la actividad antiinflamatoria de los compuestos presentes en este extracto.

Con estos antecedentes se decidió entonces continuar con el estudio químico y de actividad antiinflamatoria de los extractos de los octocorales *Eunicea fusca* y *Plexaura homomalla*, presentados en los capítulos 2 y 3 de este trabajo. Este estudio además permitió la identificación de otros extractos de octocorales con actividad antiinflamatoria. Los octocorales no identificados que mostraron actividad en este estudio se encuentran en proceso de clasificación taxonómica.

## 1.3 METODOLOGÍA

### 1.3.1 Material Animal

El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial concedió el permiso (autorización N° 4 de 10/02/2010, adenda de la resolución 0306 de 22/02/2011) para la recolección de muestras y la realización de investigaciones sobre los organismos marinos recolectados en la Bahía de Santa Marta y en la Islas del Rosario, Caribe colombiano. Aproximadamente 1 g de diferentes especímenes, de los géneros *Eunicea* y *Plexaura* fueron recolectados en diversas localidades de Santa Marta y el archipiélago de San Andrés y Providencia, a una profundidad que oscilaba entre 5 a 25 m, mediante buceo autónomo SCUBA por el Dr. Sven Zea, profesor de la Universidad Nacional de Colombia y por la Dra. Mónica Puyana, Bióloga Marina, profesora de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, quien realizó la clasificación de los mismos basándose en preparados de espículas y morfología de las colonias usando las claves taxonómicas de los trabajos de Bayer [53]. Una vez recolectadas, las muestras fueron inmediatamente congeladas y mantenidas a -4°C hasta el momento de su extracción.

### 1.3.2 Extracción de los Octocorales

El material animal se cortó en finos trozos y fue extraído tres veces con una mezcla de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Este extracto se filtró y se concentró a presión reducida obteniendo 400 mg aproximadamente de cada extracto.

### 1.3.3 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de los extractos

#### ➤ Ensayos *in vivo*

Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se empleó el ensayo de edema auricular inducido por TPA, que se basa en la aplicación de un agente irritante, en la oreja de ratón, como lo es el acetato de tetradecanoil forbol –TPA- uno de los componentes responsables de la acción irritante en el aceite de crotón. Este ensayo es especialmente útil ya que el TPA es capaz de desencadenar todos los fenómenos característicos del proceso inflamatorio que incluyen vasodilatación y eritema (1-2h), extravasación y edema (3-4h). A nivel histológico, se produce agregación plaquetaria (2h), agregación y adherencia de neutrófilos (en 4 horas se da el pico máximo de actividad de la MPO, indicador de la migración celular) y eosinófilos (4-6 h), migración a la dermis y desgranulación de mastocitos a partir (6 h). A nivel bioquímico a partir de los primeros minutos se liberan mediadores de tipo eicosanoide como prostaglandinas (vía COX) y leucotrienos (vía LOX) [66].

Para el ensayo se emplearon ratones suizos ICR hembras de 25-30 g de peso y de 6 a 8 semanas de edad en grupos de 10 ratones por tratamiento. Estos animales fueron suministrados por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y manipulados según los lineamientos éticos internacionales, además de lo cual se contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional. Durante el desarrollo del experimento los ratones fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*.

En cada ensayo se usó un grupo control, al que solo se le aplicó el vehículo (acetona), un control positivo al que solo se le aplicó indometacina (500 µg/oreja), fármaco de referencia de reconocida actividad antiinflamatoria y los grupos de estudio a los que se les aplicaron 500 µg/oreja de los extractos a ensayar. Todas las sustancias en estudio (extractos, TPA e indometacina) se administraron disueltas en acetona y se administraron de manera tópica. Se aplicaron 10 µL de los extractos a evaluar y 10 µL de TPA (2.5 µg) por la cara interna y externa del pabellón de la oreja derecha mientras la oreja izquierda, no tratada, se empleó como control en todos los grupos experimentales. Transcurridas 4 hs los animales se sacrificaron por dislocación cervical y empleando un sacabocados se tomó una sección circular de 6 mm de diámetro de ambas orejas del animal, tanto tratadas y no tratadas.

La valoración de la actividad antiinflamatoria se estableció como la diferencia de peso entre las secciones de las orejas tratadas y no tratadas por cada animal. Adicionalmente, el porcentaje de inhibición de la inflamación frente al control se calculó, usando la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left( \left( \frac{(Wt - Wnt)_{\text{tratamientos}}}{(Wt - Wnt)_{\text{control}}} \right) \times 100 \right)$$

Donde, *Wt* representa el peso en mg, de la sección de la oreja tratada, *Wnt* representa el peso de la sección de la oreja no tratada [25].

#### 1.3.4 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media aritmética de los valores ± error estándar de la media y fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de test de Dunnet (que permitió la comparación de los grupos de estudio respecto a un único control) y de Tukey (que permite obtener diferencias significativas entre los diferentes grupos). Se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control fue significativa (\*) cuando  $P < 0.05$  (95% de confianza), muy significativa (\*\*) cuando  $P < 0.01$  (99% de confianza) y enormemente significativa (\*\*\*) cuando  $P < 0.001$  (99.9% de confianza). Cuando la diferencia respecto al control no fuera significativa no se asigna ningún símbolo. Se aplicó además el criterio de Chauvenet para la exclusión de datos atípicos.



## Capítulo 2.

# ***Eunicea fusca*: Aislamiento e Identificación de Compuestos y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria**

## 2.1 GENERALIDADES

### 2.1.1 Descripción Morfológica

*Eunicea fusca* es un octocoral que pertenece al Phylum *Cnidaria*, Clase *Anthozoa*, Subclase *Octocorallia*, Orden *Gorgonacea*, Familia *Plexauridae*. Sus colonias presentan patrones de ramificación con tendencia dicotómica y miden aproximadamente 25 cm de altura. De ramas delgadas, las aberturas de sus pólipos tienen un cáliz bajo a veces ausente. La capa media contiene husos provistos de escleritos de hasta 2 mm de longitud. La capa axial compuesta por husos de escleritos incoloros o ligeramente violetas de hasta 0,2 mm de longitud, puede presentar a veces ornamentaciones prominentes. La capa superficial contiene pliegues suaves, a veces fusionados, de hasta 0,18 mm de longitud [53] (figura 2.1).



Figura 2.1. Octocoral *Eunicea fusca* (fotografía tomada por el Dr. Sven Sea)

### 2.1.2 Estudios Químicos

El octocoral *E. fusca* ha sido objeto de varios estudios químicos y de actividad biológica, en el primero de ellos llevado a cabo por Gopichand y Schmitz con muestras recolectadas en Caicos del Sur (Caribe Central) se logró aislar e identificar el sesquiterpeno 15-nor-13-ceto- $\beta$ -elemmano (**25**) (figura 2.2) y un diterpeno denominado fuscól (**21**), ambos con esqueleto tipo elemmano y estructuralmente relacionados con los lobanos [67] (figura 2.1). Posteriormente en estudios llevados a cabo por Shin y Fenical en este octocoral recolectado en Martinica y cayos de Tobago se aislaron cuatro diterpenos glicosidados denominados fuscósidos A (**22**), B (**23**) C-D (**26-27**) [49] (figura 2.2), el fuscósido A (**22**) contiene un novedoso sistema de anillos bicíclico relacionado con los sesquiterpenos de tipo eremofileno; de otro lado los fuscósidos B-D son glicósidos de arabinosa que poseen como aglicona al fuscól (**21**). Estudios adicionales en muestras recolectadas en los Cayos de Florida y la isla de St. Croix presentaron la misma composición química [49].

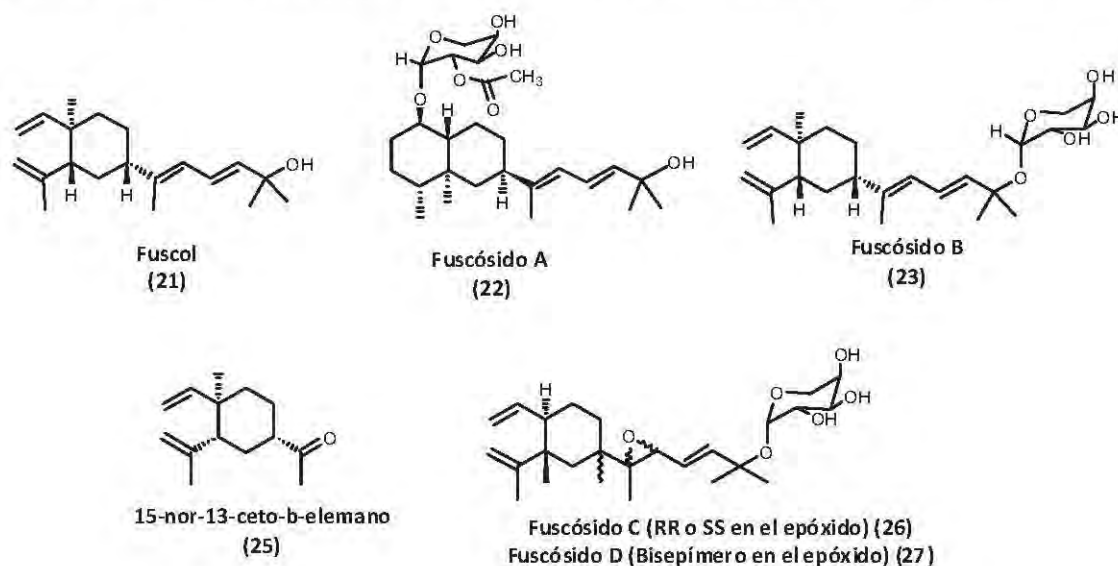


Figura 2.2. Compuestos aislados del octocoral *Eunicea fusca*

### 2.1.3. Actividad Farmacológica de los Fuscósidos

El fuscól (**21**), el fuscósido A (**22**) y el fuscósido B (**23**) (Tabla 1.2, Cap. I) presentaron actividad antiinflamatoria, los dos últimos en el ensayo de edema auricular inducido por PMA, presentaron una reducción del edema del 85% y 52% respectivamente, frente al 80% y 30% que exhibieron la manolida y la indometacina respectivamente [49]. Estudios farmacológicos del fuscósido B (**23**) llevados a cabo en modelos de inflamación con macrófagos murinos permitieron concluir que el fuscósido B (**23**) es un potente inhibidor tópico de la inflamación inducida por PMA, no obstante en administraciones intraperitoneales no exhibió actividad. Además, inhibió la infiltración de neutrófilos, donde 100  $\mu$ g redujeron los niveles de MPO hasta los del control en comparación con la manolida que a la misma concentración mostró una reducción del 66% en el mismo ensayo, hecho que se corroboró con exámenes histológicos. Adicionalmente, el fuscósido B inhibió de manera selectiva la biosíntesis de LTC<sub>4</sub> con efectos mínimos sobre PGE<sub>2</sub>. Esta inhibición de los

leucotrienos es independiente de la muerte celular, irreversible y coincide temporalmente con la unión del fuscósido B (**23**) a la célula, la cual se da por mecanismos independientes al transporte activo [50]. Adicionalmente, se pudo establecer que el fuscósido B (**23**) no es metabolizado incluso en periodos prolongados de exposición, por lo que su acción antiinflamatoria es perdurable y no se forman productos de degradación que podrían resultar tóxicos [50].

En estudios farmacológicos en neutrófilos humanos se estableció que el fuscósido B (**23**) era capaz de inhibir la liberación y biosíntesis de leucotrienos en este tipo de células con un  $IC_{50}$  = 10  $\mu$ M. En este mismo ensayo, el fuscol (**21**) presentó un  $IC_{50}$  = 6  $\mu$ M, con lo que se estableció que el azúcar no era necesario para su acción farmacológica, que se da probablemente por una modificación covalente, persistente e irreversible de la 5-LOX o de los factores implicados en su activación, sin afectar las otras isoformas 12- y 15-LOX, ni las COX. Adicionalmente se observó que a bajas concentraciones el fuscósido B (< 50  $\mu$ M) inhibe la LTA<sub>4</sub> sintetasa, no obstante a altas concentraciones (> 50  $\mu$ M) inhibe todos los metabolitos del ácido araquidónico (AA) vía LOX [51].

De esta manera se establece que *E. fusca* es un octocoral importante en términos de la actividad antiinflamatoria de sus compuestos y su posibilidad de convertirse en nuevos agentes terapéuticos, por lo que el estudio de la química de este organismo recolectado en costas colombianas resulta relevante, esto si además se tiene en cuenta que recientemente se estableció que el fuscol, aglicona del fuscósido B, es producido por un dinoflagelado simbiote del género *Symbiodinium* asociado a este octocoral [58]. Estos microorganismos asociados pueden variar según condiciones ecológicas como ontogenia, época y ubicación geográfica en la que se encuentre el coral al cual están asociados [57], lo que sugiere entonces la posibilidad de encontrar compuestos diferentes en muestras recolectadas en regiones geográficas diferentes.

## 2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1 Análisis Químico

El octocoral *E. fusca* una vez colectado se mantuvo congelado hasta el momento de realizar su extracción con una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1:1). De acuerdo a los resultados mostrados en la figura 1.4 (página 17), este extracto presentó en el ensayo de edema auricular inducido por TPA la mayor actividad antiinflamatoria al disminuir el edema hasta los niveles del control. Razón por la cual fue elegido para su estudio químico, con el objeto de aislar compuestos responsables de tal actividad. De este modo, el extracto total fue particionado entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. La fase orgánica fue sometida a sucesivas cromatografías hasta obtener los compuestos **E1-E10** como se describe en la metodología (sección 2.3).

#### ➤ Elucidación del Compuesto E1

El compuesto **E1** fue obtenido como un sólido amorfo amarillo. Su espectro HR-ESI-MS presentó un ion *pseudo*-molecular  $[M+Na]^+$  en  $m/z$  487.3023, consistente con la fórmula molecular C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>Na (calc. 487.3036 para C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>Na). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 2.1) presentó señales para seis grupos metilo en  $\delta_H$  0.71 (s), 0.75 (d,  $J$ =6.8 Hz), 1.57 (s), 1.62 (s), 1.68 (s) y 2.09 (s), éste último correspondiente a un grupo acetilo. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H también reveló la presencia de

un grupo  $\text{CH}_2 \text{ sp}^3$  en  $\delta_{\text{H}}$  2.66 (*t*,  $J=6.8$  Hz) entre dos grupos olefínicos, con desplazamientos químicos para sus protones en  $\delta_{\text{H}}$  5.08 (*m*) y 5.10 (*m*). Además, mostró cinco señales entre 3.5 ppm y 5.0 ppm que revelaron la presencia de un azúcar y una señal para un protón en  $\delta_{\text{H}}$  3.18 (*ddd*,  $J=9.6, 9.6, 4.4$  Hz) que sugería la presencia de un grupo hidroximetino. El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Tabla 2.1) reveló la presencia de 27 señales, asignadas mediante experimentos DEPT-135 a seis grupos metilo, seis grupo  $\text{CH}_2 \text{ sp}^3$ , 11 grupos CH (dos de estos correspondientes a carbonos  $\text{sp}^2$  y cinco a  $\text{OCH sp}^3$ ) y cuatro carbonos cuaternarios (dos olefínicos y uno perteneciente a un grupo  $\text{RCOO}^-$ ). Estos datos indicaban entonces la presencia de un diterpeno glicosidado unido a un grupo acetilo.

**Tabla 2.1.** Desplazamientos en RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para **E1** y **E1a**, en  $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz.

No.	E1		E1a	
	$\delta$ (H)	$\delta$ (C)	$\delta$ (H)	$\delta$ (C)
1	0.89 (1H, <i>m</i> ), 1.58 (1H) <sup>a</sup>	44.3 $\text{CH}_2$	0.87 (1H, <i>m</i> ), 1.58 (1H) <sup>a</sup>	44.2 $\text{CH}_2$
2	-	37.7 C	-	37.7 C
3	1.19 (1H, <i>m</i> )	42.5 CH	1.24 <sup>a</sup>	42.5 CH
4	1.25 (1H) <sup>a</sup> , 1.45 (1H, <i>m</i> )	29.3 $\text{CH}_2$	1.25 (1H) <sup>a</sup> , 1.46 (1H, <i>m</i> )	29.3 $\text{CH}_2$
5	1.36 (1H) <sup>a</sup> , 2.06 (1H, <i>m</i> )	34.3 $\text{CH}_2$	1.36 (1H) <sup>a</sup> , 2.06 c	34.3 $\text{CH}_2$
6	3.18 (1H, <i>ddd</i> , $J=9.6, 9.6, 4.4$ )	80.6 CH	3.18 (1H, <i>m</i> )	81.0 CH
7	1.12 (1H, <i>m</i> )	51.7 CH	1.23 <sup>a</sup>	51.6 CH
8	1.10 (1H, <i>m</i> ), 1.98 (1H, <i>m</i> )	22.7 $\text{CH}_2$	0.94 (1 H, <i>m</i> ), 1.99 (1 H) <sup>a</sup>	22.7 $\text{CH}_2$
9	1.17 (1H, <i>m</i> ), 1.68 (1H) <sup>a</sup>	31.3 $\text{CH}_2$	1.18 (1H, <i>m</i> ), 1.68 (1H) <sup>a</sup>	31.3 $\text{CH}_2$
10	2.04 (1H) <sup>a</sup>	41.6 CH	2.07 (1H, <i>m</i> )	41.6 CH
11	-	139.8 C	-	139.8 C
12	5.10 (1H, <i>m</i> )	121.7 CH	5.12 (1H, <i>m</i> )	121.7 CH
13	2.66 (2H, <i>t</i> , $J=6.8$ )	27.0 $\text{CH}_2$	2.66 (2H, <i>t</i> , $J=6.9$ Hz)	27.0 $\text{CH}_2$
14	5.08 (1H, <i>m</i> )	123.4 CH	5.10 (1H, <i>m</i> )	123.5 CH
15	-	131.3 C	-	131.3 C
16	0.71 (3H, <i>s</i> )	12.3 $\text{CH}_3$	0.70 (3H, <i>s</i> )	12.3 $\text{CH}_3$
17	0.75 (3H, <i>d</i> , $J=6.8$ )	14.8 $\text{CH}_3$	0.75 (3H, <i>d</i> , $J=6.4$ )	14.8 $\text{CH}_3$
18	1.57 (3H, <i>s</i> )	14.2 $\text{CH}_3$	1.57 (3H, <i>s</i> )	14.2 $\text{CH}_3$
19	1.62 (3H, <i>s</i> )	17.7 $\text{CH}_3$	1.62 (3H, <i>s</i> )	17.7 $\text{CH}_3$
20	1.68 (3H, <i>s</i> )	25.7 $\text{CH}_3$	1.68 (3H, <i>s</i> )	25.7 $\text{CH}_3$
1'	4.98 (1H, <i>d</i> , $J=3.6$ )	98.4 CH	5.08 (1H, <i>d</i> , $J=3.6$ )	98.4 CH
2'	4.95 (1H, <i>dd</i> , $J=9.6, 3.6$ )	72.4 CH	5.32 (1H, <i>brs</i> )	69.3 CH
3'	4.00 (1H) <sup>a</sup>	69.6 CH	5.34 (1 H) <sup>a</sup>	68.9 CH
4'	3.98 (1H, <i>brs</i> )	67.7 CH	5.12 (1H, <i>ddd</i> , $J=3.6, 2.4, 1.4$ )	67.3 CH
5'	3.96 (1H) <sup>a</sup> , 3.68 (1H, <i>dd</i> , $J=12.7, 1.6$ )	62.4 $\text{CH}_2$	4.05 (1 H, <i>d</i> , $J=13$ ), 3.61 (1H, <i>dd</i> , $J=13, 1.4$ )	60.6 $\text{CH}_2$
OAc	-	171.5 C	-	170.5 C
	-	-	-	170.4 C
	-	-	-	170.2 C
	2.09 (3H, <i>s</i> )	20.4 $\text{CH}_3$	2.13 (3H, <i>s</i> )	20.7 $\text{CH}_3$
	-	-	2.03 (3H, <i>s</i> )	20.8 $\text{CH}_3$
	-	-	1.99 (3 H, <i>s</i> )	21.0 $\text{CH}_3$

a) Señales solapadas

Los desplazamientos en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de **E1** fueron similares a los reportados para el fuscósido A, un diterpeno glicosidado previamente aislado de especímenes de *E. fusca* recolectados en Martinica y los Cayos de Tobago [49]. Sin embargo, algunas diferencias fueron encontradas en las señales de RMN correspondientes a la cadena lateral (C11 - C15 y C18 - C20,

Tabla 2.1). Las correlaciones observadas en los experimentos HSQC, COSY y HMBC condujeron a establecer la presencia de dos dobles enlaces en C-11 y C-14 para **E1**, y de ésta manera la estructura plana del compuesto **E1**, tal y como se presenta en la figura 2.3.

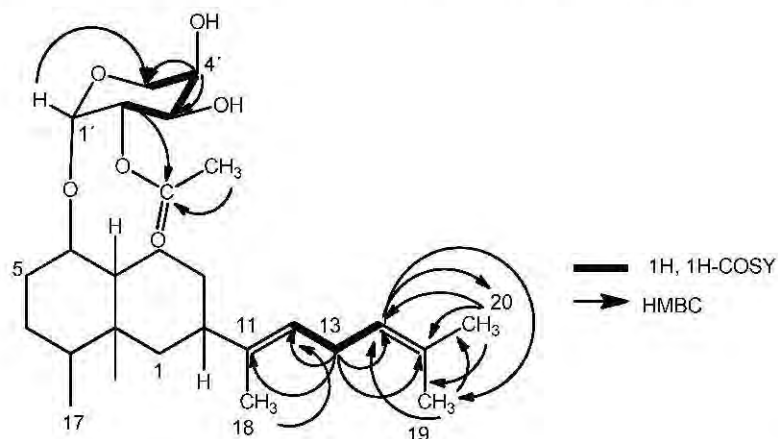


Figura 2.3. Estructura plana y algunas correlaciones 2D-RMN para el compuesto **E1**.

El azúcar unido a **E1** se estableció como 2'-O-acetil-β-arabinopiranososa por sus desplazamientos en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C y la evaluación de las constantes de acoplamiento para H-C1' (*d*, *J* = 3.6 Hz), H-C2' (*dd*, *J* = 9.6, 3.6 Hz) y H<sub>β</sub>-C5' (*dd*, *J* = 12.7, 1.6 Hz); estos datos mostraban entonces una relación axial-axial para los protones H-C2' y H-C3' y la orientación ecuatorial de H-C1' y H-C4', sugiriendo la presencia de una β-arabinosa. El grupo acetilo fue asignado en la posición C-2' en el azúcar por el desplazamiento a campos bajos del protón en  $\delta_H$  4.95 (*dd*, *J* = 9.6, 3.6 Hz) y las correlaciones HMBC de éste protón con el grupo carboxilo en  $\delta_C$  171.5 (figura 2.3). Adicionalmente, la comparación de los desplazamientos químicos y de las constantes de acoplamiento del compuesto **E1** peracetilado (**E1a**), obtenido por acetilación de **E1**, con los del peracetato del fuscósido A [49], condujo a establecer la estructura del azúcar arriba mencionado. Sin embargo, una revisión detallada de la nomenclatura de los carbohidratos [69] nos permitió concluir que la correcta nomenclatura para este azúcar es β-arabinosa, y no la previamente reportada α-arabinosa [49].

La aglicona de **E1** presenta centros asimétricos en las posiciones 2, 3, 6, 7, 10. La fusión de los dos anillos de la aglicona se estableció como *trans* debido a los desplazamientos a campos altos del metilo axial C-16 ( $\delta_C$  12.3), lo cual coincide con lo reportado para sistemas de tipo *trans* decalina ( $\delta_C \sim 18$ ), y no para lo reportado para sistemas *cis* decalina ( $\delta_C \sim 30$ ) [70]. El metilo C-17 fue asignado como ecuatorial por las correlaciones que presentaba éste en el espectro NOESY con el metilo C-16 (figura 2.4), lo cual fue confirmado por la comparación de sus desplazamientos químicos en RMN-<sup>13</sup>C con los reportados para núcleos con sistema decalina ( $\delta_C$  C-11<sub>*trans*</sub> = 27.8) [70] y friedelano ( $\delta_C$  C-23<sub>*cis*</sub> = 13.4 Hz, C-24<sub>*cis*</sub> = 15.1 Hz) [71]. El protón H-10 fue asignado como axial por las correlaciones observadas en el espectro NOESY con el metilo axial C-16, lo que además permitía establecer que la cadena lateral se encontraba en una disposición ecuatorial como en los otros fuscósidos reportados [49] (figura 2.4). El protón en C-6 fue asignado como axial debido a la constante de acoplamiento *trans* diaxial (*J* = 9.6 Hz) que se observaba entre H-C6 y H-C7, además de las correlaciones NOESY entre H-C6 y el metilo C-16, indicando que el azúcar unido en la

posición C-6 presentaba una disposición ecuatorial. Adicionalmente, la intensa correlación en el espectro NOESY entre el protón anomérico y el protón H-C6 sugirió una rotación restringida del azúcar. De esta manera se estableció la estereoquímica relativa de E1 como 2*S*\*, 3*R*\*, 6*R*\*, 7*R*\*, 10*R*\* para la aglicona y de 2'*R*\*, 3'*S*\*, 4'*S*\* para el azúcar.

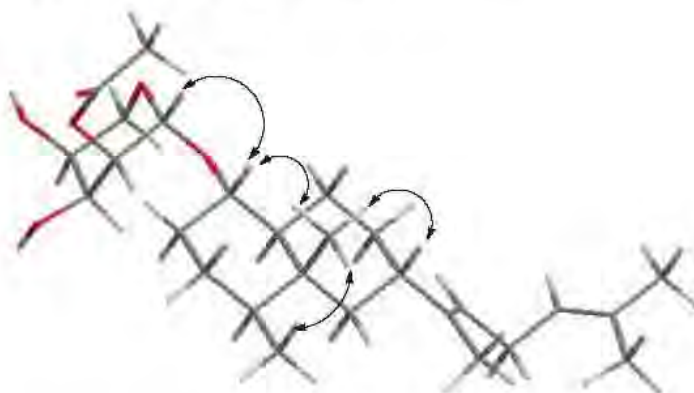


Figura 2.4. Algunas correlaciones NOESY y configuración relativa para E1

La estereoquímica absoluta de E1 fue establecida mediante estudios de dicroísmo circular (DC) del derivado 3',4'-di-*p*-bromobenzoato del fuscósido E (E1b) (figura 2.5), el cual presentaba una quiralidad negativa, representada por la presencia de un primer efecto Cotton positivo en 223 nm y un segundo efecto Cotton negativo en 238 nm, indicando que la configuración de la arabinosa era "D", lo cual se confirmaba por la comparación con el "desdoblamiento Davidov" reportado para el derivado benzoilado del 3 $\beta$ -pregna-5,20-dienil- $\beta$ -D-arabinopiranosido [72]. La coplanaridad mencionada anteriormente del protón anomérico y el protón H-6 de la aglicona permitió entonces correlacionar la estereoquímica del azúcar y la aglicona y establecer de este modo la configuración absoluta del compuesto E1 como 2*R*, 3*S*, 6*S*, 7*S*, 10*S*, 2'*S*, 3'*R*, 4'*R* (figura 2.5).

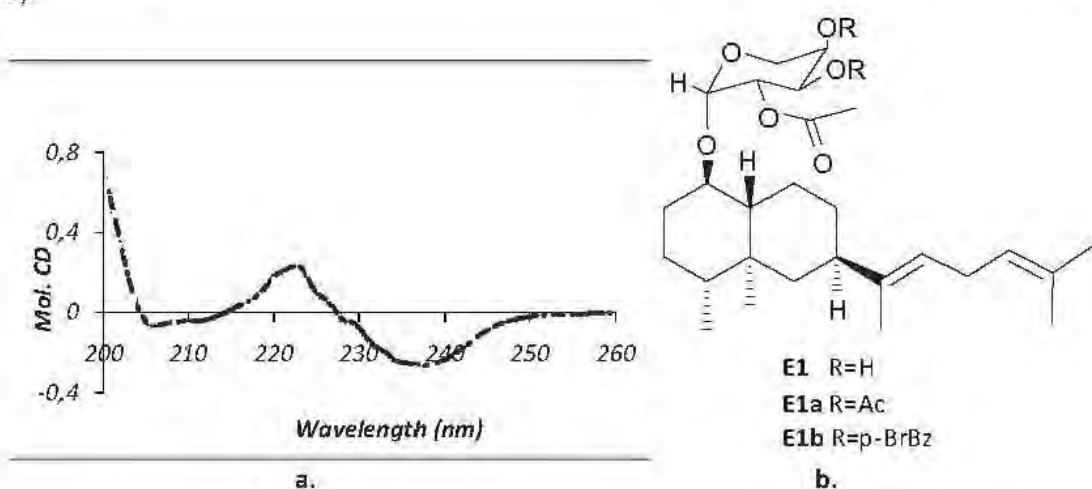


Figura 2.5. a. Espectro de DC de E1b. b. Fuscósido E (E1), peracetato del Fuscósido B (E1a), 3',4'-di-*p*-bromobenzoato del fuscósido E (E1b)

Al realizar la búsqueda de ésta estructura en bases de datos como SciFinder, no se encontró ningún compuesto con las características establecidas para **E1**, por lo que el presente trabajo constituye el primer reporte de este compuesto en la naturaleza, al cual decidimos nombrar como **Fuscósido E**, siguiendo la nomenclatura usada por Shin y Fenical para este tipo de compuestos [49].

### ➤ Elucidación de los compuestos E2 y E3

El compuesto **E2** fue obtenido como un sólido amorfo. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observaron tres señales en  $\delta_H$  1.02 (3H, s), 1.36 (3H, s), y 1.43 (3H, s), correspondientes a los protones de tres metilos unidos a carbonos cuaternarios sp<sup>3</sup>, además de dos singletes en  $\delta_H$  1.71 (3H, s) y 1.79 (3H, s) que indicaban la presencia de dos metilos unidos a carbonos olefínicos. Adicionalmente se observan señales de metilenos sp<sup>3</sup> en la región de 1.49-1.68 ppm. Así mismo, se observan señales características para grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>2</sup> terminales en  $\delta_H$  4.82 (1H, sa)/4.59 (1H, sa) y 4.82 (1H, sa)/4.59 (1H, sa), además de señales para grupos CH sp<sup>2</sup> en  $\delta_H$  5.73 (m), 5.82 (m), 5.85 (1H, m) y 6.47 (m). El análisis del experimento DEPT-135 permitió detectar la presencia de cinco grupos metilo ( $\delta_C$  15.4, 16.6, 24.7, 26.1, 28.5), tres grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>3</sup> ( $\delta_C$  26.5, 32.6, 39.8), dos grupos CH sp<sup>3</sup> ( $\delta_C$  47.7 y 52.7), cuatro grupos CH sp<sup>2</sup> ( $\delta_C$  122.3, 126.5, 135.5, 150.2) y dos grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>2</sup> terminales ( $\delta_C$  109.9, 112.1). Luego de la revisión bibliográfica, se encontró que las señales aquí reportadas para el compuesto **E2** (Tabla 2.2), coincidían con los datos reportados por Gopichand y Schmidt para el fuscól (**21**), aislado de un espécimen de *Eunicea fusca* recolectado en Caicos del Sur (Caribe Central) [2].

El compuesto **E3** fue obtenido como un sólido amarillo amorfo. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se encontraron los mismos desplazamientos químicos antes descritos para el fuscól además de nuevas señales en la región de  $\delta_H$  3.0-5.5, que indicaban la presencia de protones característicos de un azúcar, incluyendo un doblete correspondiente a un protón anomérico en  $\delta_H$  5.11 (1H, d,  $J=3.6$  Hz), lo que sugería la presencia de un azúcar, lo cual se confirmaba con la identificación en el experimento DEPT-135 de señales para los cuatro metinos del azúcar en  $\delta_C$  69.0, 69.6, 71.0, 93.9, éste último correspondiente al carbono anomérico, además de un metileno en  $\delta_C$  62.4 (Tabla 2.2). Estos datos nos permitieron identificar este compuesto (previamente aislado y caracterizado por nosotros [73]) como el fuscósido B (**23**) inicialmente reportado por Shin y Fenical a partir de especímenes de *Eunicea fusca* recolectados en Martinica y Cayos de Tobago [49]. Adicionalmente, el derivado peracetilado **E3a**, obtenido por acetilación de **E3**, presentó en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C los mismos desplazamientos y constantes de acoplamiento del peracetato del fuscósido B [49] (figura 2.6), con lo que se estableció que poseían el mismo azúcar, no obstante la revisión detallada de la correcta nomenclatura para carbohidratos [69] nos permitió establecer que se trata de una  $\beta$ -arabinosa, y no de una  $\alpha$ -arabinosa, reportada por el grupo de Fenical.

Tabla 2.2. Desplazamientos en RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y -<sup>13</sup>C (100 MHz) para E2, E3 y E3a en CDCl<sub>3</sub>; δ en ppm, J en Hz.

No.	E2 δ (H)	δ <sup>b</sup>	E3 δ (H)	δ (C)	E3a δ (H)	δ (C)
1	1.68 (1H, m), 1.49 (1H) <sup>a</sup>	32.7 CH <sub>2</sub>	1.62 (1H) <sup>a</sup> , 1.48 (1H) <sup>a</sup>	32.6 CH <sub>2</sub>	1.62(1H), 1.48 (1H) <sup>a</sup>	32.5 CH <sub>2</sub>
2	2.01 (1H, dd, J=12.4, 3.7)	52.7 CH	2.02 (1H, dd, J=12.3, 3.6)	52.7 CH	2.04 (1H) <sup>a</sup>	52.9 CH
3	-	-	-	147.5 C	-	147.5 C
4	4.82 (1H, sa), 4.59 (1H, sa)	112.1 CH <sub>2</sub>	4.83 (1H, s), 4.60 (1H, s)	112.1 CH <sub>2</sub>	4.82 (1H, m), 4.60 (1H, m)	112.1 CH <sub>2</sub>
5	4.92 (1H, d, J=5.2), 4.88 (1H, sa)	109.9 CH <sub>2</sub>	4.93 (1H, dd, J=6.5, 1.2), 4.89 (1H, sa)	109.9 CH <sub>2</sub>	4.92 (1H, dd, J=6.4, 1.2)	109.9 CH <sub>2</sub>
6	5.82 a	150.2 CH	5.83 (1H, dd, J=17.7, 10.6)	150.2 CH	5.84 (1H, dd, J=11.2, 5.4)	150.2 CH
7	-	-	-	39.7 C	-	39.8 CH
8	1.58 (2H) <sup>a</sup>	39.9 CH <sub>2</sub>	1.59 (2H, m)	39.8 CH <sub>2</sub>	1.59 (2H) <sup>a</sup>	39.8 CH <sub>2</sub>
9	1.58(2H) <sup>a</sup>	26.5 CH <sub>2</sub>	1.59 (2H, m)	26.5 CH <sub>2</sub>	1.59 (2H) <sup>a</sup>	26.5 CH <sub>2</sub>
10	1.98 (1H, m)	47.7 CH	1.98 (1H, m)	47.7 CH	1.99 (1H) <sup>a</sup>	47.6 CH
11	-	-	-	144.3 C	-	144.2 C
12	5.85 (1H, m)	122.3 CH	5.89 (1H, d, J=11.2)	122.2 CH	5.79 (1H) <sup>a</sup>	122.3 CH
13	6.47 (1H, m)	123.1 CH	6.44 (1H, dd, J=15.6, 10.8)	126.6 CH	6.39 (1H, dd, J=15.2, 10.4)	126.2 CH
14	5.73 (1H, m)	139.3 CH	5.60 (1H, d, J=15.6)	135.4 CH	5.55 (1H, d, J=15.6)	135.5 CH
15	-	-	-	77.5 C	-	77.4 C
16	1.70 (3H, s)	24.8 CH <sub>3</sub>	1.71 (3H, s)	24.7 CH <sub>3</sub>	1.71 (3H, s)	24.7 CH <sub>3</sub>
17	1.01 (3H, s)	16.6 CH <sub>3</sub>	1.02 (3H, s)	16.6 CH <sub>3</sub>	1.01 (3H, s)	16.6 CH <sub>3</sub>
18	1.79 (3H, s)	15.4 CH <sub>3</sub>	1.79 (3H, s)	15.4 CH <sub>3</sub>	1.78 (3H, s)	15.4 CH <sub>3</sub>
19	1.35 (3H, s)	29.9 CH <sub>3</sub>	1.36 (3H, s)	28.6 CH <sub>3</sub>	1.32 (3H, s)	27.5 CH <sub>3</sub>
20	1.35 (3H, s)	29.9 CH <sub>3</sub>	1.43 (3H, s)	26.1 CH <sub>3</sub>	1.36 (3H, s)	26.4 CH <sub>3</sub>
1'	-	-	5.11 (1H, d, J=3.6)	93.9 CH	5.22 (1H, d, J=3.6)	91.5 CH
2'	-	-	3.78 (1H, dd, J=9.6, 2.8)	69.6 CH	5.11 (1H, dd, J=10.8, 3.6)	69.4 CH
3'	-	-	3.75 (1H) <sup>a</sup>	71.0 CH	5.37 (1H, dd, J=10.7, 3.4)	68.5 CH
4'	-	-	3.98 (1H, sa)	69.0 CH	5.34 (1H, sa)	67.4 CH
5'	-	-	3.94 (1H), 3.69 (1H, dd, J=12.4, 1.5)	62.1 CH <sub>2</sub>	4.15 (1H)a, 3.64 (1H, dd, J=13.0, 1.8)	60.2 CH <sub>2</sub>
OAc	-	-	-	171.5 C	-	170.4 C
	-	-	-	-	-	170.2 C
	-	-	-	-	-	170.1 C
	-	-	2.09 (3H, s)	20.4 CH <sub>3</sub>	2.12 (3H, s)	21.0 CH <sub>3</sub>
	-	-	-	-	2.07 (3H, s)	20.8 CH <sub>3</sub>
	-	-	-	-	2.01 (3H, s)	20.7 CH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Señales solapadas. <sup>b</sup> Datos obtenidos por DEPT-135



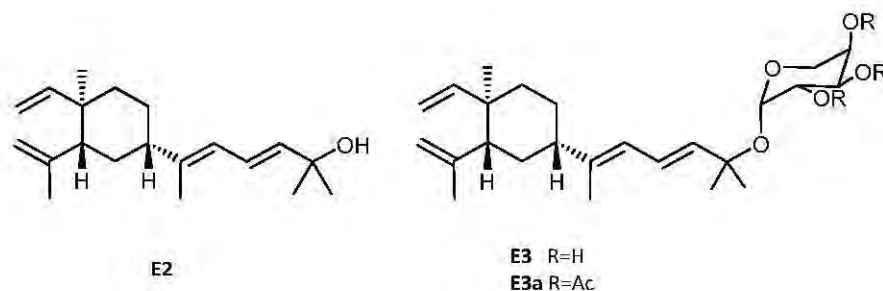


Figura 2.6. Fuscol (E2), Fuscósido B (E3), peracetato del Fuscósido B (E3a)

### ➤ Elucidación de lo compuesto E4

El compuesto **E4** se obtuvo como un aceite viscoso e incoloro a partir de las fracciones de baja polaridad. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se observaron dos señales en  $\delta_H$  0.82 (*d*,  $J=8$ Hz) y 0.88 (*d*,  $J=4$ Hz) que corresponden a dos grupos metilo unidos a un metino  $sp^3$ ; además, de una señal en  $\delta_H$  1.53 (3H, *s*) que pertenece a un metilo unido a un carbono cuaternario  $sp^2$ . Adicionalmente, en la región de  $\delta_H$  2.0-3.0 se observan multipletes que corresponden a metilenos  $sp^3$ . Señales características de un exometileno en  $\delta_H$  4.78 (*dd*,  $J=20.4, 1.6$  Hz), además de señales en  $\delta_H$  5.14 (*dd*,  $J=11.2, 4.8$  Hz),  $\delta_H$  5.26 (*dd*,  $J=16, 10$  Hz) y  $\delta_H$  5.80 (*d*,  $J=15.6$  Hz) indicaban la presencia de cinco metinos olefinicos (Tabla 2.3). El análisis conjunto de los espectros RMN-<sup>13</sup>C y DEPT-135, permitió establecer la presencia de señales para tres grupos metilo ( $\delta_C$  15.9, 19.3, 20.8), cinco metilenos ( $\delta_C$  26.5, 29.3, 34.5, 40.7, y 109.1, ésta última característica del exometileno, junto con cinco metinos ( $\delta_C$  32.8, 52.9, 129.7, 133.6, 135.5) y dos carbonos cuaternarios ( $\delta$  134.0, 148.9) (Tabla 2.3). Estos desplazamientos fueron idénticos a los reportados para el germacreno D (aislado previamente por nosotros [73]). Adicionalmente la rotación óptica registrada para el compuesto **E4** ( $[\alpha]_D = +1.6$ ) permitió establecer que se trataba del (+)-germacreno D (figura 2.7), originalmente reportado en *Solidago canadensis*, compuesto también aislado del octocoral *Eunicea mamosa* y cuyo enantiómero se encuentra ampliamente distribuido en plantas [74].

Tabla 2.3. Desplazamientos en RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y -<sup>13</sup>C (100 MHz) para **E4** y reportados para el (+)-germacreno D [74], en CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz.

No.	$\delta$ (H)	E4 $\delta$ (C)	(+)-Germacreno D $\delta$ (C)
1	5.14 (1H, <i>dd</i> , $J=11.2, 4.8$ )	129.7 CH	129.7
2	2.40(1H, <i>m</i> ), 1.98(1H, <i>m</i> )	29.3 CH <sub>2</sub>	29.3
3	2.46(1H, <i>m</i> ), 2.14(1H, <i>m</i> )	34.5 CH <sub>2</sub>	34.5
4		148.9 C	148.9
5	5.80 (1H, <i>d</i> , $J=16$ )	135.5CH	135.5
6	5.26 (1H, <i>dd</i> , $J=16, 10$ )	133.6 CH	133.6
7	2.00 (1H, <i>m</i> )	52.9 CH	53.0
8	1.44 (2H, <i>m</i> )	26.5 CH <sub>2</sub>	26.5
9	2.26 (2H, <i>m</i> )	40.7 CH <sub>2</sub>	40.7
10		134.0 C	134.0
11	1.38 (1H, <i>m</i> )	32.8 CH	32.8
12	0.82 (3H, <i>d</i> , $J= 8$ )	19.3 CH <sub>3</sub>	15.3
13	0.88 (3H, <i>d</i> , $J=4$ )	20.8 CH <sub>3</sub>	20.8
14	1.53 (3H, <i>s</i> )	15.9 CH <sub>3</sub>	15.9
15	4.78 (2H, <i>dd</i> , $J=20.4, 1.6$ )	109.1 CH <sub>2</sub>	109.0

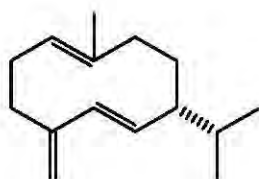
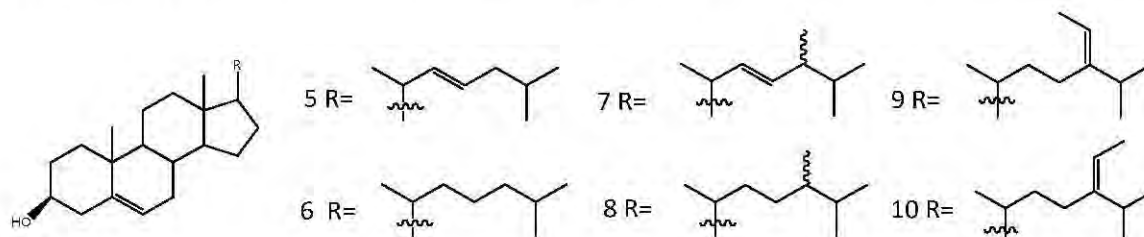


Figura 2.7. (+)-Germacreno D (E4)

### ➤ Elucidación de la mezcla de compuestos E5-E10

Los compuestos **E5-E10** se aislaron como una mezcla, cuyo Rf en CCD coincidía con el colesterol, usado como patrón, razón por la cual se decidió analizarlos mediante GC-MS. Los análisis y comparación de los tiempos de retención relativa al colesterol (Trr) junto con sus iones moleculares y patrones de fragmentación [75] permitieron establecer la identidad de los compuestos 5-10 como: 22-dehidrocolesterol (**E5**), colesterol (**E6**), 24-metil-22-dehidrocolesterol (**E7**), 24-metilcolesterol (**E8**), fucosterol (**E9**), isofucosterol (**E10**) (figura 2.8) [14], cuya diferencia radica en el tipo de cadena lateral unida al núcleo esteroidal.

Figura 2.8. Esteroles (E5-E10) aislados de *E. Fusca*

Estudios previos de *E. fusca* recolectados en diferentes locaciones del mar Caribe norte no han presentado variación de su composición química debido a variaciones geográficas [49]. Sin embargo, otros estudios sobre este coral demostraron que el fuscól (aglicona del fuscósido B) es producido por microalgas simbióticas, las cuales como se mencionaba anteriormente pueden ser susceptibles de variaciones geográficas [58]. Estos datos sugieren entonces que diferentes compuestos pueden ser encontrados en especímenes recolectados en la parte Sur del mar Caribe. Además, otras especies de *Eunicea* como *E. mammosa* [76] han mostrado la variación geográfica aquí encontrada. Nuestros datos presentan diferencias en cuanto al contenido de fuscósidos (cantidad, concentración, y compuestos mayoritarios) respecto a lo encontrado en estudios sobre este octocoral recolectado en Florida, Caicos, St. Croix, Martinica y los Cayos de Tobago [49], sugiriendo que el contenido de los fuscósidos más abundantes es susceptible de variación relacionada con la zona geográfica de su recolección, por lo que del estudio de especímenes de *E. fusca* de otras zonas del Caribe Colombiano podría esperarse una comunidad holobiótica diferente y por ende la presencia de nuevos fuscósidos.

### 2.2.2 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados se realizó mediante el modelo de edema auricular inducido por TPA, el mismo con el que se determinó la actividad del extracto de *E. fusca*. Esto con el fin de determinar la contribución de los compuestos aislados en la notable actividad antiinflamatoria presentada por el extracto determinada en un 83.5% de inhibición de la inflamación (figura 1.4, página 17). Los compuestos evaluados fueron el fuscósido E, el fuscósido B, el fuscol y el (+)-germacreno D (figura 2.9); los esteroides no se evaluaron debido a que la búsqueda se centra en compuestos antiinflamatorios tipo AINES, es decir que no posean núcleo esteroidal, ya que estos podrían presentar los efectos colaterales perjudiciales que se mencionaron en el primer capítulo (página 7).

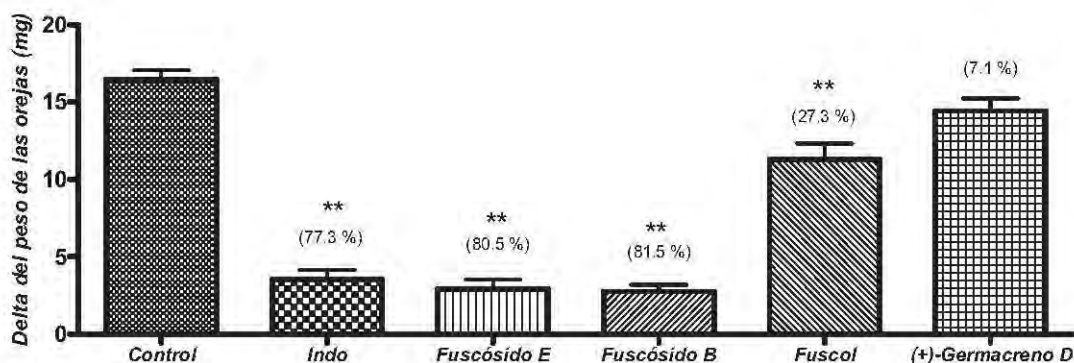


Figura 2.9. Actividad antiinflamatoria de los compuestos E1-E4 obtenidos de *E. fusca* (0.5 mg/oreja). Indo (Indometacina 0.5 mg/oreja). Datos expresados como la media  $\pm$  E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnet: \*\*p<0,01). En paréntesis el porcentaje de inhibición de la inflamación.

Los datos anteriores muestran el efecto de los compuestos evaluados sobre el edema producido por la aplicación del TPA, el cual causó una fuerte inflamación en la oreja del ratón. Además, se observa la acción antiinflamatoria de la indometacina que redujo el edema con un porcentaje de inhibición del 77.3%, con lo que se confirma entonces la validez del ensayo y los resultados mostrados por los compuestos evaluados.

Tabla 2.4. Efectos de los compuestos aislados de *E. Fusca* sobre el edema auricular inducido por TPA.

Tratamiento	$\Delta$ edema (mg) $\pm$ EEM <sup>a</sup>	% Inhibición
Control	16.5 $\pm$ 3.2	
INDO	3.6 $\pm$ 3.1**	77.3
Fuscósido E	2.9 $\pm$ 1.6**	80.5
Fuscósido B	2.8 $\pm$ 1.3**	81.5
Fuscol	11.3 $\pm$ 3.1**	27.3
(+)-Germacreno D	14.4 $\pm$ 2.3	7.1

<sup>a</sup> Datos expresados como la media  $\pm$  E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnet: \*\*p<0,01)

La aplicación tópica del fuscósido E y del fuscósido B sobre la oreja del ratón logró reducir en gran medida el edema, observándose altos niveles de inhibición de la inflamación producida por el TPA, con porcentajes de inhibición superiores a los presentados por la indometacina, todos a la

misma dosis (500 µg/oreja) tal y como se muestra en la Tabla 2.4. Este resultado corrobora lo obtenido por Jacobson y Jacobs para el fuscósido B en el mismo modelo [50], en donde este compuesto presentó porcentajes de inhibición del 96% a la misma dosis evaluada por nosotros. Este efecto es atribuido a su capacidad de inhibir selectiva e irreversiblemente la biosíntesis del LTC<sub>4</sub>, potente mediador proinflamatorio producto de la cascada del ácido araquidónico, mediante la inhibición de 5-LOX [51]. Esto es importante dado que los leucotrienos como el LTC<sub>4</sub> actúan como potentes agentes quimiotácticos, por lo que su temprana y continua inhibición retrasa significativamente la migración de los neutrófilos al área afectada, efecto que ha sido demostrado por varias investigaciones en las que se ha observado que la inhibición selectiva de COX y LOX efectivamente reduce la migración de los neutrófilos a las regiones inflamadas, mitigando además el daño causado por la liberación de EORs y ENRs, enzimas proteolíticas, citoquinas y otros mediadores proinflamatorios [51, 66]. Adicionalmente, el LTC<sub>4</sub> promueve las interacciones neutrófilo-endotelio induciendo broncoconstricción y aumentando en los espasmos de las vías respiratorias [77]. También, junto con otros leucotrienos estimulan la hipertrofia del músculo liso, hipersecreción de moco, la afluencia de eosinófilos en las vías respiratorias, y algunos de ellos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) conforman una mezcla denominada SRS-A (por sus siglas en inglés *Slow-reacting substance of anaphylaxis*) implicada en reacciones de hipersensibilidad tipo I [1, 2]. Por esta razón, la inhibición selectiva de los leucotrienos es un blanco importante en el tratamiento del asma y otras enfermedades alérgicas como la rinitis alérgica, dermatitis atópica y la urticaria crónica [77].

De otro lado el fuscósido E logró un 80.5% de inhibición de la inflamación, el cual es superior al del fármaco de referencia indometacina (77.3%), y muy similar al fuscósido B (83.8%) (Tabla 2.4), inhibidor selectivo de la biosíntesis de LTC<sub>4</sub> [50, 51], sugiriendo que estos dos compuestos son responsables, aunque no los únicos, de la actividad mostrada por el extracto de *E. fusca*. Por el contrario el fuscol presentó bajos niveles de inhibición (27.1%), lo que contrasta con su capacidad de inhibir la transformación de ácido araquidónico a LTC<sub>4</sub> en pruebas *in vitro* [51], este hecho indicaría que si bien la aglicona puede ser responsable de la actividad, es necesaria la presencia del azúcar para presentar efectos antiinflamatorios *in vivo*, probablemente debido a que al estar glicosidada aumenta la permeabilidad, permitiendo su paso a través de las diferentes capas de la piel.

De esta manera se logró el aislamiento de un compuesto nuevo y tres conocidos junto con la identificación de la mezcla de 6 esteroides conocidos a partir del octocoral *E. fusca*, además de lo cual se realizó la evaluación de su actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema auricular inducido por TPA, ensayo con el que se logró identificar el nuevo fuscósido E como un fuerte inhibidor de la inflamación, confirmando así el potencial de este octocoral, como productor de metabolitos con actividad antiinflamatoria.

## 2.3 METODOLOGÍA

### 2.3.1 General

Para la cromatografía en columna (CC) se usó sílica gel (0.043–0.060 mm, Merck). La cromatografía en capa delgada (CCD) se desarrolló en cromatoplasmas de sílica gel (0.2 mm de espesor) impregnadas con indicador fluorescente y revelando con lámpara UV (254 y 366 nm)

además de aspersión con una solución de sulfato cérico amónico al 1% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (65% en EtOH) o una solución de ácido fosfomolibdico (8% en IPA) seguido de calentamiento.

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C mono- y bidimensionales se registraron en un espectrómetro Bruker AV-400 (400 MHz para RMN-<sup>1</sup>H y 100 MHz para RMN-<sup>13</sup>C) empleando como solventes CDCl<sub>3</sub> con grado de deuteración 99.5 % y 1 % en volumen de SiMe<sub>4</sub> como estándar interno. Los espectros de HR-ESI-MS fueron obtenidos en un espectrómetro Shimadzu LC-IT-TOF por inyección directa.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un equipo Merck-Hitachi 6000 equipado con una bomba inteligente Merck-Hitachi L-6200A y un detector de arreglo de diodos (DAD) L-4500. La CLAE preparativa se realizó en un cromatógrafo Merck-Hitachi 6000 equipado con una bomba Merck-Hitachi L-6000 A y un detector UV-VIS L-4250 (a 210 nm). Para ésta última se usó una columna LiChrospher 100 (210×10 mm i.d., 10 μm). Los análisis por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A acoplado a un detector MS-QP5050A y equipado con una columna de sílica fundida HP-1 (25 m × 0.2 mm i.d; 0.33 μm de grosor de la fase estacionaria) mantenida a 270°C; como gas de arrastre fue usado He a 1 ml/min; se inyectó de manera manual 1 μl de solución de los analitos en acetona (1 mg/mL) con un split de 1:10. Las temperaturas del inyector y de la interface fueron fijadas a 300°C. Para la espectrometría de masas por impacto electrónico la fuente de ionización se mantuvo a +70 eV. Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Polartronic E, Schmidt+Haensch. Los espectros de dicroísmo circular fueron obtenidos en MeCN y registrados en un espectropolarímetro JASCO J810. Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500, series 1000. Todos los solventes usados fueron de grado analítico (Merck-Alemania).

### 2.3.2 Material Animal

Especímenes de *Eunicea fusca* fueron recolectados en la región de punta de Betín (Santa Marta), a una profundidad de 5 a 25 m, mediante buceo autónomo SCUBA por el Dr. Sven Zea, profesor de la Sede Caribe de la Universidad Nacional de Colombia. Los especímenes fueron clasificados por la Dra. Mónica Puyana, profesora de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, basándose en preparados de espículas y morfología de las colonias usando las claves taxonómicas de los trabajos de Bayer [53]. Individuos de *E. fusca* fueron depositados en la colección de invertebrados del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia bajo el código ICN-MHN-Po-252. Una vez recolectadas las muestras fueron inmediatamente congeladas y mantenidas a -4°C hasta el momento de su extracción.

### 2.3.3 Extracción del octocoral *E. fusca*

El material animal (500 g) se cortó en finos trozos y fue extraído tres veces con una mezcla de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) a temperatura ambiente por 24 horas cada vez. Este extracto se filtró y se concentró a presión reducida obteniendo 50 g de extracto total.

### 2.3.4 Fraccionamiento del Extracto Total

El extracto total se sometió a partición entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1:1 v/v; 1.2 L). La fracción orgánica (24.5 g) fue sometida a CC flash sobre sílica gel eluyendo con 500 mL de mezclas de hexano (100%), hexano/benceno (50:50 v/v), benceno (100%), benceno/EtOAc (90:10 v/v), benceno/EtOAc (80:20 v/v), benceno/EtOAc (50:50 v/v), EtOAc (100%) y EtOAc/MeOH (80:20 v/v), obteniéndose ocho fracciones (**FI-FVIII**).

La fracción **FII** (1.6 g) fue sometida a CC sobre sílica gel, utilizando como eluente un gradiente discontinuo de benceno/EtOAc (50:50 v/v a 40:60 v/v). Se recolectaron 7 fracciones, **FII.1-FII.7**, de acuerdo a su perfil por CCD. La fracción **FII.4** (441 mg) se analizó por RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  según las condiciones descritas en el numeral 2.3.1, pudiendo establecer que estaba compuesta principalmente por el compuesto **E1**.

La fracción **FI** (1 g) se sometió a CC en sílica gel utilizando como eluente un gradiente discontinuo de hexano, hexano-benceno 70:30 v/v, hexano-benceno 50:50 v/v, benceno-EtOAc 95:5 v/v, EtOAc-MeOH 90:10 v/v, obteniendo fracciones de 6 mL las cuales se controlaron por CCD y se agruparon en 12 fracciones, **FI.1-FI.12**. La fracción **FI.8** (122 mg) fue posteriormente sometida a CC sobre sílica gel, eluyendo con mezclas de hexano/EtOAc (90:10 v/v a 40:60 v/v) obteniéndose 11 mg del compuesto **E2**. De la fracción **FI.1** se tomaron 445 mg y se sometieron a una CC isocrática sobre sílica gel usando como fase móvil hexano, de esta manera entonces se recolectaron fracciones de 6 mL, las cuales se agruparon de acuerdo a su perfil en CCD en 5 fracciones **FI.1.1 - FI.1.5**. La fracción **FI.1.1** (63.8 mg) fue analizada por RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  según las condiciones descritas en el numeral 2.3.1, permitiendo la identificación del compuesto **E4**. La fracción **FI-9** eluida con benceno/EtOAc 90:100 v/v (78 mg) fue analizada por HRGC-MS, determinado que se trataba de la mezcla de seis esteroides (**E5-E10**).

De otro lado la fracción **FIII** (400 mg) se sometió a CC sobre sílica gel eluyendo con mezclas de polaridad ascendente de benceno/EtOAc (30:70 v/v a 20:80 v/v) recolectando fracciones de 6 mL las cuales fueron reagrupadas de acuerdo a su perfil en CCD en 3 fracciones **FII.1-FIII.3**. La fracción **FIII.2** (170 mg) fue sometida nuevamente a CC sobre sílica gel con un gradiente discontinuo de benceno/EtOAc (30:70 v/v a 20:80 v/v) recolectando fracciones de 6 mL las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su perfil en CCD en 5 fracciones **FIII.2.1-FIII.2.5**. De éstas, la fracción **FIII.2.4** (58 mg) se purificó mediante CLAE en una columna RP-18 semipreparativa LiChrospher 100 (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  80:20 v/v, 3 mL/min,  $\lambda = 210$  nm) obteniéndose 30 mg del compuesto **E3** ( $t_R = 32.1$  min.).

En la figura 2.10 se presenta el diagrama de fraccionamiento del extracto de *Eunicea fusca*.

### 2.3.5 Reacciones de Derivatización

#### ➤ Obtención de los derivados acetilados E1a y E3a

55 mg del compuesto **1** fueron tratados con 3.5 ml de anhídrido acético en 2.0 mL de piridina seca. La reacción fue mantenida en agitación constante a temperatura ambiente durante 4 hs y monitoreada por CCD. La mezcla de reacción fue concentrada y purificada en CC sobre sílica gel

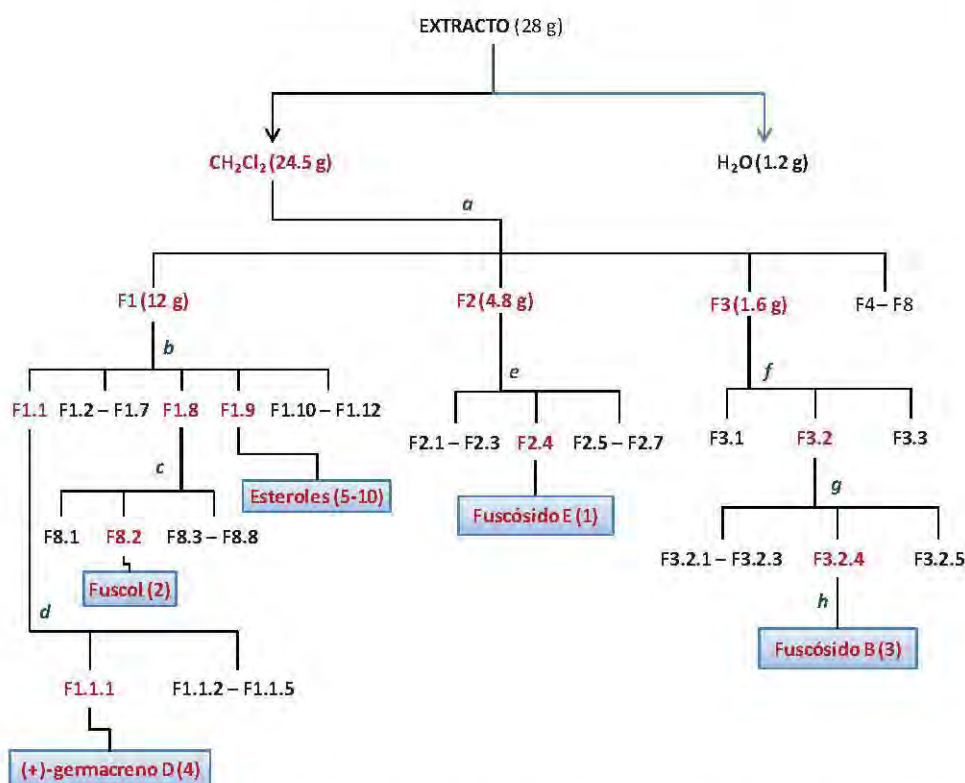
(hexano/EtOAc 90:10), obteniéndose el compuesto **1a** (22 mg, 34%). De manera similar 10 mg del compuesto **3** fueron sometidos a acetilación obteniéndose el compuesto **3a** (10 mg, 82%).

➤ **Obtención del derivado benzoilado E1b**

Una solución del compuesto **1** (4 mg) en piridina (2 mL) fue tratada con LiH (0.2 mg), luego de lo cual fue adicionado cloruro de *p*-bromobenzoilo (0.5 mL). La reacción se mantuvo en agitación constante por 2 horas a temperatura ambiente. Cuando la reacción se completó se adicionó agua a la mezcla y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Posteriormente la fase orgánica se concentró a presión reducida y el residuo fue sometido a CC sobre sílica gel (benceno 100% a EtOAc 100%) para obtener el compuesto **1b** (0.5 mg, 12.5%) [11].

**2.3.6 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de los compuestos E1-E4**

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos puros se realizó mediante el modelo de edema auricular inducido por TPA, como se explica en el numeral 1.3.3 (Cap.I, página 31).



**Figura 2.10.** a. CC SiO<sub>2</sub>, Hexano→AcOEt/MeOH (80:20). b. CC SiO<sub>2</sub>, Hexano-Benceno (7:3-1:1) → Benceno-AcOEt (95:5-9:1). c. CC SiO<sub>2</sub>, Hexano/AcOEt (9:1-4:6). d. CC SiO<sub>2</sub>, Isocrática Hexano. e. CC SiO<sub>2</sub>, Benceno-AcOEt (1:1-4:6). f. CC SiO<sub>2</sub>, Benceno-AcOEt (1:1-1:9). g. CC SiO<sub>2</sub>, Benceno-AcOEt (3:7-2:8). h. CLAE-pre, LiChrospher RP-18 MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2, 3 mL/min; UV=210nm.

### 2.3.7 Datos espectroscópicos de los compuestos aislados

- *Fuscósido E (E1)*: sólido amorfo amarillo.  $[\alpha]_D = -80$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3425, 2924, 1743, 1068. RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ : ver *Tabla 2.1*. HR-ESI-MS (+): 487.3023 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ,  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{Na}$ ; calc. 487.3036).
- *Peracetato del fuscósido E (E1a)*: sólido amorfo amarillo.  $[\alpha]_D = -60$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ) IR (KBr): 3417, 1747, 1230, 1072. RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ : ver *Tabla 2.1*. HR-ESI-MS (+): 547.3265 ( $[\text{M} - \text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_8$ ; calc. 547.3265).
- *p-bromobenzoato del fuscósido E (E1b)*: sólido amorfo blanco. CD (MeCN, 0,006 M)  $\Delta \epsilon$  (nm) 0.23 (223), -0.27 (238). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 8.07 (2H, *d*,  $J = 7.4$ ), 7.90 (2H, *d*,  $J = 7.6$ ), 7.35 (2H, *d*,  $J = 7.9$ ), 5.50 (2 H, *m*), 5.21 (1H, *m*), 4.81 (1H, *d*,  $J = 3.2$ ), 4.26 (1 H, *d*,  $J = 12.8$ ), 3.27 (1H, *m*), 2.67 (1H, *m*), 2.02 (3H, *s*), 1.23 (3H, *s*), 1.22 (3H, *s*), 1.21 (3H, *s*), 0.82 (3H, *d*,  $J = 6.8$ ), 0.76 (3H, *s*).
- *Fuscol (E2)*: Aceite translúcido. RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ : ver *Tabla 2.2* [2].
- *Fuscósido B (E3)*: sólido amorfo amarillo.  $[\alpha]_D = -134$  (c 0.48,  $\text{CHCl}_3$ ). RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ : ver *Tabla 2.2* [3].
- *Peracetato del fuscósido B (E3a)*: sólido amorfo amarillo.  $[\alpha]_D = -102$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ). RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ : ver *Tabla 2.2* [3].
- *(+)-Germacreno D (E4)*: Aceite transparente.  $[\alpha]_D = + 1.6$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ). RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ : ver *Tabla 2.3* [13].
- *22-dehidrocolesterol (E5)*: Trr: 0.93 (12.8%). *Colesterol (E6)*: Trr: 1 (13.8%). *24-metil-22-dehidrocolesterol (E7)*: Trr: 1.09 (15.7%). *24-metilcolesterol (E8)*: Trr: 1.23 (17.0%). *Fucoesterol (E9)*: Trr: 1.59 (20.4%). *Isocufoesterol (E10)*: Trr: 1.52 (21.0%) [14].



## Capítulo 3.

# ***Plexaura homomalla*: Aislamiento e Identificación de Prostaglandinas y Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria**

## **3.1 GENERALIDADES**

### **3.1.1 Descripción Morfológica**

*Plexaura homomalla* es un octocoral que pertenece al Phylum *Cnidaria*, Clase *Anthozoa*, Subclase *Octocorallia*, Orden *Alyconacea*, Familia *Plexauridae*. Este octocoral se ha encontrado en todo el Atlántico tropical oeste desde las Bermudas hasta Curazao y desde México hasta las Antillas Menores, generalmente en aguas que van desde un metro de profundidad hasta profundidades de unos 20 m, 30 m o 40 m [78]. *P. homomalla* forma colonias arborescentes de tamaños que alcanzan hasta 1,5 m de altura, compuestas por un eje de apoyo de escleroproteína sobre la que se extiende la mesoglea y el ectodermo que se encuentra compuesto por espículas que protegen los pólipos, el espacio entre el ectodermo y la mesoglea denominado cenénquima está compuesto de espículas, escleritas y canales endodermales y gastrodermales. Los pólipos o zooides están incrustados en esta cenénquima y terminan en los canales gastrodermales que están alineados con el endodermo y a su vez desembocan en una serie de canales madre longitudinales que rodean la corteza axial en las ramas pequeñas, en las ramas grandes y en el tallo principal. La superficie de la cenénquima y los zooides está cubierta por el ectodermo y se invierte en el epitelio axial ectodérmico que es responsable de su formación. *P. homomalla* posee solenias gastrodermales de dos tipos claramente diferentes lo que es inusual entre gorgonáceos en gran parte de su crecimiento, consecuentemente hay una reducción de la mesoglea al final de su desarrollo [78, 79]. En *P. homomalla*, el eje se compone de una cámara transversal o medula axial, que es alargada apicalmente mediante la adición de capas delgadas sucesivas. Las

capas concéntricas del material protéico se agregan para formar la corteza axial proximal, proporcionando espesor y resistencia a la colonia a medida que crece. Al principio, estas capas son espacios en forma de ampollas empaquetadas (“lóculos”) que se encuentran particularmente en la familia *Plexauridae*, pero más tarde se convierten en capas densas y compactas, que forman el material “leñoso” del eje [80] (figura 3.1).



Figura 3.1. *Plexaura homomalla* (tomado de [http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/octocorals/plexaura\\_homomalla.html](http://coralpedia.bio.warwick.ac.uk/sp/octocorals/plexaura_homomalla.html))

### 3.1.2 Estudios Químicos

El octocoral *P. homomalla* fue uno de los primeros organismos marinos en ser estudiado, y es reconocido por ser una fuente importante de compuestos conocidos como prostaglandinas, las cuales se suelen clasificar según la configuración absoluta del centro asimétrico C-15 como de tipo *R* o de tipo *S*. Estas prostaglandinas son sintetizadas en *P. homomalla* a partir del ácido araquidónico por dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX), que se diferencian únicamente en un residuo de la posición 349, así COX var349Ile es la responsable de la producción de prostaglandinas tipo *R*, mientras que COX var349Val es la responsable de la producción de las prostaglandinas tipo *S* [81].

De esta manera se ha encontrado *P. homomalla* que produce prostaglandinas de la variedad *R* o *S* dependiendo de la zona geográfica donde se encuentre este octocoral, así por ejemplo especímenes recolectados en los Cayos de Florida producen prostaglandinas de tipo *R*, mientras que aquellos recolectados en Bahamas o Islas Caimán producen prostaglandinas de tipo *S*. Adicionalmente, se han encontrado en muestras recolectadas en el Sur de Florida algunos casos raros en los que en el mismo octocoral se encuentran presentes este par de estereoisómeros, que se diferencian por su comportamiento en CCD, lo que ha servido como un método rápido de *screening* de los compuestos producidos por estos especímenes [61, 82, 83].

Es así como a finales de los 60's Weinheimer y colaboradores, a partir de especímenes recolectados en la Florida lograron el aislamiento de cantidades relativamente altas (1-3.5 % del peso húmedo del coral, 2-3% del peso seco) de (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**1**) y su éster metílico acetilado en C-15 (**2**) [60] (Tabla 3.1). Su estructura fue inicialmente propuesta mediante estudios extensos de degradación química y análisis espectroscópicos. La determinación de la estereoquímica del centro C-15 de estas prostaglandinas se obtuvo por la conversión de la (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**1**) a (15*R*)-

PGB<sub>2</sub> (**4**), cuyo valor de rotación óptica es negativo y cuyo efecto Cotton fue inverso al presentado por la (15*S*)-PGB<sub>2</sub> (**5**) obtenida a partir de (15*S*)-PGA<sub>2</sub> (**9**) (Tabla 3.1), lo que permitió establecer que se trataban de epímeros en C-15 de ésta última [82, 84]. Adicionalmente, el ácido  $\alpha$ -acetoxiheptanoico obtenido por ozonólisis del ester metílico acetilado **2** presentó una configuración 15(*R*) confirmando la estereoquímica propuesta para este centro en **1** y **2** [60]. Los epímeros *R* en C-15 no presentaron la capacidad de disminuir la presión sanguínea, que si presentaban las prostaglandinas tipo *S* [60]. Lo anterior indica claramente que es indispensable determinar la estereoquímica en este carbono para las prostaglandinas, puesto que esta propiedad se encuentra muy relacionada con su actividad farmacológica.

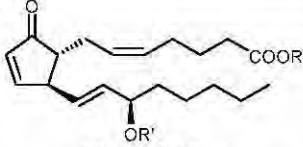
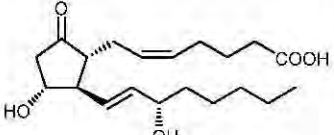
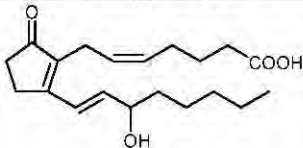
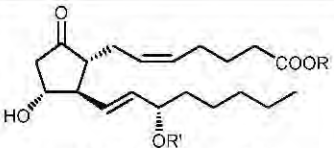
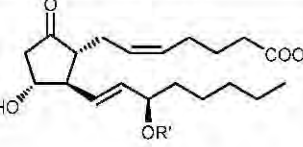
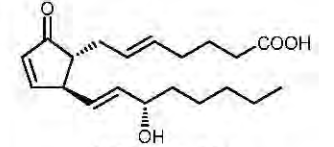
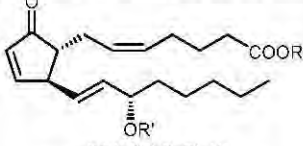
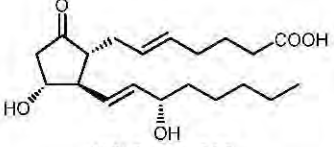
Estudios en muestras recolectadas en el sureste de la Florida, permitieron el aislamiento de (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**1**), y su éster metílico acetilado **2** como componentes mayoritarios, además de las prostaglandinas minoritarias (15*R*)-PGA<sub>2</sub> Me (**3**), (15*R*)-PGE<sub>2</sub> (**6**) y (15*R*)-PGE<sub>2</sub> Me (**7**) (Tabla 3.1). La elucidación estructural de estos compuestos se realizó por análisis y comparación de su comportamiento cromatográfico en CCD y en CG-MS, para estos últimos análisis se debieron obtener derivados oxidados mediante ozonólisis, además de derivados trimetilsililados [84]. Adicionalmente, se estableció la presencia de pequeñas cantidades de (15*S*)-PGA<sub>2</sub> (**9**), (15*S*)-PGE<sub>2</sub> (**12**) [84] y de los respectivos derivados esterificados de PGA<sub>2</sub> variedad *S* (**10**, **11**) en cantidades similares a las prostaglandinas variedad *R* (1.4% (15*S*)-PGA<sub>2</sub> y 0.4% de (15*S*)-PGA<sub>2</sub> Me) [61, 82]. Posteriormente, durante la purificación de (15*S*)-PGA<sub>2</sub> (**9**) se detectó la 5-*trans*-PGA<sub>2</sub> (**15**), determinando además que en este espécimen el contenido del isómero *trans* estaba entre un 5 y 15 % con respecto al contenido de (15*S*)-PGA<sub>2</sub> (**9**). La determinación de su estructura se realizó mediante estudios de transformación química, en los cuales se obtuvieron el  $\beta$ -cetol 5-*trans*-PGE<sub>2</sub> (**16**), 5-*trans*-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (**17**) y la 5-*trans*-PGF<sub>2 $\beta$</sub>  (**18**) [85]. Recientemente, a partir de muestras recolectadas en los cayos de Florida se aisló el diéster de la PGE<sub>2</sub> variedad *R* (**8**) [83]. Los derivados esterificados de PGE<sub>2</sub> (variedad *S*) (**13**) y (**14**) han sido obtenidos sintéticamente por conversión de PGE<sub>2</sub> (*S*) (Tabla 3.1) [61].

Del extracto de *P. homomalla* recolectada en Islas Caimán y luego de someterlo a hidrólisis enzimática se obtuvo el diéster 13,14-dehidro PGA<sub>2</sub> (**19**), el acetato de 13,14-*cis*-PGA<sub>2</sub> (**20**), el aducto interno de Michael (**21**) y trazas de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (**22**) (Tabla 3.1). La elucidación de estos compuestos se realizó mediante transformaciones químicas y una combinación de técnicas espectroscópicas (IR, RMN, MS) y técnicas quiroópticas (ORD y CD) [86].

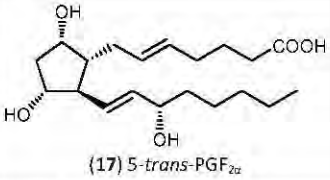
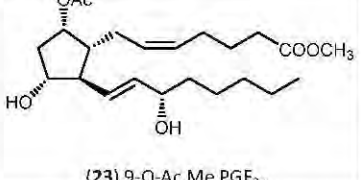
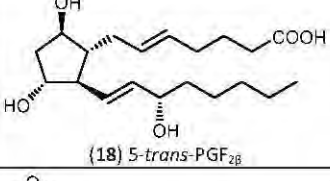
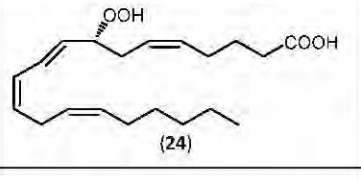
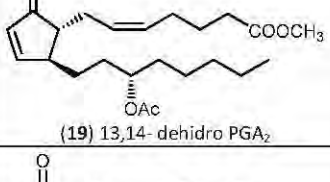
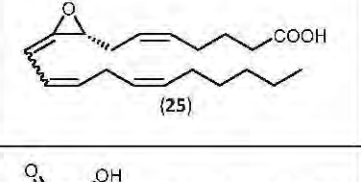
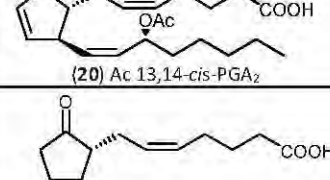
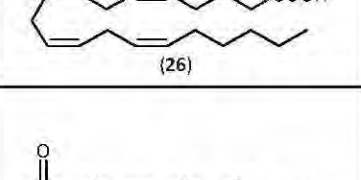
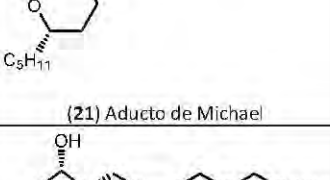
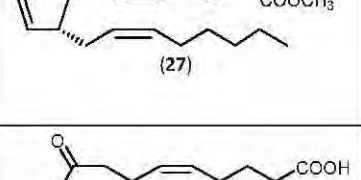
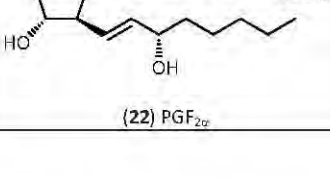
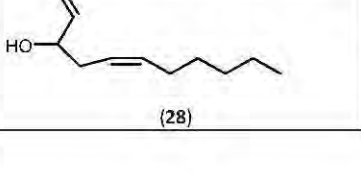
En estudios del extracto de *P. homomalla* recolectada en la Isla Acklins (Bahamas), Groweiss y Fenical aislaron el éster metílico de la 9-*O*-Ac PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (**23**) como compuesto minoritario [87a] (Tabla 3.1), el cual había sido previamente sintetizado por Sih y Graber [87b]. Su elucidación estructural se realizó con base en análisis espectroscópicos y comparación con los datos reportados para su isómero posicional el éster metílico de la 11-*O*-Ac PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , obtenido previamente del octocoral *Lobophytum depressum* [87c].

En cuanto a la presencia de otros eicosanoides en este octocoral se han realizado experimentos en los que mediante la incubación de 8(*R*)-HPETE<sup>1</sup> (**24**) con homogenados de *P. homomalla* (variedad *S*), recolectada en Islas Caimán, se identificó el aleno **25** que es un intermediario de la biosíntesis de prostaglandinas en *P. homomalla* [88a]. Además, la incubación de ácido araquidónico (A.A.) con ésta misma preparación produjo 8(*R*)-HPETE (**24**), el  $\alpha$ -cetol **26**, la ciclopentenona **27**, y el  $\gamma$ -cetol **28** en cantidades del orden de los  $\mu\text{g}$  (Tabla 3.1) [88b]. La identificación de estos compuestos se realizó mediante estudios espectrocópicos (IR, MS, RMN y CD).

Tabla 3.1. Eicosanoides aislados de *P. homomalla* y algunos derivados hemisintéticos.

Fuente /Origen (Zona geográfica)	Compuesto	Ref.	Fuente /Origen (Zona geográfica)	Compuesto	Ref.
Costas de Florida, Sur de Florida	 PGA <sub>2</sub> ( <b>1</b> ) R y R'=H Ac PGA <sub>2</sub> Me ( <b>2</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=Ac PGA <sub>2</sub> Me ( <b>3</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=H	[60, 84]	Islas Caimán	 PGE <sub>2</sub> ( <b>12</b> )	[61, 84]
Sintética (a partir de PGA <sub>2</sub> 15R)	 (15R)-PGB <sub>2</sub> ( <b>4</b> ) (15S)-PGB <sub>2</sub> ( <b>5</b> )	[60, 82, 84]	Sintética (a partir de PGE <sub>2</sub> 15S)	 PGE <sub>2</sub> Me ( <b>13</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=H Ac PGE <sub>2</sub> Me ( <b>14</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=Ac	[61]
Sur de Florida, Cayos de Florida	 PGE <sub>2</sub> ( <b>6</b> ) R, R'=H PGE <sub>2</sub> Me ( <b>7</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=H Ac PGE <sub>2</sub> Me ( <b>8</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=Ac	[83, 84]	Islas Caimán	 (15) 5- <i>trans</i> -PGA <sub>2</sub>	[85]
Islas Caimán	 PGA <sub>2</sub> ( <b>9</b> ) R, R'=H PGA <sub>2</sub> Me ( <b>10</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=H Ac PGA <sub>2</sub> Me ( <b>11</b> ) R=CH <sub>3</sub> , R'=Ac	[61, 82, 84]	Sintética (a partir de 5- <i>trans</i> -PGA <sub>2</sub> )	 (16) 5- <i>trans</i> -PGE <sub>2</sub>	[85]

<sup>1</sup> Ácido 8(*R*)-hidroperoxieicosatetraenoico

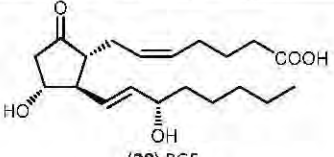
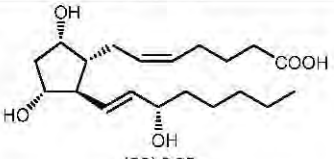
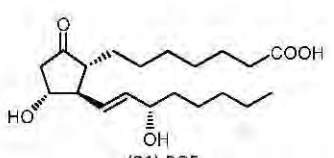
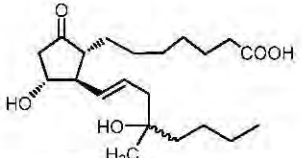
Sintética (a partir de 5- <i>trans</i> -PGA <sub>2</sub> )	 (17) 5- <i>trans</i> -PGF <sub>2α</sub>	[85]	Isla Acklins (Bahamas)	 (23) 9-O-Ac Me PGF <sub>2α</sub>	[87]
Sintética (a partir de 5- <i>trans</i> -PGA <sub>2</sub> )	 (18) 5- <i>trans</i> -PGF <sub>2β</sub>	[85]	Islas Caimán	 (24)	[88]
Islas Caimán	 (19) 13,14- <i>dehidro</i> PGA <sub>2</sub>	[86]	Islas Caimán	 (25)	[88]
Islas Caimán	 (20) Ac 13,14- <i>cis</i> -PGA <sub>2</sub>	[86]	Islas Caimán	 (26)	[88]
Islas Caimán	 (21) Aducto de Michael	[86]	Islas Caimán	 (27)	[88]
Islas Caimán	 (22) PGF <sub>2α</sub>	[61, 86]	Islas Caimán	 (28)	[88]

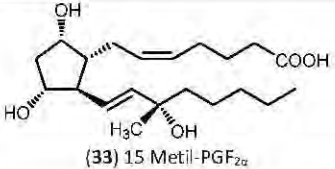
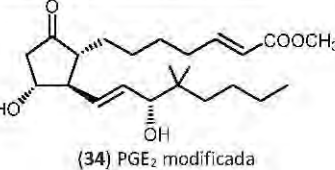

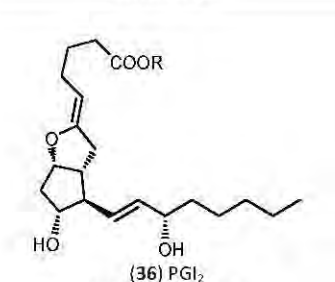
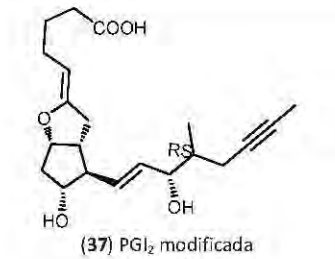
### 3.1.3. Actividad Farmacológica de las Prostaglandinas

En cuanto a la actividad biológica de estos compuestos es importante mencionar que las prostaglandinas de tipo S son las mismas que se encuentran en los mamíferos, las cuales se caracterizan en éstos últimos por presentarse en pequeñas cantidades y estar implicadas en una variedad de procesos clínicamente importantes, incluyendo inflamación, fiebre, trombosis, alergias y respuesta inmune [89]. Las prostaglandinas presentan así un amplio rol de actividades farmacológicas, tales como contracción y relajación del músculo liso del útero, del sistema cardiovascular, del tracto intestinal y tejido bronquial. Además, son capaces de inhibir la secreción gástrica, controlar la presión sanguínea y suprimir la agregación plaquetaria [90]. En

este sentido se han llevado a cabo estudios extensos que involucraron la química y ecología de *P. homomalla* como productor de una diversa y amplia cantidad de prostanoideos (el contenido de  $\text{PGA}_2$  en *P. homomalla* es cerca de un millón de veces mayor al encontrado en los mamíferos) [79]. Además, se han realizado múltiples estudios hemisintéticos y de síntesis total que permitieron el posterior desarrollo de algunos fármacos basados en prostaglandinas o sus derivados, tales como dinoprostone® ( $\text{PGE}_2$ ) (29), dinoprost® ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (30), alprostadi® ( $\text{PGE}_1$ ) (31), misoprostol® ( $\text{PGE}_1$  modificada) (32), carboprost® (15 Metil- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (33), gemeprost® ( $\text{PGE}_2$  modificada) (34), latanoprost® ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  modificada) (35), epoprostenol® ( $\text{PGI}_2$ ) (36), iloprost® ( $\text{PGI}_2$  modificada) (37), entre otros [89][91] (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Fármacos basados en prostaglandinas (Tomado y adaptado de [89])

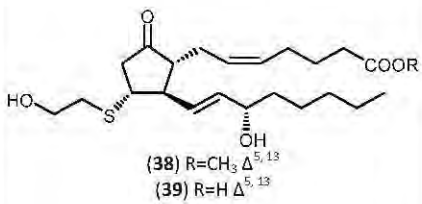
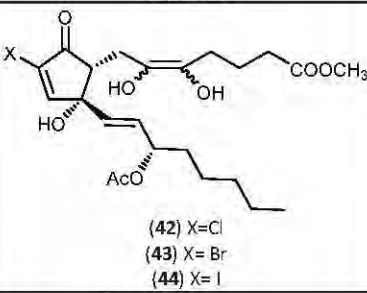
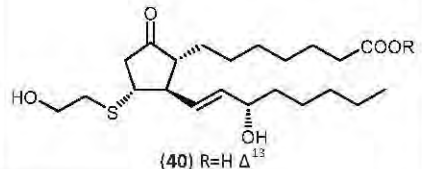
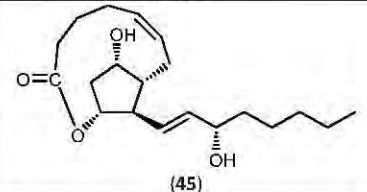
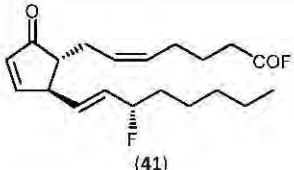
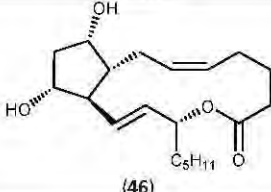
Nombre/Código Origen	Estructura Número CAS (síntesis)	Actividad Farmacológica	Datos experimentales	Datos Clínicos
Minprostin™ Cerviprost Dinoprostone® Pharmacia and Upjohn, UK	 (29) $\text{PGE}_2$ 363-24-6	- Inducción de aborto = labor de parto - Dilatación del cuello uterino - Formulación genitourinaria	$K_d(\text{human ut})=6.8 \text{ nM}$	Aplicación intravaginal, inducción de labor eficientemente en caso de estado cervical favorable
Dinoprost®	 (30) $\text{PGF}_{2\alpha}$	Inducción del aborto		
Prostandin™ Alprostadi® U-10136 Pharmacia and Upjohn, UK	 (31) $\text{PGE}_1$ 745-65-3	- Vasodilatador (Facilita la oxigenación de la sangre en recién nacidos con problemas congénitos del corazón) - Disfunción Eréctil - Antitrombótico	- Esfínter del Iris - sfs (ratas): $\text{EC}_{50}=13 \text{ nM}$ - tr (gatos): $\text{EC}_{50}=13 \text{ nM}$ (cb) - Flujo sanguíneo en extremidades posteriores (perros) $\text{EC}_{50}=1.3 \text{ nM}$ - pa (babuino): $\text{IC}_{50}=17.7 \text{ ng/mL}$ (ADP) - pa (humano): $\text{IC}_{50}=27.3 \text{ ng/mL}$ (ADP)	A dosis de 50-100 ng/kg/min reduce hipertensión pulmonar, después de transplantes. 55% (85%) de los pacientes con disfunción eréctil responden a dosis intravenosas de 5-10 $\mu\text{g}$
Cytotec™ Misoprostol® SC-29333 Searle, USA	 (32) $\text{PGE}_1$ modificada 59122-46-2	Inhibición de la secreción gástrica (úlceras gástrica y duodenal)	- Se une al receptor $\text{PGE}_2$ de manera reversible teniendo alta correlación con los $\text{IC}_{50}$ para la inhibición de ácido (perros) - sfs (cerdos de guinea): $\text{eco}=43$ ( $\text{PGE}_2=1$ ) - tr (gatos): $3.7$ ( $\text{PGE}_2=1$ ) - igm (ratas): $0.24$ ( $\text{PGE}_2=1$ )	Administrado junto con AIDS reduce significativamente efectos gastrointestinales. Previene varios procesos inflamatorios relacionados con la liberación de citocinas

<p>Prostin 15 M™ Carboprost® Trometamol Pharmacia and Upjohn, UK</p>	 <p>(33) 15 Metil-PGF<sub>2α</sub> 53551-69-2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inducción de aborto y labor de parto (dosis mínimas)</li> </ul>	<p>blpf:eco=1.6 {PGE<sub>1</sub>=100} blpf:eco=49.8 {PGF<sub>2α</sub>=100}</p>	<p>Tasa de eficiencia del 94.5%</p>
<p>Cervagem™ Gemeprost® ONO-802 Ono, Japón</p>	 <p>(34) PGE<sub>2</sub> modificada 64318-79-2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilata el cuello uterino en abortos tempranos.</li> <li>- Inducción de aborto</li> <li>- Iniciación de la menstruación</li> </ul>	<p>10 µg/Kg produce contracciones uterinas por 3 h (monos) 20-50 µg suministrados vía intravaginal generan abortos después de 27 h de la primera dosis (monos)</p>	<p>Una única dosis de RU 486 (600 mg), seguida de administración de Gemeprost (1 mg) provoca abortos con una eficiencia del 96%</p>
<p>Xalatan™ Latanoprost® PhXA41 Pharmacia and Upjohn, UK</p>	 <p>(35) PGF<sub>2α</sub> modificada 130209-82-4</p>	<p>Incrementa la salida del humor acuoso del ojo, reduciendo la presión intraocular (glaucoma)</p>	<p>Kd= 2.8 nM (cuerpo lúteo bovino) 3 µg reducen la presión intraocular (max. 2.6 mmHg; mono cinomolgos)</p>	<p>50 µg/mL reduce la presión intraocular nocturna. El principal efecto secundario es un incremento en la pigmentación del iris</p>
<p>Floian™ Cyclo-Prostin™ Epoprostenol® U-53217 Glaxo Wellcome, UK Pharmacia and Upjohn, UK</p>	 <p>(36) PGI<sub>2</sub> 61849-14-7 (R=Na) 35121-78-9 (R=H)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-agregador plaquetario</li> <li>- Vasodilatador</li> <li>- Impide la coagulación de la sangre en la diálisis renal</li> </ul>	<p>pa (humanos): ID<sub>50</sub>=0.5 ng/mL (ADP) Relaja las arterias coronarias en bovinos: ED<sub>50</sub>=5.9 ng/mL rc(humanos): Ki=63 nM (PGI<sub>2</sub>) -Inhibe PAF en la agregación plaquetaria inducida (conejos)</p>	<p>Efectos anti-metastásicos contra el melanoma amelanótico B16 de ratones. En pacientes con enfermedad vascular periférica -PVD- (6 ng/Kg/min i.v. durante 8 h diarias por 5 días) causa incremento significativo en el tiempo de caminata. En pacientes con la enfermedad de Raynaud 2.5-10 ng/Kg/min i.v. (72 h) causa mejoría</p>
<p>Ilomedin™ Iloprost® ZK36374 Schering AG, Germany</p>	 <p>(37) PGI<sub>2</sub> modificada 78919-13-8</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfermedad vascular periférica (PVD)</li> <li>- Hipertensión</li> <li>- Enfermedad oclusiva arterial (AOD)</li> <li>- Enfermedad de Raynaud</li> <li>- Tratamiento de enfermedades trombóticas</li> </ul>	<p>- rc (humanos): KD= 31 nM (PGI<sub>2</sub>) - pa (humanos): IC<sub>50</sub> = 0.72 nM (ADP) - pa (ratas): IC<sub>50</sub> = 7.5 nM (ADP) - Relaja las arterias pulmonares: IC<sub>50</sub>= 40 nM</p>	<p>aumenta significativamente el porcentaje de cicatrización de la úlcera o el alivio del dolor. En los pacientes con enfermedad de Raynaud una infusión de 5 días reduce la frecuencia de ataques</p>

Adicionalmente, se han realizado trabajos hemisintéticos sobre las prostaglandinas de la serie E<sub>2</sub> (tipo R y S), pues son potentes broncodilatadores, no obstante las prostaglandinas naturales de la serie E no tienen aparente aplicación clínica, pues causan tos e irritación del tracto respiratorio

superior, razón por la cual se han obtenido algunos derivados en la posición 11 a partir de 11-deoxiprostaglandinas (**38-40**) de PGE<sub>2</sub>, como potenciales broncodilatadores [92] (Tabla 3.3). También se han adelantado investigaciones sobre derivados fluorados (**41**) de las prostaglandinas A<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>, con el objeto de modificar su perfil farmacológico [93] (Tabla 3.3). Estudios posteriores indicaron que las prostaglandinas de la serie A y J eran capaces de actuar como antitumorales al causar apoptosis por inhibición de una isopeptidasa específica de ubiquitina, efecto atribuido a una adición de Michael del residuo de cisteína de la isopeptidasa al carbono β endocíclico de la ciclopentanona de las prostaglandinas [94], razón por la cual con el objeto de aumentar la electrofilicidad de estos compuestos se han obtenido derivados halogenados de PGA<sub>2</sub> (**42-44**), de los cuales los iododerivados resultaron ser los inhibidores más potentes [95] (Tabla 3.3). Estudios sobre derivados de tipo lactona de las PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGB<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> (**45, 46**) (Tabla 3.3), permitieron establecer su potente actividad abortiva, sin mayores efectos en la presión sanguínea o en el musculo liso (indicadores de efectos colaterales), estableciendo así su capacidad de actuar como efectivos agentes en el control de la fertilidad [96].

Tabla 3.3. Algunos derivados hemisintéticos de prostaglandinas

Estructura	Actividad	Ref	Estructura	Actividad	Ref
 <p>(38) R=CH<sub>3</sub> Δ<sup>5,13</sup> (39) R=H Δ<sup>5,13</sup></p>	Broncodilatadores	[92]	 <p>(42) X=Cl (43) X=Br (44) X=I</p>	Inhibición específica de una ubiquitina de la isopeptidasa.	[95]
 <p>(40) R=H Δ<sup>13</sup></p>	Broncodilatadores	[92]	 <p>(45)</p>	Efectos antifertilidad en hámster	[96]
 <p>(41)</p>	Intermediarios en la síntesis de ésteres de PG's activas Broncodilatadores	[93]	 <p>(46) C<sub>5</sub>H<sub>11</sub></p>	Efectos antifertilidad en hámster	[96]

Si bien se han realizado varios estudios de la actividad farmacológica de las prostaglandinas producidas por este octocoral en la revisión bibliográfica realizada en bases de datos como MarInlit, PubMed y SciFinder, no se encontraron reportes de estudios en cuanto a su actividad antiinflamatoria. En las únicas publicaciones de este tipo de compuestos aislados de fuentes marinas se reportan cuatro deoxiprostaglandinas (**47-50**) [97] y cuatro 15-ceto-prostaglandinas (**51-54**) [98] aisladas de alga roja *Gracilaria verrucosa* (Tabla 3.4), con capacidad débil de inhibir la producción de los mediadores proinflamatorios NO, IL-6, y TNF-α en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Por lo anterior resulta interesante en este trabajo evaluar el



perfil antiinflamatorio de las prostaglandinas naturales obtenidas a partir del octocoral *P. homamalla* recolectado en la Bahía de Santa Marta, Colombia.

De otro lado, el estudio de las prostaglandinas ha retomado vigencia, pues se ha descubierto que las prostaglandinas endógenas de la serie A y J pueden interactuar con dianas involucradas en procesos degenerativos que afectan por ejemplo la proliferación celular, la promoción e inhibición de la inflamación, la replicación de virus, la generación de procesos apoptóticos, entre otros [99, 100] por lo que se están adelantando estudios enfocados a evaluar la potencial aplicación de estos compuestos como agentes terapéuticos contra enfermedades como la de Alzheimer, VIH, urticaria, aquellas relacionadas con inflamación, etc. Respecto a esto último se ha detectado que pueden actuar sobre los receptores nucleares *PPARs* (por sus siglas en inglés *peroxisome proliferator-activated receptors*) y *HSFs* (por sus siglas en inglés, *heat shock transcription factor*), además de poderse unir covalentemente con proteínas intracelulares [101, 102, 103]. De este modo se ha podido identificar que las prostaglandinas con sistemas  $\alpha, \beta$ -insaturados, dentro de las que se encuentra las prostaglandinas de la serie A y J son las más activas sobre mediadores del proceso inflamatorio [99, 102].

#### ➤ Prostaglandinas Como agentes Antiinflamatorios

En cuanto a la actividad antiinflamatoria se ha encontrado que prostaglandinas endógenas como la 15d-PGJ<sub>2</sub><sup>2</sup> pueden ejercer efectos moduladores a través de varios mecanismos, uno de ellos involucra su alta afinidad por los receptores DP<sub>2</sub><sup>3</sup> expresados exclusivamente en las células Th<sub>2</sub>, eosinófilos y basófilos, involucrados en la migración quimiotáctica de éstas células, no obstante es un agonista débil en los receptores DP<sub>1</sub><sup>4</sup> en neutrófilos humanos [102]. Adicionalmente se ha encontrado que 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe la actividad del IFN- $\gamma$  mediante una acción agonista sobre PPAR $\gamma$  [102, 104], además de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12) [99, 105, 106], gelatinasa B, thromboxano B<sub>2</sub>, iNOS y COX-2 en monocitos/macrófagos periféricos por un mecanismo que sugiere la implicación de PPAR $\gamma$  [99, 102]. También se ha encontrado que induce la síntesis de I $\kappa$ B, represor natural de NF- $\kappa$ B [99]. En modelos de pleuresía en rata metabolitos de COX-2 como 15d-PGJ<sub>2</sub> mediaban procesos apoptóticos en neutrófilos y macrófagos a través de la activación de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  [106, 107]. Adicionalmente, prostaglandinas  $\alpha, \beta$ -insaturadas de la serie A y J fueron capaces de activar HSF1 e inducir la síntesis de hsp70<sup>5</sup> en una variedad de células mamíferas [103]. Esta inducción está relacionada con la inhibición de NF- $\kappa$ B, por lo que se ha sugerido la posibilidad de la conexión entre estos dos factores de transcripción [103].

---

<sup>2</sup> 15d-PGJ<sub>2</sub> (15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>) es el producto final de la deshidratación de PGD<sub>2</sub>

<sup>3</sup> Receptores en la membrana celular también conocidos como CRTH<sub>2</sub> (por sus siglas en inglés, *Chemotactic Receptor on TH<sub>2</sub> Cells*)

<sup>4</sup> DP<sub>1</sub> es un receptor asociado a proteínas G que está involucrado en respuestas asmáticas, además de generar vasodilatación

<sup>5</sup> específicamente hsp72, una chaperona molecular, las cuales son proteínas con roles citoprotectores contra condiciones patológicas en episodios como la inflamación

Estudios adicionales han establecido que 15d-PGJ<sub>2</sub> y PGA<sub>1</sub> son capaces de inhibir potentemente NF-κβ (Tabla 3.4), bloqueando la fosforilación, y en consecuencia la degradación de Iκβ por parte de Iκβ quinasa (IKK) [99]. El mecanismo involucra la unión de manera covalente al residuo de cisteína (Cys-179) de la subunidad β de IKK<sup>6</sup> [102, 106]. Adicionalmente, estas prostaglandinas lograron inhibir la unión de NF-κβ al DNA de una manera directa, vía alquilación de un residuo de cisteína ubicado en el dominio de unión al DNA de NF-κβ. Cabe mencionar que en estos estudios las prostaglandinas endógenas PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGB<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, además del TXB<sub>2</sub> y del LTB<sub>4</sub> no presentaron actividad [102].

De modo similar en estudios llevados a cabo en células nerviosas (glías) activadas con LPS, se evaluaron los efectos de PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> (55) y sus derivados, PGA<sub>1</sub> (56) y PGJ<sub>2</sub> (57) en la producción de iNOS. PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub> fueron preparados en soluciones de etanol y PGA<sub>2</sub> (58), PGJ<sub>2</sub> (57), 15d-PGA<sub>2</sub> (59) y 15d-PGJ<sub>2</sub> (60) fueron usados como sus ésteres metílicos acetilados en C-15 (Tabla 3.4). Se encontró que la 15d-PGJ<sub>2</sub> fue el inhibidor más potente de la actividad de iNOS, por el contrario PGE<sub>2</sub> presentó la menor inhibición (incluso a altas concentraciones). Se estableció además que 15d-PGJ<sub>2</sub> puede actuar como un inhibidor transcripcional de la producción de iNOS en microglías. Adicionalmente, se observó que 15d-PGJ<sub>2</sub> fue más potente que PGA<sub>2</sub> en la inhibición de la producción de NO en microglías y astrocitos, no obstante, PGA<sub>2</sub> fue más potente que 15d-PGJ<sub>2</sub>, en la supresión de la producción de citoquinas y quimoquinas en estas células nerviosas; lo que sugiere que las prostaglandinas pueden regular de manera diferencial la expresión de genes que codifican para iNOS, citoquinas y quimoquinas [108]. Estas diferencias de selectividad pueden deberse a factores diversos que incluyen la permeabilidad o distribución intracelular o alteraciones en la expresión de proteínas inducidas por varios tratamientos o por presencia de GSH (glutación), hecho estudiado en células *in vitro* y en células intactas [109].

Con lo anterior se evidencia que las prostaglandinas no sólo regulan procesos proinflamatorios sino que también están involucradas en el proceso de la resolución de la inflamación. Prostaglandinas como PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>, son producidas en el organismo con el objeto de mediar procesos clásicamente proinflamatorios, en contraste prostaglandinas como PGA<sub>2</sub> y PGJ<sub>2</sub> están involucradas en la resolución de la inflamación y actúan como efectivos agentes antiinflamatorios endógenos, lo que se convierte en un antecedente muy importante para este trabajo dado que el octocoral *P. homomalla* es una fuente natural y abundante de este tipo de prostaglandinas con sistemas α,β-insaturados, las cuales no han sido evaluadas en términos de actividad antiinflamatoria, por lo que podrían mostrar efectos proinflamatorios o antiinflamatorios en los ensayos aquí propuestos.

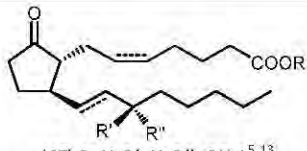
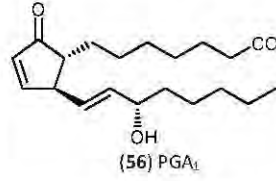

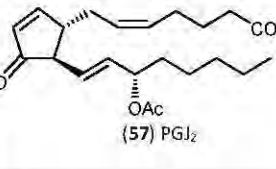
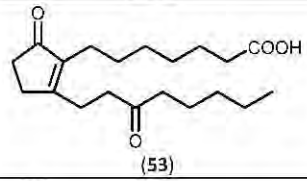
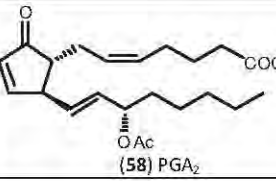
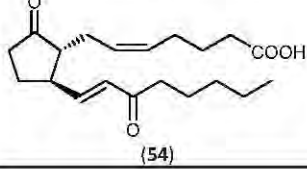
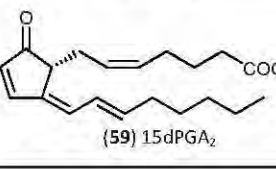
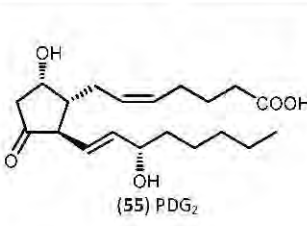
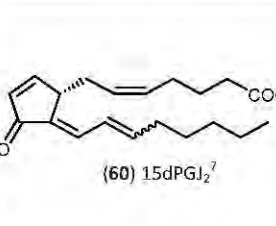
Con este panorama junto al hecho de no encontrar estudios en *P. homomalla* de Colombia y los resultados obtenidos en la evaluación de su extracto orgánico (Cap. I), el presente capítulo pretende abordar el estudio químico de este octocoral como una posible fuente de

---

<sup>6</sup> IKK está constituida por dos subunidades, IKKα, IKKβ y una subunidad regulatoria (IKKγ o NEMO) que disparan su degradación dependiente de ubiquitina. No obstante, de las dos unidades catalíticas IKKβ tiene el mayor rol en la respuesta a estímulos proinflamatorios.

prostaglandinas con actividad antiinflamatoria y contribuir a la caracterización de dicha actividad biológica.

Tabla 3.4. Prostaglandinas con actividad antiinflamatoria

Estructura	Actividad Evaluada	Ref	Estructura	Actividad Evaluada	Ref
 <p>(47) R=H, R'=H, R''=OH <math>\Delta^{5,13}</math>                      (48) R=CH<sub>3</sub>, R'=H, R''=OH <math>\Delta^{5,13}</math>                      (49) R=H, R'=H, R''=OH <math>\Delta^{13}</math>                      (50) R=H, R', R''=O <math>\Delta^5</math></p>	Inhibición de producción de NO <sup>a</sup> Inhibición de producción de IL-6 <sup>a</sup> Inhibición de producción de TNF- $\alpha^a$	[97]	 <p>(56) PGA<sub>1</sub></p>	Inhibición IKK IC <sub>50</sub> =12 $\mu$ M (Jurkat) IC <sub>50</sub> =65 $\mu$ M (HeLa)	[99, 108]
 <p>(51) 13, 14-dehidro                      (52) <math>\Delta^{13}</math></p>	Inhibición de producción de NO <sup>a</sup>	[98]	 <p>(57) PGJ<sub>2</sub></p>	Inhibición NO IC <sub>50</sub> =0.8 $\mu$ M (BV-2)	[108]
 <p>(53)</p>	Inhibición de producción de NO <sup>a</sup>	[98]	 <p>(58) PGA<sub>2</sub></p>	Inhibición de producción de NO	[108]
 <p>(54)</p>	Inhibición de producción de NO <sup>a</sup>	[98]	 <p>(59) 15dPGA<sub>2</sub></p>	Inhibición NO IC <sub>50</sub> =2 $\mu$ M (BV-2)	[108]
 <p>(55) PDG<sub>2</sub></p>	Inhibición NO IC <sub>50</sub> =4 $\mu$ M (BV-2)	[99, 103, 108]	 <p>(60) 15dPGJ<sub>2</sub><sup>7</sup></p>	Inhibición de NF- $\kappa$ B DNA-binding IC <sub>50</sub> =2.25 $\mu$ M (HeLa) Inhibición IKK IC <sub>50</sub> =5.08 $\mu$ M (HeLa) Inhibición NO IC <sub>50</sub> =0.2 $\mu$ M (BV-2)	[99, 103, 108]

<sup>a</sup> Ensayos realizados en macrófagos murinos RAW 246.7 activados con LPS.

<sup>7</sup> En la literatura este compuesto se reporta con diferente geometría en el doble enlace en C15-C16.

## 3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2.1 Análisis Químico

El octocoral *P. homomalla* fue recolectado en la isla de San Andres (Colombia), se mantuvo congelado hasta el momento de su extracción con una mezcla MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1). Este extracto crudo presentó actividad antiinflamatoria en el ensayo de edema auricular inducido por TPA, al disminuir el edema hasta niveles similares a los presentados por la indometacina utilizada como control positivo, razón por la cual fue elegido para su estudio químico, con el objeto de aislar los compuestos responsables de tal actividad. De este modo el extracto total fue sometido a partición entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua. La fase orgánica fue sometida a sucesivas cromatografías hasta obtener los compuestos **P1-P5** como se describe en la metodología (sección 3.3.4).

#### ➤ Elucidación del Compuesto **P1**

El compuesto **P1** (6 g) fue obtenido como un aceite viscoso rojo. Su espectro HR-ESI-MS presentó un ion *pseudo*-molecular en  $m/z$  357.2037 ([M+Na]<sup>+</sup>), consistente con la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na (calc. 357.2036 para C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na), indicando una fórmula molecular para **P1** de C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub> que implica seis grados de insaturación en la molécula. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 3.5) presentó señales para un grupo metilo en  $\delta_H$  0.88 (3H, *t*,  $J=6.5$  Hz), señales para grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>3</sup> en  $\delta_H$  1.28 (*m*), 1.49 (*m*), 1.56 (*m*) y 1.69 (2H, *dt*,  $J=7.2, 7.0$  Hz), éste último probablemente un metileno sp<sup>3</sup> entre dos metilenos alifáticos. En  $\delta_H$  2.13 se observó un multiplete correspondiente a un CH sp<sup>3</sup>. También se observaron dos señales en  $\delta_H$  2.48 (1H, *dt*,  $J=14.4, 7.0$  Hz) y 2.35 (3H, *m*) correspondientes a los dos protones diasterotópicos de un metileno sp<sup>3</sup>. Adicionalmente, se observaron señales en  $\delta_H$  3.22 (1H, *d*,  $J=2.3$  Hz), pertenecientes a un metino sp<sup>3</sup> y en  $\delta_H$  4.10 (1H, *dd*,  $J=12.0, 6.0$  Hz) que corresponde a un metino carbinólico. Además se observaron señales de protones sobre carbonos olefínicos en  $\delta_H$  5.42 (2H, *dq*,  $J=11.0, 7.0$  Hz), 5.59 (2H, *m*), 6.18 (1H, *dd*,  $J=5.7, 2.0$  Hz) y 7.48 (1H, *dd*,  $J=5.7, 2.3$  Hz), siendo estas dos últimas características de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Tabla 3.5) reveló la presencia de 20 señales, asignadas mediante experimentos DEPT-135 a un grupo metilo, ocho grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>3</sup>, nueve grupos CH (dos de estos correspondientes a carbonos sp<sup>3</sup>, seis a carbonos sp<sup>2</sup> y uno a un grupo OCH sp<sup>3</sup>) y dos carbonos cuaternarios, uno perteneciente a un grupo COO<sup>-</sup> y el otro característico de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

Los desplazamientos en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C antes mencionados indicaron una estructura de tipo prostaglandina, probablemente PGA<sub>2</sub> o PGJ<sub>2</sub> [110]. El análisis del experimento COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H permitió observar el sistema de spin característico de prostaglandinas desde *H*-2 en  $\delta_H$  2.35 (3H, *m*) hasta *H*-8 en  $\delta_H$  2.13 (*m*) sobre la cadena lateral  $\alpha$ , y desde *H*-10 en  $\delta_H$  6.18 (*dd*, 1H,  $J=5.7, 2.0$  Hz) hasta *H*-20 en  $\delta_H$  0.88 (*t*, 3H,  $J=6.5$  Hz) sobre la cadena lateral  $\omega$ . El análisis de los espectros HMQC y HMBC permitió la asignación que se muestra en la tabla 3.5; además, las correlaciones HMBC de *H*-7<sub>αβ</sub> con *C*-9, de *H*-8 con *C*-6, de *H*-11 con *C*-8 y *C*-12, y de este último con *H*-13 y *H*-14 (Figura 3.2) permitieron establecer a **P1** como una prostaglandina con un núcleo  $\alpha,\beta$ -insaturado característico de PGA<sub>2</sub> y descartar que se tratara de prostaglandinas tipo PGJ<sub>2</sub>, que son isómeros posicionales de la serie PGA<sub>2</sub>. La geometría del doble enlace en *C*-5 se asignó como

Z por el desplazamiento de C-4 y C-7 en  $\delta_c$  26.8 y 26.4, respectivamente, característicos para esta geometría [111], confirmado además por las constantes de acoplamiento de los protones H-5 y H-6 en  $\delta_H$  5.42 (1H, *dq*,  $J=11.0, 7.0$  Hz). De manera similar las constantes de acoplamiento de H-13 en 5.64 (1H, *dd*,  $J=15.7, 8,0$ ) y H-14 en 5.45 (1H, *dd*,  $J=15.7, 7.0$ ) del derivado acetilado de **P1**, obtenido por acetilación de éste con Ac<sub>2</sub>O en piridina, permitieron asignar el doble enlace de la cadena  $\omega$  como *E* y obtener finalmente la estructura plana que se muestra en la figura 3.2. De esta manera el compuesto **P1** se identificó como la prostaglandina A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>).

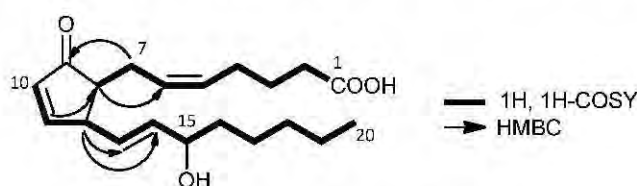


Figura 3.2. Estructura plana y algunas correlaciones 2D-RMN para el compuesto **P1**

#### ➤ Elucidación de los compuestos **P2**, **P3** y **P4**

El compuesto **P2** (20 mg) fue obtenido como un aceite viscoso de color amarillo. Su espectro HR-ESI-MS presentó un ion *pseudo*-molecular en  $m/z$  371.2205 ( $[M+Na]^+$ ), consistente con la fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>Na (calc. 371.2198 para C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>Na), indicando una fórmula molecular para **P2** de C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> que implica seis grados de insaturación en la molécula. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 3.5) presentó señales para un grupo metilo unido a una cadena alifática en  $\delta_H$  0.89, señales para grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>3</sup> en  $\delta_H$  1.29, 1.50 (*m*), 1.70 (*m*), 2.09 (*m*), 2.33 (2H, *t*,  $J=7.4$ ), además de un singlete en  $\delta_H$  3.04 (3H, *s*) característico de un grupo -OCH<sub>3</sub>. Adicionalmente, se observó una señal en  $\delta_H$  3.23 (*m*) de un metino sp<sup>3</sup> y otra señal en  $\delta_H$  4.10 (1H, *dd*,  $J=11.5, 5.8$  Hz) perteneciente a un metino carbinólico. También se observaron señales para protones sobre carbonos olefínicos en  $\delta_H$  5.44 (*m*), 5.36 (*m*), 5.60 (*m*), 5.58 (*m*), 6.19 (1H, *dd*,  $J=5.6, 2.0$  Hz) y 7.50 (1H, *dd*,  $J=5.6, 2.4$  Hz), siendo estas dos últimas pertenecientes a un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. El espectro de DEPT-135 (Tabla 3.5) reveló la presencia de 19 señales, asignadas a dos grupo metilo en  $\delta_c$  14.1 y 51.9, confirmando ésta última la presencia de un grupo metoxilo, ocho grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>3</sup>, nueve grupos CH (dos de estos correspondientes a carbonos sp<sup>3</sup>, seis a carbonos sp<sup>2</sup> y uno a OCH sp<sup>3</sup>). Estos desplazamientos y constantes de acoplamiento fueron similares a los presentados para el compuesto **P1** (PGA<sub>2</sub>). La diferencia se encontraba en la presencia de un grupo metoxilo que fue asignado como el éster metílico de la PGA<sub>2</sub> (Figura 3.3), esto considerando que la señal en  $\delta_H$  4.10 (1H, *dd*,  $J=11.5, 5.8$  Hz) correspondiente al metino carbinólico en C-15 permanecía inalterada respecto a los datos de RMN de PGA<sub>2</sub> (**P1**), por lo que la única posibilidad que surgía era que estuviera enlazado al carboxilo en C-1. Adicionalmente, los datos en RMN-<sup>13</sup>C de PGA<sub>2</sub> Me reportado en la literatura, coincidían con los presentados por **P2** [110b], lo que confirmaba la identidad de **P2** como PGA<sub>2</sub> Me (Figura 3.3).

El compuesto **P3** (43 mg) fue obtenido como un aceite amarillo. Su espectro HR-ESI-MS presentó un ion *pseudo*-molecular en  $m/z$  399.2130 ( $[M+Na]^+$ ), consistente con la fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>Na (calc. 399.2142 para C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>Na) indicando una fórmula molecular para **P3** de C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> que implica siete grados de insaturación en la molécula, uno más que las moléculas **P1** y **P2**. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 3.5) presentó señales características para un grupo metilo al

final de una cadena alifática en  $\delta_H$  0.88 (*t*, 3H,  $J=6.3$  Hz), para grupos  $\text{CH}_2 \text{sp}^3$  en  $\delta_H$  1.29, 1.55 (*m*), 1.61 (*m*), 1.68 (2H, *td*,  $J=7.3$ , 7.3 Hz), 2.36 (2H, *t*,  $J=7.3$  Hz), 2.52 (1H, *dt*,  $J=14.6$ , 5.6 Hz)/2.30 (1H, *dt*,  $J=14.6$ , 7.6 Hz), estos últimos correspondientes a los dos protones de un metileno diasterotópico. Un singlete intenso de un metilo en  $\delta_H$  2.06 sugería la presencia de un grupo acetilo, que justifica el grado adicional de insaturación. Adicionalmente se observaron señales de metinos  $\text{sp}^3$  en  $\delta_H$  2.13 (*m*) y 3.22 (1H, *dd*,  $J=8.0$ , 1.6 Hz); la señal en  $\delta_H$  5.18 (1H, *dd*,  $J=13.2$ , 7.0 Hz) es característica de un metino carbinólico. En  $\delta_H$  5.40 (1H, *m*), 5.34 (1H, *m*), 5.64 (1H, *dd*,  $J=15.7$ , 8.0 Hz), 5.45 (*dd*, 1H,  $J=15.7$ , 7.0 Hz) se observaron señales para protones sobre carbonos olefinicos. También se evidenció la presencia de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, por las señales características para estos protones en  $\delta_H$  6.20 (1H, *dd*,  $J=5.6$ , 1.8 Hz) y 7.49 (1H, *dd*,  $J=5.6$ , 1.6 Hz). El experimento DEPT-135 (Tabla 3.5) reveló la presencia de 19 señales, asignadas a dos grupos metilo en  $\delta_C$  14.1 y 21.4, confirmando ésta última la presencia de un grupo acetilo, ocho grupos  $\text{CH}_2 \text{sp}^3$ , nueve grupos CH (dos de estos correspondientes a carbonos  $\text{sp}^3$ , seis a carbonos  $\text{sp}^2$  y uno a  $-\text{OCH}-\text{sp}^3$ ). Estos desplazamientos y constantes de acoplamiento fueron similares a los del compuesto **P1** ( $\text{PGA}_2$ ), excepto por la presencia de un grupo acetilo, el cual se asignó a la posición C-15, a juzgar por el desplazamiento a campo bajo del protón unido a esta carbono (de  $\delta_H$  4.10 para **P1** a  $\delta_H$  5.18 para **P3**). El análisis anterior permitió identificar al compuesto **P3** como el 15-*O*-acetato de la  $\text{PGA}_2$  (Figura 3.3).

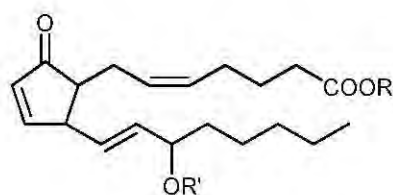
El compuesto **P4** (4.8 g) fue obtenido como un aceite amarillo oscuro. Su espectro HR-ESI-MS presentó un ion *pseudo*-molecular en  $m/z$  413.2293 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), consistente con la fórmula molecular  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}$  (calc. 413.2298 para  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}$ ) indicando una fórmula molecular para **P4** de  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_5$  que implica siete grados de insaturación en la molécula. El espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (Tabla 3.6) presentó señales para un grupo metilo en  $\delta_H$  0.88, señales para metinos  $\text{sp}^3$  en  $\delta_H$  1.26, 1.56 (*m*), 1.61 (*m*), 1.69 (2H, *td*,  $J=7.5$ , 7.5 Hz), 2.10 (*m*), 2.31 (2H, *t*,  $J=7.5$  Hz), 2.26 (*m*)/2.51 (1H, *dt*,  $J=14.8$ , 6.0 Hz) correspondientes a dos protones diasterotópicos. Singletes en  $\delta_H$  2.06 (3H, *s*) y 3.04 (3H, *s*) que sugerían en esta ocasión la presencia de un grupo acetilo y un grupo metoxilo, respectivamente. Adicionalmente, se observó una señal en  $\delta_H$  3.20 (1H, *dd*,  $J=7.7$ , 2.2 Hz) perteneciente a un metino  $\text{sp}^3$ , además de la señal en 5.20 (1H, *dd*,  $J=14.3$ , 6.8 Hz) correspondiente a un metino carbinólico ( $-\text{OCH}-$ ). Se observaron señales para protones sobre carbonos olefinicos en  $\delta_H$  5.40 (1H, *m*), 5.34 (*m*), 5.67 (1H, *dd*,  $J=15.4$ , 7.7 Hz), 5.48 (1H, *dd*,  $J=15.4$ , 6.8 Hz), 6.19 (1H, *dd*, 1H,  $J=5.6$ , 1.9 Hz) y 7.48 (1H, *dd*,  $J=5.6$ , 2.2 Hz), siendo estas dos últimas características del sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado de las prostaglandinas de la serie A. El experimento DEPT-135 (Tabla 3.6) reveló la presencia de 20 señales, asignadas a tres grupos metilo en  $\delta_C$  14.0, 21.4 y 51.5 estos dos últimos confirmaban la presencia de los grupos acetilo y metoxilo, respectivamente, ocho grupos  $\text{CH}_2 \text{sp}^3$ , nueve grupos CH (dos de estos correspondientes a carbonos  $\text{sp}^3$ , seis a carbonos  $\text{sp}^2$  y uno a  $\text{OCH sp}^3$ ). Estos desplazamientos y constantes de acoplamiento fueron muy similares a los presentados para los compuestos **P1**, **P2** y **P3**, la diferencia se encontraba en la presencia simultánea de los grupos acetilo y metoxilo. El primero se ubicó en la posición C-15, por la ausencia de la señal en  $\delta_H$  4.10 (1H, *dd*,  $J=12.0$ , 6.0 Hz) y la presencia de la señal en  $\delta_H$  5.20 (1H, *dd*,  $J=14.3$ , 6.8), desplazamiento a campo bajo causado por la acetilación; se descarto una metilación en esta posición pues el desplazamiento esperado para C-15 sería de  $\delta_H \sim 3.52$  en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  y de  $\delta_C \sim 86$  en  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  [espectro simulado en ChemDraw y comparación con el compuesto **P3a**], lo que no corresponde con los desplazamientos observados de  $\delta_H$  5.20 (1H, *dd*,  $J=14.3$ , 6.8) en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  y de  $\delta_C$  74.1 en  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$ , que corresponde

con lo esperado para la acetilación. De esta manera se identificó a **P4** como el éster metílico del 15-acetato de la prostaglandina A<sub>2</sub> (15-*O*-Ac PGA<sub>2</sub>), cuya estructura se presenta en la figura 3.3.

Tabla 3.5. Desplazamientos en RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y -<sup>13</sup>C (100 MHz) para **P1**, **P2** y **P3** en CDCl<sub>3</sub>; δ en ppm, *J* en Hz.

No.	P1		P2		P3	
	δ (H)	δ	δ (H)	δ (C) <sup>b</sup>	δ (H)	δ (C) <sup>b</sup>
1	-	178.3 C	-	-	-	-
2	2.35 (3H, <i>m</i> ) <sup>c</sup>	33.2 CH <sub>2</sub>	2.33 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =7.4)	33.6 CH <sub>2</sub>	2.36 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =7.3)	33.2 CH <sub>2</sub>
3	1.69 (2H, <i>dt</i> , <i>J</i> =7.2, 7.0)	24.6 CH <sub>2</sub>	1.70 (1H, <i>m</i> )	24.9 CH <sub>2</sub>	1.68 (2H, <i>td</i> , <i>J</i> =7.3, 7.3)	24.5 CH <sub>2</sub>
4	2.13 (2H, <i>m</i> )	26.8 CH <sub>2</sub>	2.09 (2H, <i>m</i> )	27.3 CH <sub>2</sub>	2.10 (2H, <i>m</i> )	26.5 CH <sub>2</sub>
5	5.42 (2H, <i>dq</i> , <i>J</i> =11.0, 7.0) <sup>c</sup>	130.9 CH	5.44 (1H, <i>m</i> )	131.2 CH	5.40 (2H, <i>m</i> )	131.0 CH
6	5.42 (2H, <i>dq</i> , <i>J</i> =11.0, 7.0) <sup>c</sup>	126.6 CH	5.36 (1H, <i>m</i> )	126.8 CH	5.34 (2H, <i>m</i> )	126.7 CH
7	2.35 (3H, <i>m</i> ) <sup>c</sup> /2.48 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> =14.4, 7.0)	26.4 CH <sub>2</sub>	2.30 (1H, <i>m</i> )/2.51 (1H, <i>m</i> )	26.8 CH <sub>2</sub>	2.52 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> =14.6, 5.6)/2.30 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> =14.6, 7.6)	27.3 CH <sub>2</sub>
8	2.13 (1H, <i>m</i> )	52.7 CH	2.03 (1H, <i>m</i> )	52.0 CH	2.13 (1H, <i>m</i> )	51.9 CH
9	-	210.7 C	-	-	-	-
10	6.18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.7, 2.0)	133.3 CH	6.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.6, 2.0)	133.4 CH	6.20 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.6, 1.8)	132.5
11	7.48 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.7, 2.3)	165.2 CH	7.50 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.6, 2.4)	165.7 CH	7.49 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.6, 1.6)	164.7 CH
12	3.22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2.3)	49.6 CH	3.23 (1H, <i>m</i> )	49.5 CH	3.22 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8.0, 1.6)	49.5 CH
13	5.59 (2H, <i>m</i> ) <sup>c</sup>	130.3 CH	5.60 (1H, <i>m</i> )	130.1 CH	5.64 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15.7, 8.0)	130.3 CH
14	5.59 (2H, <i>m</i> ) <sup>c</sup>	134.9 CH	5.58 (1H, <i>m</i> )	135.2 CH	5.45 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15.7, 7.0)	133.5 CH
15	4.10 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =12.0, 6.0)	72.6 CH	4.10 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =11.5, 5.8)	72.6 CH	5.18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =13.2, 7.0)	74.3 CH
16	1.56 (1H, <i>m</i> )/1.49 (1H, <i>m</i> )	37.1 CH <sub>2</sub>	1.55 (1H, <i>m</i> )/1.50 (1H, <i>m</i> )	37.3 CH <sub>2</sub>	1.55 (1H, <i>m</i> )/1.61 (1H, <i>m</i> )	34.2 CH <sub>2</sub>
17	1.29 <sup>a</sup>	25.0 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	25.2 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	24.8 CH <sub>2</sub>
18	1.28 <sup>a</sup>	31.7 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	31.3 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	31.5 CH <sub>2</sub>
19	1.29 <sup>a</sup>	22.6 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	22.7 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	22.5 CH <sub>2</sub>
20	0.88 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> =6.5)	14.0 CH <sub>3</sub>	0.89 <i>s</i>	14.1 CH <sub>3</sub>	0.88 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> =6.3)	14.0 CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub>	-	-	3.67 (3H, <i>s</i> )	51.6 CH <sub>3</sub>	-	-
OAc	-	-	-	-	2.06 <i>s</i>	21.4 CH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Señales solapadas. <sup>b</sup> Datos obtenidos por DEPT-135. <sup>c</sup> Señales sobrepuestas



PGA<sub>2</sub> Me R=CH<sub>3</sub>, R'=H, **P2**  
 Ac PGA<sub>2</sub> R y R'=H, **P3**  
 Ac PGA<sub>2</sub> Me R=CH<sub>3</sub>, R'=Ac, **P4**

Figura 3.3. Estructura plana de los compuestos **P2-P4**.

### ➤ Elucidación de lo compuesto **P5**

El compuesto **P5** (42 mg) fue obtenido como un aceite viscoso de color café. Su espectro HR-ESI-MS presentó un ion *pseudo*-molecular en  $m/z$  351.2166 ( $[M-H]^-$ ), consistente con la fórmula molecular  $C_{20}H_{31}O_5$  (calc. 351.2177  $C_{20}H_{31}O_5$ ), indicando una fórmula molecular para **P5** de  $C_{20}H_{32}O_5$  que implica cinco grados de insaturación en la molécula, es decir uno menos que **P1**. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 3.6) presentó señales para un grupo metilo en  $\delta_H$  0.89, además de señales para grupos CH<sub>2</sub> y CH sp<sup>3</sup> en  $\delta_H$  1.29, 1.66 (*m*), 1.55 (*m*), 1.66 (*m*), 2.06 (*m*), 2.13 (*m*), 2.20 (2H, *t*,  $J=9.0$  Hz), 2.31 (*m*), 2.37 (*m*), 2.40 (1H, *ddd*,  $J=8.6, 8.6, 2.9$  Hz) y 2.75 (1H, *dd*,  $J=18.4, 8.0$  Hz), éste último perteneciente a uno de los protones diastereotópicos de la ciclopentanona; señales para metinos carbinólicos en  $\delta_H$  5.40 (2H, *m*), 4.10 (1H, *dt*,  $J=8.6, 8.0$  Hz) y 4.16 (1H, *dd*,  $J=12.6, 6.2$  Hz). Finalmente el espectro de RMN-<sup>1</sup>H presentó señales para protones sobre carbonos olefínicos en 5.60 (1H, *dd*,  $J=15.3, 8.6$  Hz) y 5.72 (1H, *dd*,  $J=15.3, 6.2$ ). Es interesante notar la ausencia de señales para el sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado presente en los núcleos de las prostaglandinas anteriores, esto justifica que este compuesto (**5**) tenga un grado de insaturación menos que **P1**. El experimento DEPT-135 (Tabla 3.4) reveló la presencia de 18 señales, asignadas a un grupo metilo, nueve grupos CH<sub>2</sub> sp<sup>3</sup>, ocho grupos CH (cuatro de estos correspondientes a carbonos sp<sup>2</sup>, cuatro a carbonos sp<sup>3</sup>, dos de los cuales son OCH sp<sup>3</sup>) (Tabla 3.6). Estos desplazamientos y constantes de acoplamiento indicaban una estructura de tipo prostaglandina, no obstante la ausencia de las señales características de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado y la presencia de señales adicionales en  $\delta_H$  2.75 (1H, *dd*,  $J=18.4, 8.0$  Hz)/2.07 (*m*) y en  $\delta_H$  4.10 (1H, *dt*,  $J=8.6, 8.0$  Hz) de un metileno y un hidroximetino, respectivamente, indicaban que **P5** poseía una ciclopentanona hidroxilada y saturada en su estructura. El estudio cuidadoso de sus desplazamientos químicos en RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C permitieron identificar a **P5** como PGE<sub>2</sub> (Figura 3.4) [110b].

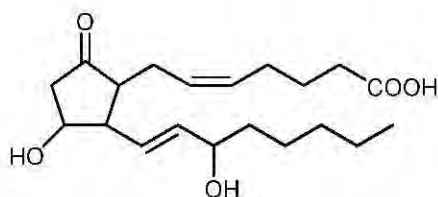


Figura 3.4. Estructura plana de **P5** (PGE<sub>2</sub>).



**Tabla 3.6.** Desplazamientos en RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y -<sup>13</sup>C (100 MHz) para **P4** y **P5** en CDCl<sub>3</sub>; δ en ppm, *J* en Hz.

No.	P4		P5	
	δ (H)	δ (C) <sup>b</sup>	δ (H)	δ (C) <sup>b</sup>
1	-	-	-	-
2	2.31 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =7.5)	33.4 CH <sub>2</sub>	2.20 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =9.0)	33.1 CH <sub>2</sub>
3	1.69 (2H, <i>td</i> , <i>J</i> = 7.5, 7.5)	24.7 CH <sub>2</sub>	1.66 (2H, <i>m</i> )	24.5 CH <sub>2</sub>
4	2.10 (2H, <i>m</i> )	26.7 CH <sub>2</sub>	2.07 <sup>a</sup>	26.3 CH <sub>2</sub>
5	5.40 (1H, <i>m</i> )	131.1 CH	5.40 (2H, <i>m</i> ) <sup>c</sup>	130.1 CH
6	5.34 (1H, <i>m</i> )	126.6 CH	5.40 (2H, <i>m</i> ) <sup>c</sup>	126.9 CH
7	2.26 (1H, <i>m</i> )/2.51 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> =14.8, 6.0)	27.4 CH <sub>2</sub>	2.30 (2H, <i>m</i> )	25.2 CH <sub>2</sub>
8	2.10 (1H, <i>m</i> )	51.9 CH	2.13 (1H, <i>m</i> )	53.3 CH
9	-	-	-	-
10	6.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.6, 1.9)	132.4 CH	2.75 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =18.4, 8.0)/2.07 (1H, <i>m</i> )	46.3 CH <sub>2</sub>
11	7.48 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =5.6, 2.2)	164.7 CH	4.10 (1H, <i>dt</i> , <i>J</i> =8.6, 8.0)	72.1 CH
12	3.20 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =7.7, 2.2)	49.6 CH	2.40 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =8.6, 8.6, 2.9)	55.0 CH
13	5.67 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.4, 7.7)	130.4 CH	5.60 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15.3, 8.6)	130.8 CH
14	5.48 ( <i>dd</i> , <i>J</i> =15.4, 6.8)	133.5 CH	5.72 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15.3, 6.2)	136.8 CH
15	5.20 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14.3, 6.8)	74.1 CH	4.16 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =12.6, 6.2)	72.6 CH
16	1.56 (1H, <i>m</i> )/1.61 (1H, <i>m</i> )	34.3 CH <sub>2</sub>	1.55 (1H, <i>m</i> )/1.66 (1H, <i>m</i> )	37.1 CH <sub>2</sub>
17	1.27 <sup>a</sup>	24.8 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	24.9 CH <sub>2</sub>
18	1.25 <sup>a</sup>	31.5 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	31.7 CH <sub>2</sub>
19	1.27 <sup>a</sup>	22.5 CH <sub>2</sub>	1.29 <sup>a</sup>	22.6 CH <sub>2</sub>
20	0.88 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> =6.8)	14.0 CH <sub>3</sub>	0.89 <i>s</i>	14.1 CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub>	3.66 (3 H, <i>s</i> )	51.5 CH <sub>3</sub>	-	-
OAc	-	-	-	-
	2.05 (3H, <i>s</i> )	21.3 CH <sub>3</sub>	-	-

<sup>a</sup> Señales solapadas. <sup>b</sup> Datos obtenidos por DEPT-135. <sup>c</sup> Señales sobrepuestas

### ➤ Determinación de la Estereoquímica absoluta de los compuestos P1-P5

Los análisis de los espectros de masas de alta resolución y los desplazamientos químicos arriba mencionados permitieron establecer la estructura plana de los compuestos **P1-P5**. Sin embargo, teniendo en cuenta que uno de los factores determinantes de la actividad biológica de las prostaglandinas es su estereoquímica [60, 79, 112], se hizo necesaria la determinación de la estereoquímica absoluta de los 3 centros asimétricos que presentan las prostaglandinas **P1-P4**, en las posiciones C-8, C-12 y C-15, junto con los 4 centros asimétricos que presenta el compuesto **P5** en las posiciones C-8, C-11, C-12 y C-15. En este sentido, el dicroísmo circular (DC), junto con el análisis de los experimentos NOE han sido las herramientas utilizadas para la determinación de la configuración absoluta de prostaglandinas en la literatura científica [41, 42].

La estrategia para la determinación de la estereoquímica absoluta de los compuestos **P1-P4** se realizó teniendo en cuenta que éstos se podrían encontrar relacionados. De esta manera al obtener una relación estructural directa entre los compuestos **P1-P4**, sin afectar sus centros quirales, sería posible observar la correlación entre sus datos espectroscópicos (RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C, rotación óptica, y DC) lo cual permitiría a su vez asignar la configuración absoluta de éstos compuestos. En primer lugar se determinó la configuración de las cadenas laterales α y ω en el compuesto **P1** por medio de experimentos NOE y análisis de su curva de DC. A continuación, la determinación de la configuración absoluta de C-15 se llevó a cabo por conversión de **P1** a **P2** y la

posterior aplicación del método modificado de Mosher al compuesto **P2** así obtenido. Esta configuración en C-15 se confirmó por la conversión de **P1** a  $\text{PGB}_2$  (**P1a**) y comparación de sus datos de rotación óptica y DC con los reportados para  $\text{PGB}_2$  15*R* y 15*S*, como se mostrará mas adelante. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de interconversión entre **P1-P4**. La configuración absoluta de **P5** se determinó por DC, análisis de sus constantes de acoplamiento y conversión a  $\text{PGB}_2$  (**P1a**).

Para **P1** ( $\text{PGA}_2$ ), la configuración *trans* de las cadenas laterales  $\alpha$  y  $\omega$  sobre el anillo de ciclopentanona fue establecida mediante el experimento NOE. En este experimento se observaron correlaciones entre el protón *H*-12 y los protones  $H_2-7_{\alpha\beta}$ , *H*-5 y *H*-6, lo que indicaba que todos estaban del mismo lado de la ciclopentanona. También se observó una correlación entre el protón *H*-8 y *H*-14 (Figura 3.5), lo que indicaba que estos se encontraban del mismo lado del anillo de la ciclopentanona y del lado opuesto de los anteriormente mencionados (*H*-12 y  $H_2-7$ ). La configuración absoluta de los metinos C-8 y C-12, que son los que soportan las cadenas laterales  $\alpha$  y  $\omega$  en el compuesto **P1**, se asignó como 8*R* y 12*R* a partir del análisis de la curva de DC del compuesto **P1**, la cual mostró un efecto Cotton positivo intenso en 230 nm, el cual es del mismo signo que el mostrado por (15*S*)- $\text{PGA}_2$  (**9**) [86]. Si bien la (15*S*)-8-iso- $\text{PGA}_2$  también muestra un efecto Cotton positivo [86, 113], ésta se descarta porque en ella la disposición de las cadenas laterales es *cis* y no *trans* como en **P1**. Las otras posibilidades de configuración de las cadenas laterales (12-iso, o 8-iso 12-iso  $\text{PGA}_2$ ), se descartan por la curvas de DC, ya que éstas presentan efectos Cotton negativos las cuales son opuestas a los datos experimentales obtenidos en este trabajo [86, 113].

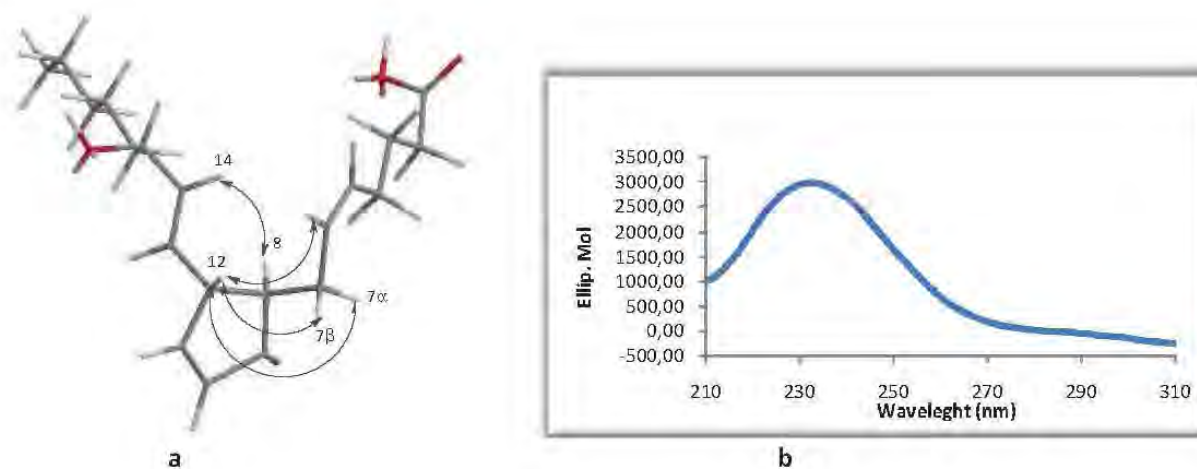


Figura 3.5. a. Algunas correlaciones NOESY y configuración relativa para **P1**. b. Curva de DC de **P1**.

Finalmente, para determinar la configuración absoluta del hidroxilo en C-15 se aplicó del método modificado de Mosher [115] al compuesto **P2** obtenido de **P1**, como se describe en la metodología (sección 3.3.5). Para obtener los ésteres AMAA en C-15 de **P2** se utilizó como agente derivatizante quiral el (*R*)- y (*S*)-MPA, determinando los cambios en los desplazamientos químicos en  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de estos ésteres, apoyados en la asignación de las señales realizada por el experimento  $\text{COSY } ^1\text{H}^{-1}\text{H}$ . De esta manera al hacer la diferencia entre los desplazamientos

encontrados con el derivado (*R*)-MPA y el derivado (*S*)-MPA ( $\Delta\delta_{R-S}$ ) se observaron valores de  $\Delta\delta$  negativos para los protones entre *H*-2 y *H*-14 junto con valores de  $\Delta\delta$  positivos para *H*-15 y *H*-20, indicando que el carbono *C*-15 tiene una configuración absoluta *R* (Figura 3.5), lo que confirmaba de manera inequívoca la estereoquímica de *C*-15, lo cual fue congruente con el análisis de la curva de DC que presentaba la  $\text{PGB}_2$  (**P1a**) obtenida a partir de **P1** (sección 3.3.5), en la que se observó un efecto Cotton negativo en 279 nm, que junto con la rotación óptica de  $[\alpha]_D = -20$ , confirmaban la asignación antes mencionada. Esto debido a que los efectos quirales de  $\text{PGB}_2$  son producto del único centro quiral (*C*-15) que presenta ésta prostaglandina [60, 61, 113]. De este modo la configuración absoluta del compuesto **P1** se estableció como *8R*, *12R*, *15R*.

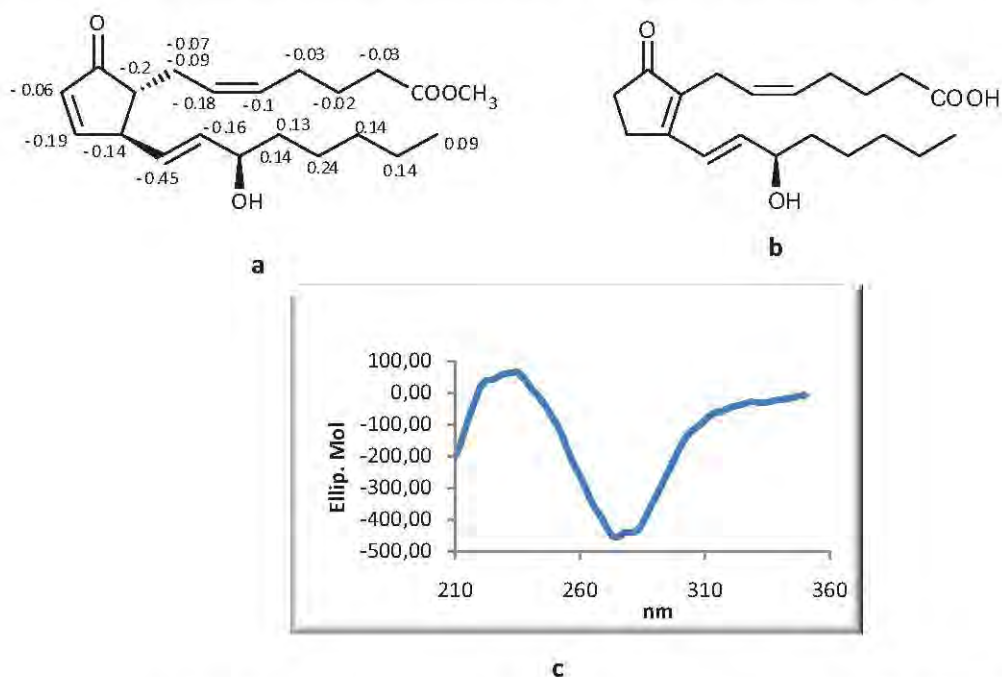


Figura 3.6. a. Valores  $\Delta\delta$  (*R-S*) para los ésteres MPA de **P2**. b.  $\text{PGB}_2$ . c. Curva de DC de  $\text{PGB}_2$  (**P1a**)

Así con la estereoquímica absoluta definida para **P1** y con la idea de correlacionar su estereoquímica con la de los compuestos **P2-P4** se llevaron a cabo reacciones de interconversión entre éstos con **P1**, tal y como se presenta en la figura 3.6. El compuesto **P1** se transformó en el compuesto **P2** por esterificación, este último en el compuesto **P4** por acetilación; mientras que el compuesto **P3** fue obtenido por acetilación de **P1**. De esta manera se obtuvo una relación estructural directa entre los compuestos **P1-P4**, estableciendo correlaciones de sus datos espectroscópicos (RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C, rotación óptica, y DC) y permitiendo establecer la configuración absoluta de **P1-P4**, mediante la comparación de ellos tal y como se discute a continuación.

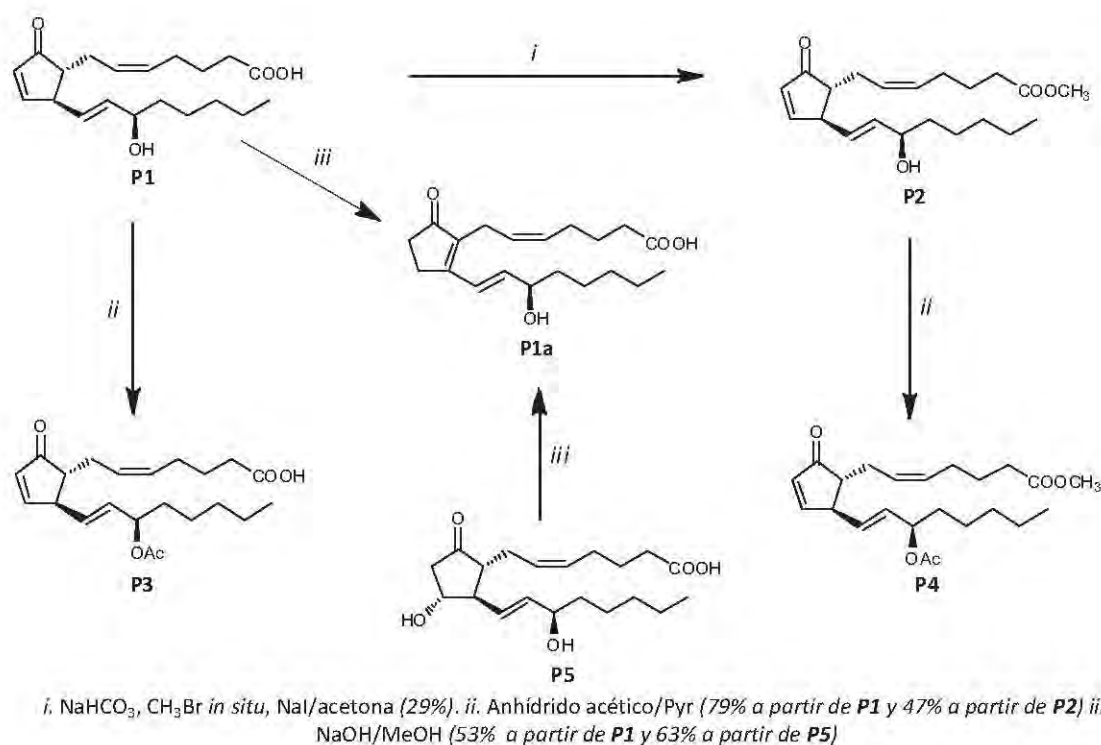
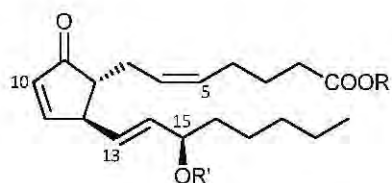


Figura 3.7. Reacciones de interconversión para la determinación absoluta de los compuestos **P1-P5** aislados de *P. homomalla*.

Para establecer la configuración absoluta del compuesto **P2**, el compuesto ya caracterizado **P1** fue transformado en su éster metílico, el producto de reacción obtenido fue caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H, DEPT-135, rotación óptica y curva de diroísmo circular, encontrando que los datos del producto semisintético eran idénticos a del compuesto **P2** natural. Lo anterior indica que el compuesto natural **P2** tiene la misma configuración absoluta de **P1**, y por tanto su configuración en C-15 es *R* como en **P1**. (Figuras 3.6 y 3.7), permitiendo identificar a este compuesto **P2** como la (15*R*)-PGA<sub>2</sub> Me.

Del mismo modo, y para determinar la esteoquímica absoluta de los compuestos **P3** y **P4**, los compuestos **P1** y **P2** se sometieron a una reacción de acetilación en condiciones estándar (sección 3.3.5) y sus productos de reacción fueron posteriormente caracterizados encontrando que sus datos espectroscópicos (RMN-<sup>1</sup>H, DEPT-135 y rotación óptica) eran idénticos a los de los compuestos naturales **P3** y **P4**, respectivamente, indicando la misma configuración absoluta de sus centros quirales. Adicionalmente, las curvas de diroísmo circular de **P3** y **P4** presentaban un efecto Cotton positivo en 230 nm que concordaba con la presentada por el compuesto **P1**, por lo que se concluyó que presentaban la misma configuración de 8*R*, 12*R*, 15*R* (Figuras 3.6 y 3.7) y correspondían a (15*R*)-*O*-AcPGA<sub>2</sub> y (15*R*)-*O*-Ac PGA<sub>2</sub> Me, respectivamente.



PGA<sub>2</sub> Me R=CH<sub>3</sub>, R'=H, **P2**  
 Ac PGA<sub>2</sub> R y R'=H, **P3**  
 Ac PGA<sub>2</sub> Me R=CH<sub>3</sub>, R'=Ac, **P4**

Figura 3.8. Compuestos P2-P4.

El compuesto **P5** presenta cuatro centros asimétricos en C-8, C-11, C-12 y C-15. La configuración del hidroxilo en C-11 fue establecida como *alfa*, por las constantes de acoplamiento de *H*-10<sub>α</sub> (1H, *dd*, *J*=18.4, 8.0), *H*-11 (*dt*, 1H, *J*=8.6, 8.0 Hz) y *H*-12 (*dt*, 1H, *J*=8.6, 2.9 Hz), que muestra relaciones *trans* pseudodaxiales entre los protones *H*-10<sub>α</sub> y *H*-11, y entre este último y *H*-12 (Figura 3.8). La estereoquímica de **P5** en los centros C-8 y C-12 se estableció mediante la curva de DC que presentó un efecto Cotton positivo intenso en 230 nm, y un efecto negativo débil en 297 nm, lo que indica una configuración *8R* y *12R*. Los signos de la curva de DC dependen de la configuración absoluta de los carbonos C-8 y C-12 del anillo [60, 61, 113, 116], así para la PGE<sub>2</sub> *8R* y *12R* se reportan bandas negativas en 296 nm, lo que se explica al aplicar la regla del octante que en la configuración de *8R* genera una pequeña contribución en el octante negativo, por el contrario la configuración de *12R* hace una contribución dominante y determina la gran magnitud del efecto Cotton positivo en 230 nm [60, 113]. Esto está en concordancia con el origen biosintético de las prostaglandinas de la serie A, cuyos precursores son los derivados esterificados y acetilados de PGE<sub>2</sub> que generan por desacetilación enzimática las 10,11-dehidrociclopentanonas características de las prostaglandinas de la serie A, por lo que es de esperarse que los centros asimétricos 8 y 12 permanezcan iguales en PGA<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> [83].

La determinación de la estereoquímica en C-15 de **P5** se estableció por su conversión en PGB<sub>2</sub> (**P1a**), por medio de una reacción de rearrreglo *vinyllogous* [60, 117], este derivado ya había sido obtenido a partir del compuesto previamente caracterizado **P1** (figura 3.7). La elucidación de **P1a** se presenta mas adelante. El producto de la reacción de **P5** presentó las mismas propiedades espectroscópicas (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, CD) y físicas (rotación óptica) que las presentadas por el derivado **P1a**, lo que indicaba una configuración idéntica en C-15 entre **P1** y **P5**. De este modo entonces la configuración absoluta de **P5** se estableció como *8R*, *11R*, *12R*, *15R* (Figura 3.8), permitiendo identificar a **P5** como la (15*R*)-PGE<sub>2</sub> [83, 85, 110b].

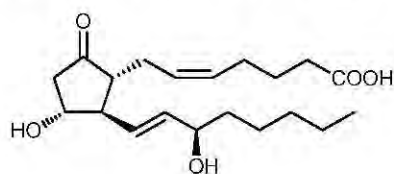


Figura 3.9. PGE2 (P5)

### ➤ Elucidación de los compuestos P1a, P1b y P3a

El compuesto **P1a** (21.3 mg) se obtuvo como un aceite amarillo. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 3.7) presentó señales para un metilo en  $\delta_H$  0.89 (3H, *t*,  $J=6.6$  Hz), para metilenos sp<sup>3</sup> en  $\delta_H$  1.31 (*m*), 1.61 (2H, *dd*,  $J=13.0, 6.9$  Hz), 1.71 (2H, *dt*,  $J=7.1, 1.6$  Hz), 2.20 (2H, *m*), 2.37 (2H, *t*,  $J=7.1$  Hz), 2.42 (*m*), 2.65 (2H, *bd*,  $J=5.4$  Hz) y 3.03 (2H, *t*,  $J=5.4$  Hz). Adicionalmente, se observó una señal en 4.37 (1H, *dd*,  $J=13.0, 5.3$  Hz) perteneciente a un metino carbinólico. Se observaron señales para protones sobre carbonos olefínicos en  $\delta_H$  5.35 (*m*), 5.41 (*m*), 6.28 (1H, *dd*,  $J=15.8, 5.3$  Hz) y 6.86 (1H, *d*,  $J=15.8$  Hz). Es de resaltar la ausencia de protones unidos a carbonos olefínicos de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. El experimento DEPT-135 (Tabla 3.7) mostró la presencia de 16 señales, asignadas a un metilo, diez metilenos sp<sup>3</sup>, un metino sp<sup>3</sup> y cuatro metinos sp<sup>2</sup>. Los desplazamientos químicos tanto en RMN-<sup>1</sup>H como en RMN-<sup>13</sup>C y las constantes de acoplamiento de **P1a** fueron muy similares a las presentadas por (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**1**), las diferencias se encontraban únicamente en la ausencia de las señales de los protones de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado en la ciclopentanona de PGA<sub>2</sub> (**1**) y en la ausencia de señales para los metinos C-8 y C-12 RMN-<sup>13</sup>C (señales en  $\delta_C$  52.7 y 49.6) y RMN-<sup>1</sup>H (señales en  $\delta_H$  2.13 y 3.22 en PGA<sub>2</sub> (**1**)) indicando la migración del doble enlace de C10-C11 a C8-C9, característico de las prostaglandinas tipo PGB, lo que en adición a la similitud de los desplazamientos químicos de PGA<sub>2</sub> permitía establecer a **P1a** como PGB<sub>2</sub> (Figura 3.10).

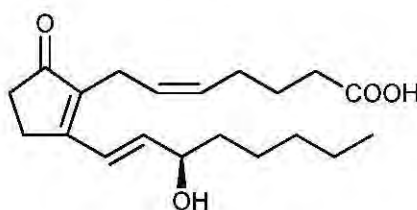


Figura 3.10. PGB<sub>2</sub> (P1a).

En la reacción para convertir el compuesto **P1** al compuesto **P2**, el primero se sometió a una reacción de esterificación usando BF<sub>3</sub> en MeOH, según el procedimiento usual para obtener los ésteres metílicos de ácidos grasos. De este modo se obtuvo un aceite amarillo que se denominó **P1b**. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 3.7) presentó señales para un metilo de final de cadena alifática en  $\delta_H$  0.91 (3H, *t*,  $J=7.2$  Hz), para metilenos sp<sup>3</sup> en  $\delta_H$  1.33, 1.41 (*m*), 1.73 (2H, *dt*,  $J=7.4, 7.5$  Hz), 2.20 (2H, *m*), 2.35 (2H, *t*,  $J=7.5$  Hz), 2.64 (2H, *t*,  $J=6.0$  Hz) y 3.01 (2H, *d*,  $J=6.0$  Hz), además presentó un singlete en  $\delta_H$  3.66 (3H, *s*) que indicaba la presencia de un metoxilo. También se observaron señales para protones sobre carbonos olefínicos en  $\delta_H$  5.34 (*m*), 6.23 (*m*), y 6.66 (*m*). El experimento DEPT-135 (Tabla 3.7) mostró la presencia de 17 señales, asignadas a dos metilos (uno de final de una cadena alifática y otro oxigenado), nueve metilenos sp<sup>3</sup> y seis carbonos olefínicos. Es de resaltar la ausencia de las señales para protones y carbonos para un sistema alfa beta insaturados en la ciclopentanona, así como la ausencia de los metinos C-8 y C-12 tanto en RMN-<sup>13</sup>C (señales en  $\delta_C$  52.7 y 49.6) y RMN-<sup>1</sup>H (señales en  $\delta_H$  2.13 y 3.22), que como en el caso anterior indicaron la migración del doble enlace de C10-C11 a C8-C9, sugiriendo una estructura tipo PGB. Lo anterior se verificó por comparación de nuestros datos de RMN-<sup>1</sup>H y DEPT-135 para PGB<sub>2</sub> (**P1a**) con los datos obtenidos para **P1b**. Adicionalmente, la ausencia del metino carbinólico

cercano a  $\delta_H$  4.37 sugería la pérdida del hidroxilo en C-15, lo que se confirmaba con la aparición de dos señales de metinos olefínicos adicionales en  $\delta_C$  130.3 y 136.7, que fueron asignados a las posiciones C-15 y C-16, respectivamente. Con lo anterior se pudo establecer a **P1b** como la 15-deoxi- $\Delta^{15}$ -PGB<sub>2</sub> (Figura 3.10). De este modo se evidenció que la reacción no llevó el curso esperado, quizá por las fuertes condiciones de la reacción, razón por la cual se usó la metilación del ácido por S<sub>N</sub>2 tal y como se indicó en la figura 3.7.

De manera similar el compuesto **P3a** (6 mg) fue obtenido como un aceite amarillo pálido, por tratamiento del compuesto **P3** con BF<sub>3</sub>/MeOH. Su espectro en RMN-<sup>1</sup>H presentó señales de metilenos sp<sup>3</sup> en  $\delta_H$  1.28, 1.63 (*m*), 1.51 (*m*), 1.70 (2H, *dt*, *J*=7.5, 7.3 Hz), 2.21 (2H, *m*), 2.32 (2H, *t*, *J*=7.5), 2.41 (2H, *dd*, *J*=4.6, 2.1 Hz), 2.64 (2H, *t*, *J*=6.0 Hz), 3.01 (2H, *d*, *J*= 6 Hz). Adicionalmente, se observaron dos singletes en  $\delta_H$  3.66 (3H, *s*) y en  $\delta_H$  3.29 (3H, *s*) que sugirieron la presencia de dos metoxilos. Por otro lado se observaron señales de un metino carbinólico en  $\delta_H$  3.71 (1H, *dd*, *J*=13.2 6.9 Hz), junto con señales para protones sobre carbonos olefínicos  $\delta_H$  5.32 (*m*), 6.73 (1H, *dd*, *J*=15.8, 9.2 Hz) y 6.08 (1H, *dd*, *J*=15.8, 6.9 Hz). En el experimento DEPT-135 se presentaron 18 señales asignadas a un metilo unido a una cadena alifática, dos metoxilos, diez metilenos sp<sup>3</sup>, cinco metinos, cuatro de los cuales son olefínicos, mientras el restante corresponde a un carbono sp<sup>3</sup>. Estos desplazamientos y constantes de acoplamiento sugieren una estructura tipo PGB, lo cual se confirma por: la ausencia de señales de protones de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, característico de PGA<sub>2</sub> y la ausencia de las señales características de los metinos de las posiciones 8 y 12 ( $\delta_C$  52.7 y 49.6;  $\delta_H$  2.13 y 3.22 en **P1**). Esto indicó que al igual que en el compuesto **P1b** ocurrió una migración del doble enlace entre C-10 y C-11 a C8-C9, característico de las prostaglandinas de la serie B. Adicionalmente, el desplazamiento químico del metino carbinólico de la posición C-15 ( $\delta_H$  3.71, 1H, *q*, *J*=6.6 Hz;  $\delta_C$  81.5), indicó la metilación del hidroxilo con respectiva pérdida del grupo acetilo de esta posición. El metoxilo adicional se asignó el correspondiente a el éster metílico en el C-1 de esta prostaglandina, para finalmente establecer la estructura de **P3a** como el derivado metoxilado en C-15 del ester metílico de la PGB<sub>2</sub> (15-O-Me PGB<sub>2</sub> Me) que se muestra en la figura 3.10. Así, al igual que con el compuesto **P1b** no se logró obtener el compuesto esperado, por lo que se modificó el método de síntesis como se ilustra en la figura 3.7.

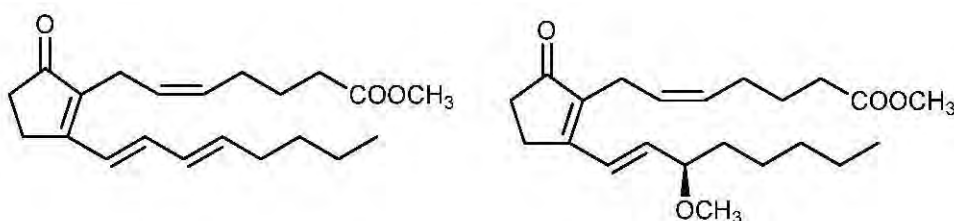


Figura 3.11. Compuestos **P1b** y **P3a**.

Tabla 3.7. Desplazamientos en RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) y -<sup>13</sup>C (100 MHz) para **P1a**, **P1b** y **P3a** en CDCl<sub>3</sub>;  $\delta$  en ppm, *J* en Hz.

No.	P1a		P1b		P3a	
	$\delta$ (H)	$\delta$ (C) <sup>b</sup>	$\delta$ (H)	$\delta$ (C) <sup>b</sup>	$\delta$ (H)	$\delta$ (C) <sup>b</sup>
1	-	-	-	-	-	-
2	2.37 (2H, t, J=7.1)	31.7 CH <sub>2</sub>	2.35 (2H, t, J=7.5)	32.8 CH <sub>2</sub>	2.32 (2H, t, J=7.5)	33.4 CH <sub>2</sub>
3	1.71 (2H, dt, J=7.1, 1.6)	22.6 CH <sub>2</sub>	1.73 (2H, dt, J=7.4, 7.5)	22.4 CH <sub>2</sub>	1.70 (2H, dt, J=7.5, 7.3)	22.6 CH <sub>2</sub>
4	2.20 (2H, m)	25.1 CH <sub>2</sub>	2.20 (2H, m)	25.6 CH <sub>2</sub>	2.21 (2H, m)	24.9 CH <sub>2</sub>
5	5.35 (1H, m)	129.4 CH	5.34 (1H, m)	131.1 CH	5.32 (1H, m)	131.1 CH
6	5.41 (1H, m)	126.8 CH	5.34 (1H, m)	129.6 CH	5.32 (1H, m)	126.6 CH
7	2.42 (2H, m)	25.9 CH <sub>2</sub>	2.42 (2H, m)	26.7 CH <sub>2</sub>	2.41 (2H, dd, J=4.6, 2.1)	26.6 CH <sub>2</sub>
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	2.65 (2H, bd, J=5.4)	33.7 CH <sub>2</sub>	3.01 (2H, d, J=6.0)	33.9 CH <sub>2</sub>	3.01 (2H, d, J=6.0)	33.7 CH <sub>2</sub>
11	3.03 (2H, t, J=5.4)	33.2 CH <sub>2</sub>	2.64 (2H, t, J=6.0)	33.6 CH <sub>2</sub>	2.64 (2H, t, J=6.0)	33.5 CH <sub>2</sub>
12	-	-	-	-	-	-
13	6.86 (1H, d, J=15.8)	123.5 CH	6.66 (1H, m)	127.3 CH	6.73 (1H, dd, J=15.8, 9.2)	130.4 CH
14	6.28 (1H, dd, J=15.8, 5.3)	140.6 CH	6.66 (1H, m)	141.7 CH	6.08 (1H, dd, J=15.8, 6.9)	133.5 CH
15	4.37 (1H, dd, J=13.0, 5.3)	72.3 CH	6.23 (1H, m)	130.3 CH	3.71 (1H, dd, J=13.2, 6.9)	81.5 CH
16	1.61 (2H, dd, J=13.0, 6.9)	37.0 CH <sub>2</sub>	6.03 (1H, m)	136.7 CH	1.63 (1H, m)/1.51 (1H, m)	35.3 CH <sub>2</sub>
17	1.31 <sup>a</sup>	24.5 CH <sub>2</sub>	2.20 (2H, m)	24.8 CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>a</sup>	24.7 CH <sub>2</sub>
18	1.31 <sup>a</sup>	26.4 CH <sub>2</sub>	1.41 (2H, m)	31.2 CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>a</sup>	31.8 CH <sub>2</sub>
19	1.31 <sup>a</sup>	21.6 CH <sub>2</sub>	1.33 (2H, m)	21.4 CH <sub>2</sub>	1.28 <sup>a</sup>	21.4 CH <sub>2</sub>
20	0.89 (3H, t, J=6.6)	14.1 CH <sub>3</sub>	0.91 (3H, t, J=7.2)	14.1 CH <sub>3</sub>	0.88 (3H, t, J=6.8)	14.1 CH <sub>3</sub>
OOCH <sub>3</sub>	-	-	3.67 (3H, s)	51.6 CH <sub>3</sub>	3.66 (3H, s)	51.5 CH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub>	-	-	-	-	3.29 (3H, s)	56.8 CH <sub>3</sub>

<sup>a</sup> Señales solapadas. <sup>b</sup> Datos obtenidos por DEPT-135

De otro lado, los estudios llevados a cabo sobre *P. homomalla* han establecido que la configuración de las prostaglandinas que produce varía según la región geográfica donde el espécimen se recolecte [5-7]. Así, los especímenes de la parte norte del Caribe (Cayos de Florida y Bahamas) producen prostaglandinas tipo *R*, salvo algunas excepciones en las que se ha encontrado ambos epímeros, mientras que en el Caribe central (Islas Caimán) el mismo octocoral produce exclusivamente prostaglandinas de tipo *S* [61, 82, 83]. Esto indicaba que era probable encontrar prostaglandinas tipo *S* en la parte Sur del Caribe. Sin embargo, en el estudio químico aquí realizado sobre este octocoral recolectado en San Andrés encontramos cinco prostaglandinas, cuatro de la serie A y una de la serie E, con una configuración *R* en C-15, además dentro de los compuestos aquí presentados no se detectaron prostaglandinas de tipo *S*, lo que sugiere que *P. homomalla* de ésta parte del Caribe es un productor mayoritariamente de prostaglandinas de tipo *R*.

Cabe mencionar además que con este trabajo se hizo evidente que hay diferencias en cuanto al contenido de prostaglandinas en *P. homomalla* variedad *R* del norte del Caribe y en la del Sur del Caribe (en el presente trabajo estudiada), ya que en las primeras se han encontrado variaciones en la geometría de los dobles enlaces de las cadenas laterales [86], sin embargo, las prostaglandinas aisladas en este estudio presentaron la misma geometría de *Z* y *E* para las

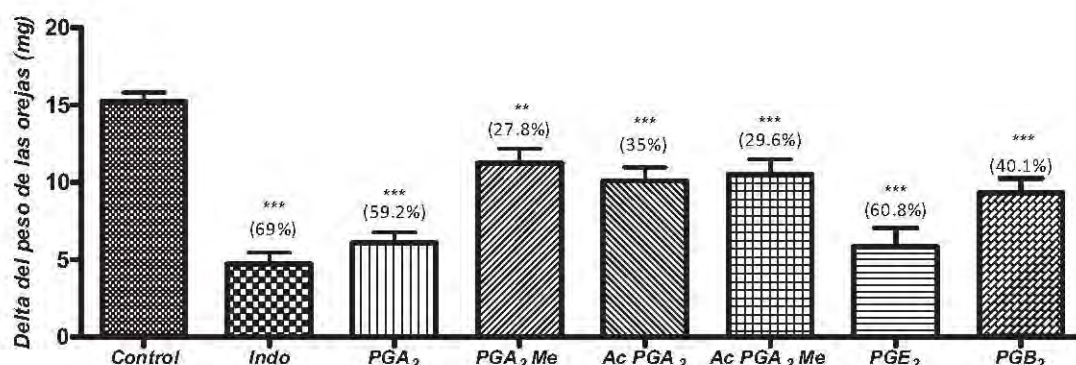


cadena  $\alpha$  y  $\omega$ , respectivamente. No obstante, falta el estudio de algunas otras prostaglandinas minoritarias presentes en el extracto aquí estudiado. Adicionalmente, en este trabajo no se detectaron las  $PGE_2$  Me ni Ac  $PGE_2$  Me, encontradas en los especímenes de Cayos de Florida.

Para finalizar y como una contribución adicional al estudio químico de *P. homomalla*, aparte de las cinco prostaglandinas naturales aisladas y el derivado (15*R*)- $PGB_2$ , se obtuvieron dos derivados semisintéticos identificados como Me  $PGB_2$  Me y 15-deoxi  $\Delta^{15}$ - $PGB_2$  Me, que podrían resultar activos en ensayos de actividad antiinflamatoria, los cuales se presentan a continuación para los compuestos de origen natural y para la  $PGB_2$ .

### 3.3.2 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria

Como se mencionó anteriormente, el extracto crudo de este animal presentó una actividad antiinflamatoria potente (figura 1.4, página 17), razón por la cual nos resultó interesante evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos naturales aislados, junto con uno de los derivados semisintéticos obtenidos. Para evaluar la actividad antiinflamatoria se empleó el ensayo de edema auricular inducido por TPA. Los compuestos evaluados fueron la (15*R*)- $PGA_2$  (**P1**), la (15*R*)- $PGA_2$  Me (**P2**), la (15*R*)-*O*-Ac  $PGA_2$  (**P3**), la (15*R*)-*O*-Ac  $PGA_2$  Me (**P4**), la (15*R*)- $PGE_2$  (**P5**) y la (15*R*)- $PGB_2$  (**P1a**). En figura 3.12 se presentan los resultados de actividad antiinflamatoria de los compuestos evaluados expresados como el delta del peso de las orejas del ratón en mg. La barra del control (figura 3.12) corresponde a la inflamación causada en la oreja del ratón producto de la aplicación del TPA sin ningún tratamiento con los compuestos aislados. Las barras siguientes corresponden al edema causado, expresado en la parte superior de la barra como porcentaje de inhibición con respecto al control, por el TPA en la oreja del ratón previo tratamiento con el compuesto a evaluar o con el patrón positivo (indometacina). Este último redujo el edema con un porcentaje de inhibición del 69%, que es del mismo orden encontrado en ensayos anteriores [118], corroborando la validez de los resultados obtenidos en este ensayo para los compuestos evaluados.



**Figura 3.12.** Actividad antiinflamatoria de los compuestos (15*R*)- $PGA_2$  (**P1**), (15*R*)- $PGA_2$  Me (**P2**), (15*R*)-*O*-Ac  $PGA_2$  (**P3**), (15*R*)-*O*-Ac  $PGA_2$  Me (**P4**), (15*R*)- $PGE_2$  (**P5**), (15*R*)- $PGB_2$  (**P1a**), obtenidos de *P. homomalla* (0.5 mg/oreja). Indo (Indometacina 0.5 mg/oreja). Datos expresados como la media  $\pm$  E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnet: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). En paréntesis el porcentaje de inhibición de la inflamación.

Tabla 3.8. Efectos de los compuestos aislados de *P. homomalla* sobre el edema auricular inducido por TPA.

Tratamiento	$\Delta$ edema (mg) $\pm$ EEM <sup>a</sup>	% Inhibición
Control	15.2 $\pm$ 2.6	
INDO	4.7 $\pm$ 3.2 <sup>***</sup>	69
PGA <sub>2</sub>	6.1 $\pm$ 1.2 <sup>***</sup>	59.2
PGA <sub>2</sub> Me	11.2 $\pm$ 2.7 <sup>**</sup>	27.8
Ac PGA <sub>2</sub>	10.1 $\pm$ 2.4 <sup>***</sup>	35
Ac PGA <sub>2</sub> Me	10.5 $\pm$ 2.8 <sup>***</sup>	29.6
PGE <sub>2</sub>	5.8 $\pm$ 3.4 <sup>***</sup>	60.8
PGB <sub>2</sub>	9.3 $\pm$ 2.8 <sup>***</sup>	40.1

<sup>a</sup> Datos expresados como la media  $\pm$  E.E.M., n=10 (ANOVA post-test Dunnet: \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Los datos presentados en la tabla 3.8, muestran que en general todos los compuestos inhibieron en alguna medida el edema producido por el TPA en la oreja del ratón con porcentajes de inhibición por encima de 27%. Sin embargo, es de notar que la (15*R*)-PGE<sub>2</sub> y (15*R*)-PGA<sub>2</sub> muestran resultados importantes pues presentan porcentajes de inhibición del 60.8% y 59.2%, respectivamente, que son similares a los encontrados para el fármaco de referencia (69%). Es interesante notar que los derivados metílicos y acetilados de la PGA<sub>2</sub> presentaron actividad menor (casi la mitad) que la PGA<sub>2</sub>, lo que sugiere que la actividad antiinflamatoria *in vivo* podría depender de la presencia de un grupo carboxilato. Adicionalmente, cabe mencionar que las prostaglandinas variedad *R* carecen de actividad vasoconstrictora [60, 79, 86], por lo que la actividad antiinflamatoria aquí presentada es consecuencia de un verdadero efecto antiinflamatorio.

Si bien a la fecha no hay estudios de actividad antiinflamatoria de estas prostaglandinas tipo *R*, el éster metílico acetilado de (15*S*)-PGA<sub>2</sub>, epímero de **P4** ha sido evaluado en ensayos *in vitro*, junto con su isómero posicional PGJ<sub>2</sub>, además de los derivados 15*d*-PGJ<sub>2</sub> y 15*d*-PGA<sub>2</sub>, todos como ésteres metílicos acetilados. Estas prostaglandinas 15*S* presentaron actividad antiinflamatoria al inhibir iNOS, mediante un mecanismo de acción que fue atribuido a la presencia de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado en sus estructuras [108b]. En ese sentido se podrían relacionar los resultados mostrados por dichos compuestos con los obtenidos aquí en el ensayo *in vivo*, ya que las prostaglandinas evaluadas por nosotros presentan también un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, por lo que se esperaría que todas presentaran actividad antiinflamatoria. Sin embargo, los resultados muestran que con los derivados metilados y acetilados la actividad se reduce casi a la mitad de la presentada por PGA<sub>2</sub>. Ahora bien, se podría decir que las prostaglandinas en su forma de ésteres metílicos tienen una polaridad menor que las que se presentan con el ácido libre, por ende las primeras serán menos solubles (menos hidrofílicas), lo que impediría una buena permeabilidad del compuesto, dificultando su paso a través de las diferentes capas de la piel, lo que explicaría por qué la (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**P1**) presenta actividad comparable con la indometacina, mientras que sus derivados metilados y acetilados presentan bajos porcentajes de inhibición. Esta hipótesis sin embargo, hay que confirmarla con ensayos *in vitro* de estos compuestos y así evaluar la influencia que tiene la presencia o ausencia de los grupos metilo y acetato de las prostaglandinas, en la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los mismos.

En cuanto a la (15*R*)-PGB<sub>2</sub> (**P1a**)<sup>8</sup>, ésta presentó actividad antiinflamatoria moderada, con niveles de inhibición mayores a los derivados esterificados y metilados, pero menores a los presentados por las prostaglandinas precursoras. Un factor que puede influir en la actividad observada es la estereoquímica de los centros C-8 y C-12, ya que como lo reporta Dang y colaboradores, en trabajos sobre derivados de jasmonatos (compuestos estructuralmente relacionados con las prostaglandinas) [112], un aumento en la actividad antiinflamatoria se da en compuestos con una estereoquímica de C-8*R* y C-12*R*, la misma que presentan los compuestos **P1-P5** aislados en este trabajo, por lo que la carencia de estos centros asimétricos en (15*R*)-PGB<sub>2</sub> (**P1a**), se vería reflejada en una disminución de la actividad observada. Cabe además mencionar que (15*R*)-PGB<sub>2</sub> (**P1a**) no ha sido evaluado en ensayos de actividad antiinflamatoria anteriormente, sin embargo, su epímero (15*S*)-PGB<sub>2</sub>, no presentó actividad en modelos *in vitro*, lo que fue atribuido a la ausencia de carbonos electrofílicos [94, 99, 101]. Hace falta entonces evaluar (15*R*)-PGB<sub>2</sub> (**1a**) en ensayos *in vitro* para confirmar la ausencia de actividad antiinflamatoria.

La alta actividad presentada por la (15*R*)-PGE<sub>2</sub> (**P5**) contrasta con los resultados obtenidos en ensayos de actividad antiinflamatoria en los que se indica que la presencia de un sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado es necesario para presentar esta actividad. Varios ensayos *in vitro* realizados con (15*S*)-PGE<sub>2</sub> como inhibidor de mediadores proinflamatorios (NF-KB, iNOS), han mostrado poca o nula actividad [99, 108b]. Por lo que surgen dos hipótesis: En la primera, es posible que (15*R*)-PGE<sub>2</sub> (**P5**) pueda actuar de una manera diferente a la evaluada en los otros trabajos, teniendo en cuenta que el epímero 15*S* de PGE<sub>2</sub>, es un importante mediador proinflamatorio [100, 119]. Sin embargo, no se observaron efectos proinflamatorios en el ensayo realizado, por el contrario se observa una notable reducción de la inflamación (la más alta de los compuestos ensayados). Adicionalmente, cambios en la actividad de las prostaglandinas como consecuencia del cambio en su estereoquímica han sido reportados [60, 79, 112], por ejemplo (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub> Me carece de la actividad clásica de los epímeros en C-15(*S*) de actuar sobre el músculo liso (criterio usado por algunos investigadores como indicador de efectos colaterales [92]). En una segunda hipótesis se plantea que (15*R*)-PGE<sub>2</sub> (**P5**) se haya convertido en PGA<sub>2</sub> por deshidratación [101]. Se sabe que los precursores como (15*S*)-PGD<sub>2</sub> y (15*R*)-PGE<sub>2</sub> generan por deshidratación *in vivo* metabolitos como PGA<sub>2</sub> y PGJ<sub>2</sub>, como se evidencia en ensayos de edema plantar inducido por carragenina en los que administraciones de (15*R*)-PGD<sub>2</sub> ocasionaron en primer lugar aumento del edema, luego de lo cual presentó inhibición por la posterior transformación a (15*R*)-PGJ<sub>2</sub> [101, 103]. Adicionalmente, hay evidencias que muestran que el almacenamiento de preparaciones farmacéuticas de (15*S*)-PGE<sub>2</sub> puede formar PGA<sub>2</sub> y PGB<sub>2</sub> [101]. Sin embargo, esta posibilidad se descarta dado que después de hacer el ensayo se registraron los espectros de RMN, cuyo análisis mostró que no había variación en la estructura luego de ser disueltos en acetona. Ahora bien, a diferencia del ensayo con edema plantar en el que usaron (15*S*)-PGD<sub>2</sub> [103], la aplicación de (15*R*)-PGE<sub>2</sub> (**P5**), no tuvo efectos proinflamatorios a las 4 hs, que es el pico de actividad de los mediadores evaluados por el modelo de edema auricular [66]. Adicionalmente, ensayos *in vitro* en células no han reportado conversión de (15*S*)-PGE<sub>2</sub> en (15*S*)-PGA<sub>2</sub>. Con los datos presentes sin embargo, no es posible concluir cual es la hipótesis correcta, por lo que se requieren de ensayos *in vitro* para evaluar la acción sobre mediadores específicos.

---

<sup>8</sup> Prostaglandina derivada de PGA<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>

La (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**P1**) presentó actividad antiinflamatoria comparable a la indometacina, resultado importante, ya que como se explicó en el marco teórico, las prostaglandinas con sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados pueden actuar en diferentes dianas modulando en este caso la respuesta antiinflamatoria. Adicionalmente, este es el primer reporte de actividad antiinflamatoria para prostaglandinas de la variedad *R*, las cuales, además de que tradicionalmente se consideraban inactivas [60, 79], habían mostrado no tener actividad sobre el músculo liso [60, 79], criterio utilizado para la evaluación de efectos colaterales [92], lo cual a su vez sugiere que no solo la manera en la cual este compuesto modula la actividad antiinflamatoria puede variar respecto a la forma en que las (15*S*)-PGA<sub>2</sub> ya estudiadas lo hacen, sino que además es posible que presente diferencias en sus efectos colaterales.

En cuanto al posible mecanismo de acción, creemos que es improbable que la (15*R*)-PGA<sub>2</sub> (**P1**) actúe a nivel de receptores membranales, ya que en el modelo de edema auricular inducido por TPA, los neutrófilos son los primeros en llegar a la fuente del estímulo, liberando subsecuentemente mediadores proinflamatorios [66], y se ha establecido que compuestos de tipo PGA son débiles agonistas de los receptores DP<sub>1</sub> presentados en los neutrófilos [102]. Ahora bien, otro mecanismo de acción se da mediante la inhibición de NF- $\kappa$ B, ya que como se mencionó en el marco teórico, compuestos de tipo PGA pueden prevenir la acción de NF- $\kappa$ B por inhibición de IKK en células activadas con TPA, lo que sugiere un posible mecanismo de acción [99, 102].

Otro posible mecanismo de acción es la inhibición de iNOS, diana de compuestos tipo PGA, que esta relacionado con la capacidad que tienen estos mismos compuestos de actuar sobre los PPARs [101, 102]. Cabe notar que como se mencionó anteriormente existen diferencias de selectividad en cuanto a la potencia y acción de los compuestos  $\alpha,\beta$ -insaturados, PGA y PGJ, por lo que la diferencia en el centro asimétrico C-15 puede hacer que actúe por otras rutas o actuar en menor o mayor proporción. De nuevo con los datos presentes no se puede realizar una aproximación concluyente sobre el posible mecanismo de acción de (15*R*)-PGA<sub>2</sub> y (15*R*)-PGE<sub>2</sub>, por lo que hace falta entonces realizar ensayos *in vitro* contra mediadores específicos, como iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , además de especies de oxígeno reactivas (EOR) y nitrógeno (ENR) e incluso actividad enzimática mieloperoxidasa, elastasa,  $\beta$ -glucuronidasa, lisozima con el fin de aproximarnos a elucidar el mecanismo de acción.

De esta manera y a modo de conclusión el estudio químico del octocoral *P. homomalla* permitió el aislamiento de cinco prostaglandinas, además de dos prostaglandinas semisintéticas. Adicionalmente, se reporta por primera vez la actividad antiinflamatoria de las prostaglandinas de tipo *R*, dentro de las que se destacan las PGA<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> por presentar actividad antiinflamatoria comparable a la indometacina. Lo que las hace buenas candidatas para continuar con sus estudios a nivel de mediadores para conocer un poco más de sus mecanismos de acción.

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1 General

Los soportes cromatográficos, columnas cromatográficas, solventes, reveladores de CCD, equipos de HPLC, RMN y HRESIMS fueron los mismos que se mencionaron en el numeral 2.3.1.

### 3.3.2 Material Animal

Especímenes de *P. homomalla* fueron recolectados en la localidad de “El Faro” en la Isla de San Andrés, a una profundidad de 3 m, mediante buceo autónomo SCUBA por la Dra. Mónica Puyana, Bióloga Marina, y Ph. D. en Oceanografía, quien realizó la clasificación de los mismos basándose en preparados de espículas y morfología de las colonias usando las claves taxonómicas de los trabajos de Bayer [53]. Individuos de *P. homomalla* fueron depositados en la colección de invertebrados del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia bajo el código ICN-MHN-PO-0256. Una vez recolectadas las muestras fueron inmediatamente congeladas y mantenidas a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su extracción.

### 3.3.3 Extracción del octocoral *P. homomalla*

El material animal (900 g) se cortó en finos trozos y fue extraído tres veces con una mezcla de  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. Este extracto se filtró y se concentró a presión reducida obteniendo 105.8 g de extracto.

### 3.3.4 Fraccionamiento del Extracto Total

El extracto total se sometió a partición entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1:1 v/v; 2 L). La fracción orgánica (89.9 g) fue sometida a CC flash sobre sílica gel eluyendo con 1L de mezclas de hexano/benceno (10:10 v/v), benceno/EtOAc (90:10 v/v), benceno/EtOAc (70:30 v/v), benceno/EtOAc (50:50 v/v), EtOAc (100%), EtOAc/MeOH (80:20 v/v) y MeOH (100%) obteniéndose diez fracciones (FI-FX).

La fracción VII (4.0 g) se analizó por RMN- $^1\text{H}$  y  $^{-13}\text{C}$  según las condiciones descritas en el numeral 3.3.1, pudiendo establecer que estaba compuesta principalmente por el compuesto P1.

La fracción FV (3 g) se sometió a CLAE en una columna RP-18 preparativa Hibar (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  80:20 v/v, 3.5 mL/min,  $\lambda=250$  nm) obteniéndose 13 subfracciones. Una parte de la subfracción FV-II (38 mg), fue purificada por CLAE en las mismas condiciones, obteniéndose 6.2 mg del compuesto P2 ( $t_{\text{R}}=66.8$  min.). La subfracción FV-III (30 mg), fue purificada por CLAE en las mismas condiciones, obteniéndose 4.7 mg del compuesto P3 ( $t_{\text{R}}=69.5$  min.). Una parte de la subfracción FV-X (500 mg), fue purificada por CLAE en las mismas condiciones, obteniéndose 230 mg del compuesto P4 ( $t_{\text{R}}=99.5$  min.). La fracción FVI (400 mg) fue sometida a CLAE en una columna RP-18 preparativa Hibar (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  80:20 v/v, 3.5 mL/min,  $\lambda=250$  nm) obteniéndose cinco subfracciones, de las cuales FVI-II (40 mg) y FVI-III (80 mg), fueron purificadas por CLAE en una columna RP-18 preparativa Hibar (MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  70:30 v/v, 3.5 mL/min,  $\lambda=250$  nm) para obtener los compuestos P2 (20 mg) y P3 (43 mg), respectivamente.

La fracción IV (4.8 g) se analizó por RMN- $^1\text{H}$  y DEPT-135 según las condiciones descritas en el numeral 3.3.1, pudiendo establecer que estaba compuesta principalmente por el compuesto P4.

La fracción VIII (42.3 mg) se analizó por RMN- $^1\text{H}$  y DEPT-135 según las condiciones descritas en el numeral 3.3.1, pudiendo establecer que estaba compuesta principalmente por el compuesto P5.

En la figura 3.13 se presenta el diagrama de fraccionamiento del extracto de *Plexaura homomalla*.

### 3.3.5 Reacciones de conversión y derivatización

#### ➤ Obtención del compuesto P3 a partir del compuesto P1

100 mg del compuesto **P1** fueron tratados con 4 ml de anhídrido acético en 4 mL de piridina seca. La reacción fue mantenida en agitación constante a temperatura ambiente y monitoreada por CCD. La mezcla de reacción fue concentrada y purificada en CC sobre sílica gel (hexano 100% a EtOAc 100%), obteniéndose el compuesto **P1** (90 mg, 79%).

#### ➤ Obtención del compuesto P2 a partir del compuesto P1

Una solución del compuesto **P1** (100 mg, 0.30 mmol) fue tratada con NaHCO<sub>3</sub> (101 mg, 1.2 mmol) en acetona durante 1 hora y en agitación constante. Posteriormente se adicionó NaI (900 mg, 6 mmol) y se burbujó CH<sub>3</sub>Br generado *in situ*. La reacción se mantuvo a 0°C, ocasionalmente agitada y monitoreada por CCD. Cuando la reacción se completó se filtro el NaBr, se redujo el volumen de reacción por destilación a presión reducida en rotavapor y se extrajo con AcOEt. Posteriormente la fase orgánica se concentró y el residuo fue sometido a CC sobre sílica gel (benceno 100% a EtOAc 100%) para obtener el compuesto **P2** (30 mg, 28.8%).

#### ➤ Obtención del compuesto P4 a partir del compuesto P2

20 mg (0.06 mmol) del compuesto **P2** fueron tratados con 2 ml de anhídrido acético en 2 mL de piridina seca. La reacción fue mantenida en agitación constante a temperatura ambiente durante dos horas y monitoreada por CCD. La mezcla de reacción fue concentrada y purificada en CC sobre sílica gel (hexano 100% a EtOAc 100%), obteniéndose el compuesto **P4** (11 mg, 47 %).

#### ➤ Preparación de los ésteres (R)- y (S)-MPA del compuesto P2

10 mg del compuesto **P2** fueron tratados con los ácidos (R)- y (S)- MPA por separado en presencia de DCC (0.05 mmol) y DMAP (cantidad catalítica) en 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. Las reacciones fueron monitoreadas por CCD y las mezclas filtradas para remover la DHU. Posteriormente fueron purificadas por CC sobre sílica gel (hexano 100% - AcOEt 100%), obteniéndose 7 mg de cada uno de los ésteres.

#### ➤ Obtención de la prostaglandina B<sub>2</sub> (compuestos P1a)

Una solución del compuesto **P1** (40 mg, 0.12 mmol) fue tratada con NaOH 1 N (6 mL) en MeOH (6 mL). La reacción se mantuvo en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Cuando la reacción se completó se adicionó HCl 1 N (6 mL) y se extrajo con AcOEt tres veces. Posteriormente, la fase orgánica se concentró a presión reducida y el residuo fue sometido a CC sobre sílica gel (benceno 100% a EtOAc 100%) para obtener el compuesto **P1a** (21.3 mg, 53%) [6]. De manera similar 15 mg del compuesto **P5** fueron sometidos a las mismas condiciones de reacción obteniéndose el compuesto **P1a** (9 mg, 63%).

➤ **Obtención de los compuestos P3a y P1b**

40 mg (0.11 mmol) del compuesto 3 fueron tratados con  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  (5 mL) y sometidos a reflujo a  $60^\circ\text{C}$  durante 2 horas. La mezcla de reacción fue extraída con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y purificada CC sobre sílica gel (Hexano 100% - AcOET 100%) obteniéndose 6 mg del compuesto **P3a** (15.8%). De manera similar 45 mg del compuesto **P1** (0.13 mmol) fueron sometidos a reacción, obteniéndose 12 mg del compuesto **P1a** (30%).

**3.3.6 Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria de los compuestos P1, P1a-P5**

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos puros se realizó mediante el modelo de edema auricular inducido por TPA, como se explica en el numeral 1.3.3 (cap.I, página 31).

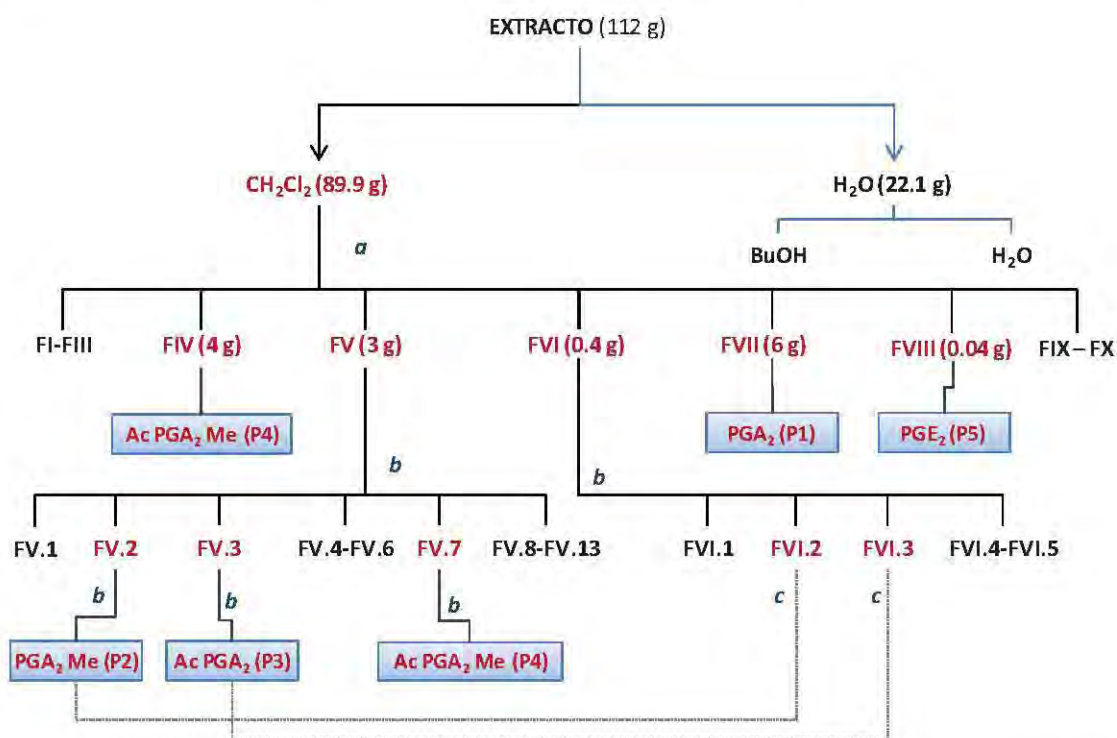


Figura 3.13.a. CC SiO<sub>2</sub>, Hexano→AcOEt/MeOH (80:20). b. CLAE-prep. Hibar RP-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 80:20 v/v, 3.5 mL/min, λ= 250 nm). c. CLAE-prep. Hibar RP-18, MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v, 3.5 mL/min, λ= 250 nm

### 3.3.7 Datos espectroscópicos de los compuestos aislados y obtenidos

- (15*R*) Prostaglandina A<sub>2</sub> (P1): aceite viscoso rojo.  $[\alpha]_D = +59$  (c 0.79, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5. HR-ESI-MS (+): 357.2037 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na; calc. 357.2036).
- (15*R*) Prostaglandina A<sub>2</sub> Me (P2): aceite viscoso amarillo.  $[\alpha]_D = +85$  (c 1.15, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5. HR-ESI-MS (+): 371.2205 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>Na; calc. 371.2198).
- (15*R*) Ac Prostaglandina A<sub>2</sub> (P3): aceite viscoso amarillo pálido.  $[\alpha]_D = +102.7$  (c= 0.79, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5. HR-ESI-MS (+): 399.2130 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>Na; calc. 399.2142).
- (15*R*) Ac Prostaglandina A<sub>2</sub> Me (P4): Aceite amarillo oscuro.  $[\alpha]_D = +87.5$  (c= 1.78, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5. HR-ESI-MS (+): 413.2293 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>Na; calc. 413.2298).
- (15*R*) Prostaglandina E<sub>2</sub> (P5): aceite viscoso pardo.  $[\alpha]_D = -8.5$  (c= 0.9, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5. HR-ESI-MS (+): 351.2166 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>; calc. 351.2177).
- (15*R*) Prostaglandina B<sub>2</sub> (P1a/5a): sólido amorfo amarillo.  $[\alpha]_D = -22.5$  (c=2.1, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5. HR-ESI-MS (+): 351.2166 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>5</sub>; calc. 351.2177).
- Prostaglandina B<sub>2</sub> Me<sub>2</sub> (P3a): aceite viscoso amarillo.  $[\alpha]_D = -0.2$  (c= 0.5, CHCl<sub>3</sub>). RMN -<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5.
- 15-deoxi- $\Delta^{15,16}$ -PGB<sub>2</sub> (P1b): aceite viscoso amarillo. RMN-<sup>1</sup>H y -<sup>13</sup>C: ver Tabla 5.



## Conclusiones y Recomendaciones

Mediante el ensayo de edema auricular inducido con TPA, se evaluaron ocho especies de octocorales del género *Eunicea* y dos del género *Plexaura*, detectándose cinco extractos con actividad antiinflamatoria promisorio, a saber, *Eunicea* sp. (E71), *Eunicea* sp. (E60), *Plexaura* A, *Eunicea fusca* y *Plexaura homomalla*, siendo los dos últimos extractos los que presentaron mayor actividad convirtiéndose en objeto de este estudio. Así, la presente investigación se constituyó el primer reporte del estudio químico y de actividad biológica de estos octocorales recolectados en aguas de Colombia, contribuyendo de este modo a las investigaciones sobre biodiversidad en la fauna del mar Caribe Colombiano.

De la fracción orgánica del extracto del octocoral *E. fusca* se aisló y posteriormente identificó un compuesto nuevo, denominado por nosotros fuscósido E, junto a los compuestos ya conocidos fuscósido B, fuscól, (+)-germacreno D y una mezcla de 6 esteroides conocidos.

La determinación de la actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* permitió concluir que el fuscósido E y el fuscósido B, son fuertes agentes antiinflamatorios, pues redujeron significativamente el edema causado por el TPA en la oreja del ratón con porcentajes de inhibición superiores a los presentados por el fármaco de referencia, indometacina.

El estudio químico del octocoral *P. homomalla*, recolectado en la Isla de San Andrés, permitió aislar e identificar cinco prostaglandinas, a saber (15*R*)-PGA<sub>2</sub>, (15*R*)-PGA<sub>2</sub> Me, (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub>, (15*R*)-Ac PGA<sub>2</sub> Me y (15*R*)-PGE<sub>2</sub>, determinando de este modo que *P. homomalla* de esta parte del Caribe pertenece a la variedad *R*. En el proceso de interconversiones químicas de las prostaglandinas naturales se obtuvieron las prostaglandinas semisintéticas Me PGB<sub>2</sub> Me y 15-deoxi-Δ<sup>15</sup>-PGB<sub>2</sub>.

En este trabajo se reporta por primera vez la evaluación de la actividad antiinflamatoria de las prostaglandinas variedad *R*. Adicionalmente mediante el modelo de edema auricular inducido se logró identificar a (15*R*)-PGA<sub>2</sub> y (15*R*)-PGE<sub>2</sub> como compuestos con actividad antiinflamatoria comparable con la indometacina. Estas prostaglandinas variedad *R* no tienen actividad vasoconstrictora, por lo que la actividad observada corresponde a un verdadero efecto antiinflamatorio, siendo compuestos promisorios como agentes antiinflamatorios.

De este modo estos dos especímenes constituyen una fuente real e importante de metabolitos con actividad antiinflamatoria, por lo que se recomienda continuar el estudio de estos extractos

con miras a aislar más compuestos con posible actividad antiinflamatoria con aplicaciones en la industria farmacéutica o cosmética.

Adicionalmente se recomienda evaluar la acción de estos compuestos frente a diferentes mediadores proinflamatorios como iNOS, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , especies de oxígeno reactivas (EOR) y nitrógeno (ENR), además de su evaluación como inhibidores de actividad enzimática contra mieloperoxidasa, elastasa,  $\beta$ -glucuronidasa, lisozima, LOX y COX, con el objeto de realizar una aproximación al mecanismo de acción de los compuestos aquí aislados. Además, se recomienda continuar con estudios de estructura-actividad y toxicidad de los compuestos con el objeto de establecer su potencial uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Tambié se recomienda evaluar las prostaglandinas aisladas en este trabajo en diferentes ensayos como antivirales, antitumorales y contra la enfermedad de Alzheimer, dada la evidencia que muestra que compuestos con sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados podrían resultar activos en tales ensayos, esto con el objeto de ampliar el potencial de aplicación de estos compuestos abundantes.

Finalmente se recomienda explorar métodos alternativos para la obtención de estos compuestos de modo que se puedan obtener cantidades considerables para satisfacer la demanda que implican los diversos estudios de actividad biológica. En este sentido el uso de técnicas biotecnológicas para el cultivo de microorganismos es una opción interesante y por explorar para el caso de los fuscósidos, dada la evidencia que muestra que el fuscól es biosintetizado por microorganismos simbióticos. Para el caso de las prostaglandinas, la síntesis total resulta una metodología atractiva que ha sido realizada con éxito en la obtención de compuestos relacionados. Lo anterior además de tener en cuenta otras posibilidades como el cultivo celular o la acuicultura o marincultura usadas para el cultivo de organismos como esponjas y corales.

## Producción científica

- **Artículos**

Eduardo Reina, Carlos Puentes, Juan Rojas, Josué García, Freddy A. Ramos, Leonardo Castellanos, Marcela Aragón, Luis F. Ospina. "Fuscoside E: A strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21 (19), 5888 (2011).

Eduardo Reina, Freddy A. Ramos, Leonardo Castellanos, Marcela Aragón, Luis F. Ospina. Actividad Antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos aislados a partir de los octocorales *E. fusca* y *P. homomalla*. En preparación

- **Congresos**

Eduardo Reina, Carlos Puentes, Juan Rojas, Freddy Ramos, Leonardo Castellanos, Carmenza Duque. "Fuscósido E: Nuevo Diterpeno Aislado del Octocoral *Eunicea Fusca* del Caribe Colombiano". Ponente presentación oral en el XXIX Congreso Latinoamericano de Química –CLAQ 2010-. Cartagena de Indias. Octubre 2010.



## Bibliografía

- [1] Kindt, T.; Goldsby, H.; Osborne, G. *Kuby Immunology*. 2001. 5<sup>th</sup> ed. McGraw Hill. 338-359
- [2] Roitt, I.; Delves, P. *Essential Immunology*. 2001. 10<sup>th</sup> ed. Blackwell publishing. 249-254
- [3] Guyton, A.; Hall, J. *Fisiología y fisiopatología*. 1998. 6 ed. McGraw Hill. 281-287
- [4] Ohishi, S.; Hayashi, I.; Hayashi, M.; Yamaki, K.; Utsunomiya, I. Pharmacological demonstration of inflammatory mediators using experimental inflammatory models: rat pleurisy induced by carrageenin and phorbol myristate acetate. *Dermatologica*. 1989, 179, 68-71
- [5] Tincani, A.; Andreoli, L.; Bazzani, C.; Bosiso, D.; Sozzanib, S. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2007, 7, 1-7
- [6] Gautam, R.; Jachak, S. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.* 2009, 29, 767-820
- [7] Gonzales, M. A.; Lopera, W. D.; Arango, A. *Fundamentos de medicina, manual de terapéutica*. 2000. 9 ed. Corporación para investigaciones biológicas, 8-20
- [8] Berrué, F.; Kerr, R. G. Diterpenes from gorgonian corals. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 681-710; Rodriguez, A. The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals. *Tetrahedron*. 1995, 16, 4571-4618
- [9] Paul, V. J.; Arthur, K. E.; Ritson-Williams, R.; Ross, C.; Sharp, K. Chemical Defenses: From Compounds to Communities. *Biol. Bull.* 2007, 213, 226-251. Jiménez, J. C.; Marfil, M.; Francesch, A. M.; Cuevas, C. Alvarez, M.; Albericio, F. *Productos Naturales de Origen Marino. Investigación y Ciencia*. 2007. 75-83
- [10] Robbins, S.; Cotran, L.; Kumar, V. *Patología estructural y funcional*. 1998. 6 ed. McGraw Hill. 275-296
- [11] Stites, D.; Terr, A.; Parslow, T. *Inmunología básica y clínica*. 1999. 9 ed. Manual Moderno. 209-224
- [12] Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leuk. Bio.* 2005, 77, 598-625
- [13] Zamora, R.; Vodovotz, Y.; Billiar, T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med.* 2000, 6, 347-73
- [14] Grisham, M. B.; Jourdain, D.; Wink, A. Nitric Oxide I: Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 1999, 276, G315-G321
- [15] Pazos, A.; Florez, J. *Farmacología Humana. Sección III. Mediadores Celulares, Inflamación e Inmunidad*. 1997. 3 ed. Editorial Masson. S.A.
- [16] Witko, V.; Rieu, P.; Descamps, B.; Lesavre, P.; Halbwachs, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 2000, 80, 617-653
- [17] Morley, J. Inflammation and asthma therapy: a false dawn. *Pulm Pharmacol Ther.* 2006, 19, 200-204

- [18] Smith, R. J. Therapies for rheumatoid arthritis: hope springs eternal. *Drug. Discov. Today*. 2005, 10, 1598-1606
- [19] Mantovani, A.; Pierotti, M. A. Cancer and inflammation: A complex relationship. *Cancer lett.* 2008, 267, 180-181
- [20] Tincani, A.; Andreoli, L.; Bazzani, C.; Bosiso, D.; Sozzani, S. Inflammatory molecules: a target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2007, 7, 1-7
- [21] Schmitz, M. L.; Bacher, S. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. *Phytochemistry Rev.* 2005, 4, 19-25
- [22] Strand, V.; Kimberly, R.; Isaacs, J. D. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future direction. *Nature Ver. Drug. Discov.* 2007, 6, 75-92
- [23] Schimmer, B. P.; Parker, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. The pharmacological basis of therapeutics. 2001. 10 ed. 1649-1673
- [24] Palomo, I.; Torres, C.; Moore-Carrasco, R.; Alarcón, M.; Maragaño, P. Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. *Vitae*. 2009, 16, 133-143
- [25] CYTED. 1995. Programa Iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-1: Búsqueda de principios bioactivos en plantas de la región.
- [26] Frode, T. S.; Medeiros, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm.* 2001, 10, 223-227
- [27] Van der Vliet, A.; Eiserich, J. P.; Cross, C. E. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease?. *Respir. Res.* 2000, 1, 67-72
- [28] Mayer, A.; Rodríguez, R.; Berlinck, R.; Hamann, M. Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and anti-viral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Phys C.* 2007, 145, 553-58
- [29] Lucas, R.; Giannini, C.; D'auria, M.; Payá, M. Modulatory Effect of Bolinaquinone, a Marine Sesquiterpenoid, on Acute and Chronic Inflammatory Processes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002, 3, 304-310
- [30] Posadas, I.; Terencio, M. C.; De Rosa, S.; Payá, M. Cavernolide: a new inhibitor of human sPLA2 sharing unusual chemical features. *Life Sci.* 2000, 67, 3007-3014
- [31] Posadas, I.; De Rosa, S.; Terencio, M. C.; Payá, M.; Alcaraz, Br. Cacospongionolide B suppresses the expression of inflammatory enzymes and tumour necrosis factor- $\alpha$  by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J. Pharmacol.* 2003, 138, 1571-1579
- [32] Lucas, R.; Casapullo, A.; Casapullo, L.; Gomez-Paloma, L.; Payá, M. Cycloamphilectenes, a new type of potent marine diterpenes: inhibition of nitric oxide production in murine macrophages *Life Sci.* 2003, 72, 2543-2552
- [33] Hong, S.; Kim, S. H.; Rhee, M. H.; Kim, A. R.; Jung, J. H.; Chun, T.; Yoo, E. S.; Cho, J. Y. *In vitro* anti-inflammatory and pro-aggregative effects of a lipid compound, petrocortyne A, from marine sponges. *Naunyn-Schmiede-berg's Arch. Pharmacol.* 2003, 368, 448-456
- [34] Napolitano, A.; Bruno, I.; Rovero, P.; Lucas, R.; Payá, M.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R. Synthesis, structural aspects and bioactivity of the marine cyclopeptide hymenamide C. *Tetrahedron.* 2001, 57, 6249-6255
- [35] Ortiz, A. R.; Pisabarro, M. T.; Gago, F. Molecular model of the interaction of bee venom phospholipase A<sub>2</sub> with manoalide. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 1866-1879

- [36] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11, 1693-1713
- [37] De Rosa, M.; Giordano, S.; Scettri, A.; Sodano, G.; Soriente, A.; Pastor, P. G.; Alcaraz, M. J.; Payá, M. Synthesis and comparison of the antiinflammatory activity of manoalide and cacospongionolide B analogues. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 3232-3238
- [38] D'Acquisto, F.; Lanzotti, V.; Carnuccio, R. Cyclolinteinone, a sesterterpene from sponge *Cacospongia linteiformis*, prevents inducible nitric oxide synthase and inducible cyclo-oxygenase protein expression by blocking nuclear factor- $\kappa$ B activation in J774 macrophages. *Biochem. J.* 2000, 346, 793-798
- [39] Giannini, C.; Debitus, C.; Lucas, R.; Ubeda, A.; Payá, M.; Hooper, J. N.; D'Auria, M. V. New Sesquiterpene derivatives from the Sponge *Dysidea* Species with a Selective Inhibitor Profile against Human Phospholipase A<sub>2</sub> and Other Leukocyte Functions. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 612-615
- [40] Hussein, G.; Sankawa, U.; Gato, H.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 443-449
- [41] Ohgami, K.; Shiratori, K.; Kotake, S.; Nishida, T.; Mizuki, N.; Yazawa, K.; Ohno, S. Effects of Astaxanthin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. *Invest. Ophthalmol. Visual Sc.* 2003, 44, 2694-2701
- [42] Stevenson, C. S.; Capper, E. A.; Roshak, A. K.; Marquez, B.; Grace, K.; Gerwick, W. H.; Jacobs, R. S.; Marshall L. A. Scytonemin a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflamm. Res.* 2002, 51, 112-114
- [43] Pearce, A.; Chia, E.; Berridge, M.; Clark, G.; Harper, J.; Larsen, L.; Maas, E.; Page, M.; Perry, N.; Webb, V.; Copp, B. Anti-inflammatory Thiazine Alkaloids Isolated from the New Zealand Ascidian *Aplidium* sp.: Inhibitors of the Neutrophil Respiratory Burst in a Model of Gouty Arthritis. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 936-940
- [44] Fujita, M.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Nishikawa, T.; Fusetani, N. Sodium 1-(12-hydroxy) octadecanyl sulfate, an MMP-2 inhibitor, isolated from tunicate of the family polyclinidae. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1936-1938
- [45] Shen, Y.; Cheng, S.; Kuo, Y.; Hwang, T.; Chiang, M.; Khalil, A. Chemical transformation and biological activities of ambrein, a major product of ambergris from *Physeter macrocephalus* (SpermWhale). *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 147-153
- [46] Correa, H.; Valenzuela, A.; Ospina, L. F.; Duque, C. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J. Inflamm.* 2009, 10, 1-10
- [47] Kijjoo, A., Sawangwong, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Mar. Drugs.* 2004, 2, 73-81
- [48] Gross, H.; König, G. M. Terpenoids from marine organisms: unique structures and their pharmacological potential. *Phytochemistry Rev.* 2006, 5, 115-141
- [49] Shin, J.; Fenical, W. Fuscoides A-D: anti-inflammatory diterpenoid glycosides of new structural classes from the caribbean gorgonian *Eunicea fusca*. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 3153-3158
- [50] Jacobs, S.; Jacobson, P. Fuscoides: an anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. Part I: Physiological and biochemical studies in murine inflammatory models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992, 262, 866-873
- [51] Jacobs, S.; Jacobson, P. Fuscoides: An Anti-Inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-Lipoxygenase. Part II: Biochemical studies in the human neutrophil. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1992, 262, 874-882

- [52] Cobar, O. M.; Rodríguez, A. D.; Padilla, O. L.; Sánchez, J. A. The calyculaglycosides: dilophol-type diterpene glycosides exhibiting antiinflammatory activity from the caribbean gorgonian *Eunicea* sp. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 7183-7188.
- [53] Bayer, F. M. The shallow-water octocorallia of the west Indian region; Martinus Nijhoff: The Hague, 1961
- [54] Sánchez, J. A.; Zea, S. E.; Díaz, J. M. Gorgonian communities in two contrasting environments in oceanic atolls of the southwestern Caribbean. *Bull. Mar. Sci.* 1997, 61, 453-465
- [55] Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. Cembranoids diterpens from the Caribbean sea whip *Eunicea Knighti*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 1595-1602. Cuadrado, T.; Castellanos, L.; Osorno, O.; Ramos, F.; Duque. Estudio químico y evaluación de la actividad antifouling del octocoral caribeño *Eunicea laciniata*. *Quím. Nova.* 2010, 33, 656-661.
- [56] Coffroth, M. A.; Santos, S. R. Genetic Diversity of Symbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium*. *Protist.* 2005, 156, 19-34. Santos, S.R.; Shearer, T. L.; Hannes, A. R.; Coffroth, M. A. Fine-scale diversity and specificity in the most prevalent lineage of symbiotic dinoflagellates (*symbiodinium*, *dinophyceae*) of the caribbean. *Mol Ecol.* 2004, 13, 459-46.
- [57] Stat, M.; Morris, E.; Gates, R. D. Functional diversity in coral-dinoflagellate symbiosis. *PNAS.* 2008, 105, 9256-9261. Frade, P. R.; De Jongh, F.; Vermeulen, F.; Van Bleijswijk, J.; Bak, P. M. Variation in symbiont distribution between closely related coral species over large depth ranges. *Mol Ecol* 2007, 17, 691-703. Rosenberg, E.; Koren, O.; Reshef, L.; Efrony, R.; Zilber-Rosenberg, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007, 5, 355-362.
- [58] Ranzer, L. K.; Brück, T. B.; Brück, W. M.; Lopez, J. V.; Kerr, R. G. A New Prokaryotic Farnesyldiphosphate Synthase from the Octocoral *Eunicea Fusca*: Differential Display, Inverse PCR, Cloning, and Characterization. *Mar. Biotechnol.* 2009, 11, 62-73. Newberger, N. C.; Ranzer, L. K.; Boehnlein, J. M.; Kerr, R. G. Induction of terpene biosynthesis in dinoflagellate symbionts of Caribbean gorgonians. *Phytochemistry.* 2006, 67, 2133-2139
- [59] Duque, C.; Puyana, M.; Castellanos, L.; Arias, A.; Correa, H.; Osorno, O.; Asai, T.; Hara, N.; Fujimoto, Y. Further studies on the constituents of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andres and Providencia islands, Colombian Caribbean: Isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiaene. *Tetrahedron.* 2006, 62, 4205-4213
- [60] Weinheimer, A. J.; Spraggins, R. L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA<sub>2</sub> and its acetate methyl ester) in the Gorgonian *Plexaura homomalla*. *Chemistry of Coelenterates. XV. Tetrahedron Lett.* 1969, 59, 5185-8
- [61] Schneider, W. P.; Bundy, G. L.; Lincoln, F. H.; Daniels, E. G.; Pike, J. E. Isolation and chemical conversions of prostaglandins from *Plexaura homomalla*: preparation of prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostaglandin F<sub>2α</sub>, and their 5,6-trans isomers. *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 99, 1222-1232
- [62] Agalias, A.; Mihopoulos, N.; Tsoukatou, M.; Marinos, L.; Vagias, C.; Harvala, C.; Roussi, V. New Prostaglandins from the Chemically Defended Soft Coral *Plexaura nina*. *Z. Naturforsch.* 2000, 55c, 425-430. Gerhart, D. J. Prostaglandin A<sub>2</sub>: an agent of chemical defense in the Caribbean gorgonian *Plexaura homomalla*. 1984, 19, 181-187. Coll, J. C. The Chemistry and Chemical Ecology of Octocorals (*Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia*). *Chem. Rev.* 1992, 92, 613-631
- [63] Dow, W. C.; Gebreyesus, T.; Popov, S.; Carlson, R. M. K.; Djerassi, C. Marine 4-methyl sterols: Synthesis of C-24 epimers of 4α,24-dimethyl-5α-cholestan-3β-ol and 360 MHz <sup>1</sup>H-NMR comparisons to the natural product from *Plexaura homomalla*. *Steroids.* 1983, 42, 217-230
- [64] Ravi, B. N.; Wells, R. J. Lipid and terpenoid metabolites of the gorgonian *Plexaura flava*. *Aust. J. Chem.* 1982, 35, 105-112



- [65] Grajales, A.; Aguilar, C.; Sánchez, J. A. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. *BMC Evol. Biol.* 2007, 11, 7-90
- [66] De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. J.; Young, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989, 26, 335-341
- [67] Gopichand Y.; Schmitz, F. J. Fuscol, a new elemene-type diterpeno alcohol from the gorgonian *Eunicea fusca*. *Tetrahedron lett.* 1978, 39, 3641-3644
- [69] "Nomenclature of Carbohydrates (Recommendations 1996)", *Pure Appl. Chem.* 1996, 68, 1919
- [70] Ando, M.; Arai, K.; Kikushi, K.; Isogai, K. Synthetic studies of sesquiterpenes with a cis fused decalin system, 4. Synthesis of (+)-5 $\beta$ H-eudesma-3,11-diene, (-)-5 $\beta$ H-eudesmane-4 $\beta$ ,11-diol and (+)-5 $\beta$ H-eudesmane-4 $\alpha$ ,11-diol and structure revision of a natural eudesmane-4,11-diol isolated from *Pluchea arguta*" *J. Nat. Prod.* 1994, 57, 1189-199
- [71] Mahato, S. B.; Kundu, A. P. <sup>13</sup>C-NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. *Phytochemistry.* 1994, 37, 1517-1575
- [72] Gutiérrez, M.; Capson, T. L.; Guzmán, H. M.; González, J.; Ortega-Barría, E.; Quiñoa, E.; Riguera, R. Antiplasmodial Metabolites Isolated from the Marine Octocoral *Muricea austera* *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1379
- [73] Reina, E.; Puentes, C.; Rojas, J.; Garcia, J.; Ramos, F.; Castellanos, L.; Duque, C. Evaluación de la actividad antifouling y estudio químico del extracto del octocoral *Eunicea* sp. del Caribe Colombiano. Licenciatura en Química, Universidad Distrital "Francisco José de Caldas". Trabajo de Grado, 2008.
- [74] Joulain, D.; König, W. A. "The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons." 1998. E. B. Verlag, Hamburg.
- [75] Castellanos, L.; Zea, S.; Osorno, O.; Duque, C. Phylogenetic analysis of the order Halichondrida (Porifera, Demospongiae), using 3 $\beta$ -hydroxysterols as chemical characters. *Biochem. Syst. Ecol.* 2003, 31, 1163-1183
- [76] Rodríguez, A. D.; Li, Y.; Dhasmana, H.; Barnes, C. L. New Marine Cembrane Diterpenoids Isolated from the Caribbean Gorgonian *Eunicea mammosa*. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 1101-1113
- [77] Scow, D. T.; Luttermorser, G. K.; Dickerson, K. S. Leukotriene Inhibitors in the Treatment of Allergy and Asthma. *Am Fam Physician.* 2007, 75, 65-70. Drazen, J. M.; Israel, E.; O'Byrne, P. M.; Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 197-206
- [78] Bayer, F. M. Studies on the anatomy and histology of *Plexaura homomalla* in florida In: Prostaglandins from *Plexaura homomalla*: Ecology Utilization and Conservations of a Major Medical Marine Resource A Symposium Bayer, F. M. y A. J. Weinheimer (Eds.). University of Miami Press. Florida 1974, 62-100
- [79] Weinheimer, A. J. In: Prostaglandins from *Plexaura homomalla*: Ecology, Utilization and Conservation of a Major Medical Marine Resource, A Symposium Bayer, F. M. y A. J. Weinheimer (Eds.). University of Miami Press. Florida 1974.
- [80] Daly, M.; Brugler M. R.; Cartwright P.; Collins A. G.; Dawson M. N.; Fautin D. G.; France S. C.; Mcfadden C. S.; Opresko D. M.; Rodriguez E.; Romano S. L.; Stake J. L. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus *Zootaxa* 2007, 1668, 127-182

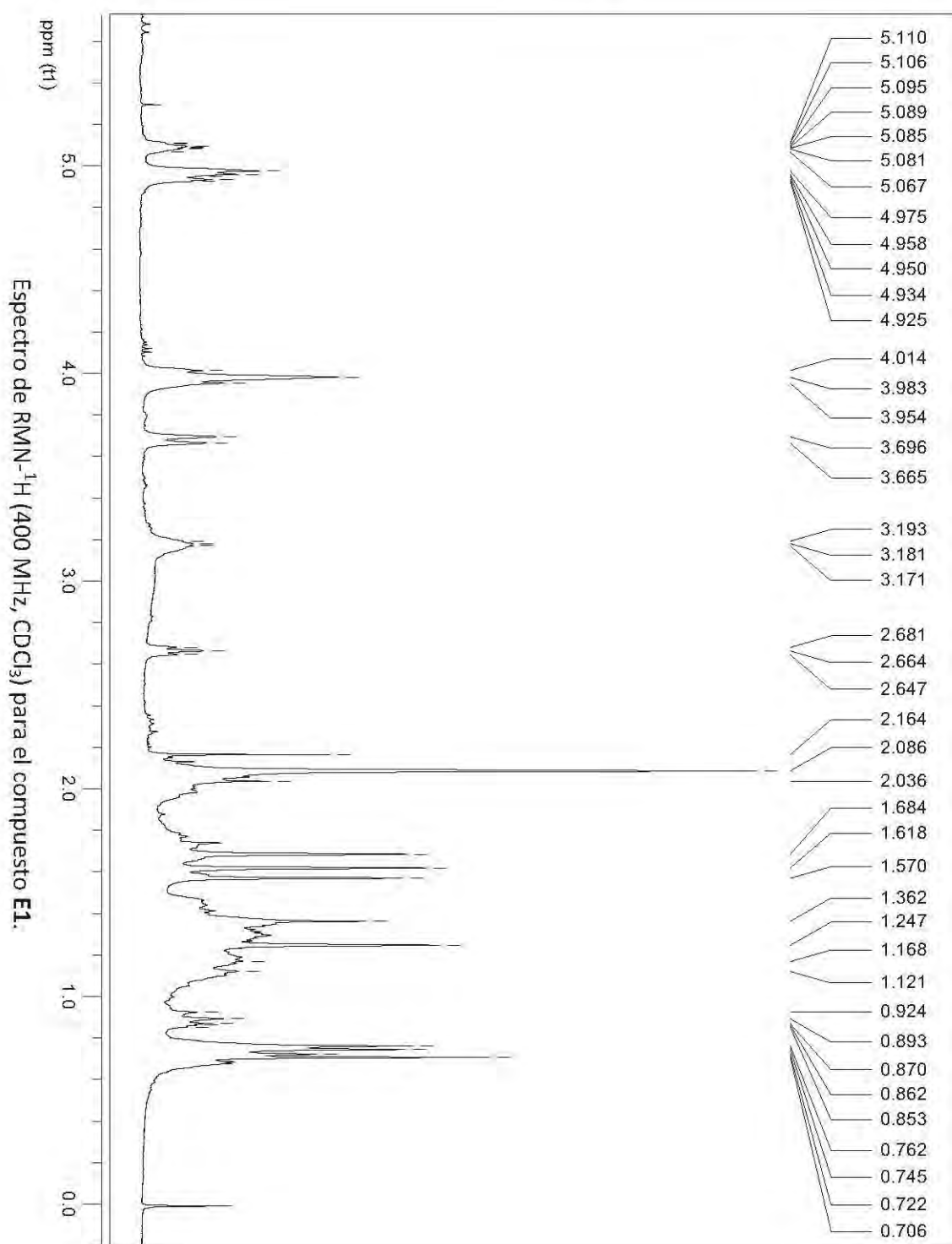
- [81] Valmsen, K.; Boeglin, W. E.; Jarving, I.; Schneider, C.; Varvas, K.; Brash, A. R.; Samel, N. Structural and functional comparison of 15S- and 15R- specific cyclooxygenases from the coral *Plexaura homomalla*. *Eur. J. Biochem.* 2004, 271, 3533-3538
- [82] Schneider, W. P.; Hamilton, R. D.; Rhuland, L. E. Occurrence of Esters of (15S)-Prostaglandin A<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> in Coral. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94, 2122-2123
- [83] Schneider, C.; Manier, M. L.; Hachey, D. L.; Brash, A. L. Detection of the 15-Acetate of Prostaglandin E<sub>2</sub> Methyl Ester as a Prominent Component of the Prostaglandins in the Gorgonian Coral *Plexaura homomalla*. *Lipids.* 2002, 37, 217-221
- [84] Light, R. J.; Samuelsson, B. Identification of Prostaglandins in the Gorgonian, *Plexaura homomalla*. *Eur. J. Biochem.* 1972, 28, 232-240
- [85] Bundy, G. L.; Daniels, E. G.; Lincoln, F. H.; Pike, J. E. Isolation of a New Naturally Occurring Prostaglandin, 5-*trans*-PGA<sub>2</sub>. Synthesis of 5-*trans*-PGE<sub>2</sub> and 5-*trans*-PGF<sub>2</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94, 2124
- [86] Schneider, W.P.; Morge, R. A.; Henson, B. E. The Occurrence of 13, 14-Dihydro and 13, 14-*cis*-Unsaturated Prostaglandins in the Coral *Plexaura homomalla*. Synthesis of 13, 14-*cis*-Prostaglandin E<sub>2</sub>, 15-Acetate Methyl Ester, and the 13, 14-*cis* Analogues of Prostaglandin F<sub>2α</sub> and Prostaglandin F<sub>2β</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 6062-6066
- [87] a) Groweiss, A.; Fenical, W. PGF<sub>2α</sub> 9-O-Acetate methyl ester, a minor naturally occurring prostaglandin from the gorgonian Coral *Plexaura homomalla*. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 222-223. b) Sih, J. C.; Graber, D. R. Synthesis of (5E)- and (5Z)-11-deoxy-6,11.alpha-epoxy-Δ-5-prostaglandin F<sub>1</sub> alpha sodium salts: 6,11 alpha-enol ether isomers of prostacyclin. *J. Org. Chem.* 1982, 47, 4919-4927. c) Carmely, S.; Kashman, Y.; Loya, Y.; Benayahu, Y. New Prostaglandin (PGF) Derivatives from the Soft Coral *Lobophyton Depressum*. *Tetrahedron Lett.* 1980, 21, 875-878
- [88] a) Baertschi, S. W.; Brash, A. R.; Harris, T. M. Formation of a Cyclopropyl Eicosanoid via an Allene Oxide in the Coral *Plexaura homomalla*: Implications for the Biosynthesis of 5,6-*trans*-Prostaglandin A<sub>2</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 5003-5005. b) Brash, A. R. Formation of an Allene Oxide from (8R)-8-Hydroperoxyeicosatetraenoic Acid in the coral *Plexaura homomalla*. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 1891-1892
- [89] Marks, F.; Furstenberger (Eds.). Prostaglandins, Leukotrienes and Other Eicosanoids, From Biogenesis to Clinical Application. Ed. Wiley-VCH. 1999.
- [90] Miller, S. B. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. *Semin. Arthritis Rheu.* 2006, 36, 37-49
- [91] Dewick, P. M. Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach. 2002. 2<sup>th</sup> Edition. John Wiley & Sons, Ltda.
- [92] Floyd, M. B.; Schaub, R. E.; Siuta, G. J.; Skotnicki, J. S.; Grudzinskas, C. V.; Weiss, M. J. Prostaglandins and Congeners. 22. Synthesis of 11-Substituted derivatives of 11-Deoxyprostaglandins E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>. Potential Bronchodilators. *J. Med. Chem.* 1980, 23, 903-913
- [93] Serkov, I. V.; Bezuglov, V. V. Prostaglandin Fluorides in Synthesis of Natural Prostaglandin Derivatives at Carboxyl Group. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009, 35, 111-117. Muchowski, J. M.; Velarde, E. V. 9-Fluoroprostadienoic acid derivatives. U.S. (1976), 21 pp. CODEN:USXXAM US 3997587 19761214 Patent in English. Application: US 75-590661 19750626. Priority: CAN 87:38997 AN 1977:438997
- [94] Mullally, J. E.; Moos, P. J.; Edes, K.; Fitzpatrick, F. A. Cyclopentenone Prostaglandins of the J Series Inhibit the Ubiquitin Isopeptidase Activity of the Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 30366-30373

- [95] Ratnayake, A. S.; Bugni, T. S.; Veltri, C. A.; Skalicky, J. J.; Ireland, C. M. Chemical Transformation of Prostaglandin-A<sub>2</sub>: A Novel Series of C-10 Halogenated, C-12 Hydroxylated Prostaglandin-A<sub>2</sub> Analogues. *Org Lett.* 2006, 2171-2174
- [96] Bundy, G. L.; Peterson, D. C.; Cornette, J. C.; Miller, W. L.; Spilman, C. H.; Wilks, J. W. Synthesis and Biological Activity of Prostaglandin Lactones. *J. Med. Chem.* 1983, 26, 1089-1103
- [97] Dang, H. T.; Lee, H. J.; Yoo, E. S.; Shinde, P. B.; Lee, Y. M.; Hong, J.; Kim, D. K.; Jung, J. H. Anti-inflammatory Constituents of the Red Alga *Gracilaria verrucosa* and Their Synthetic Analogues. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 232-240
- [98] Dang, H. T.; Lee, H. J.; Yoo, E. S.; Hong, J.; Choi, J. S.; Jung, J. H. The Occurrence of 15-keto-Prostaglandins in the Red Alga *Gracilaria verrucosa*. *Arch Pharm Res.* 2010, 33, 1325-1329
- [99] Rossi, A.; Kapahi, P.; Natoli, G.; Takahashi, T.; Chen, Y.; Karin, M.; Santoro, M.G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. *Nature.* 2000, 403, 103-108
- [100] Kapoor, M.; Kojima, F.; Yang, L.; Crofford, L. J. Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators activated receptor-gamma during normal wound healing: A time course study. *Prostag. Leukotr. Ess.* 2007, 76, 103-112
- [101] Straus, D. S.; Glass, C. K. Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 2001, 21, 185-210
- [102] Scher, J. U.; Pillinger, M. H. 15d-PGJ<sub>2</sub>: The anti-inflammatory prostaglandin?. *Clin. Immunol.* 2005, 114, 100-109
- [103] Ianaro, A.; Ialenti, A.; Maffia, P.; Di Meglio, P.; Di Rosa, M. Santoro, G. Anti-Inflammatory Activity of 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> and 2-Cyclopenten-1-one: Role of the Heat Shock Response. *Mol Pharmacol.* 2003, 64, 85-93. Rossi, A.; Elia, G.; Santoro, M. G. Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B by prostaglandin A<sub>1</sub>: An effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 746-750
- [104] Ricote, M.; Li, A. C.; Willson, T. M.; Kelly, C. J.; Glass, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998, 391, 79-82
- [105] Azuma, Y.; Shinohara, M.; Wang, P. L.; Ohura, K. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 283, 344-346
- [106] Chinetti, G.; Griglio, S.; Antonucci, M.; Torra, I.P.; Delerive, P.; Majd, Z.; Fruchart, J.C.; Chapman, J.; Najib, J.; Staels, B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 25573-25580
- [107] Gilroy, D. W.; Colville-Nash, P. R.; McMaster, S.; Sawatzky, D. A.; Willoughby, D. A.; Lawrence, T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB.* 2003, 17, 2269-2271
- [108] a) Storer, P. D.; Xu, J.; Chavis, J. A.; Drew, P. D. Cyclopentenone Prostaglandins PGA<sub>2</sub> and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> Suppress Activation of Murine Microglia and Astrocytes: Implications for Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroscience Research.* 2005, 80, 66-74. b) Petrova, T. V.; Akama, K. T.; Van Eldik, L. J. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, 96, 4668-4673

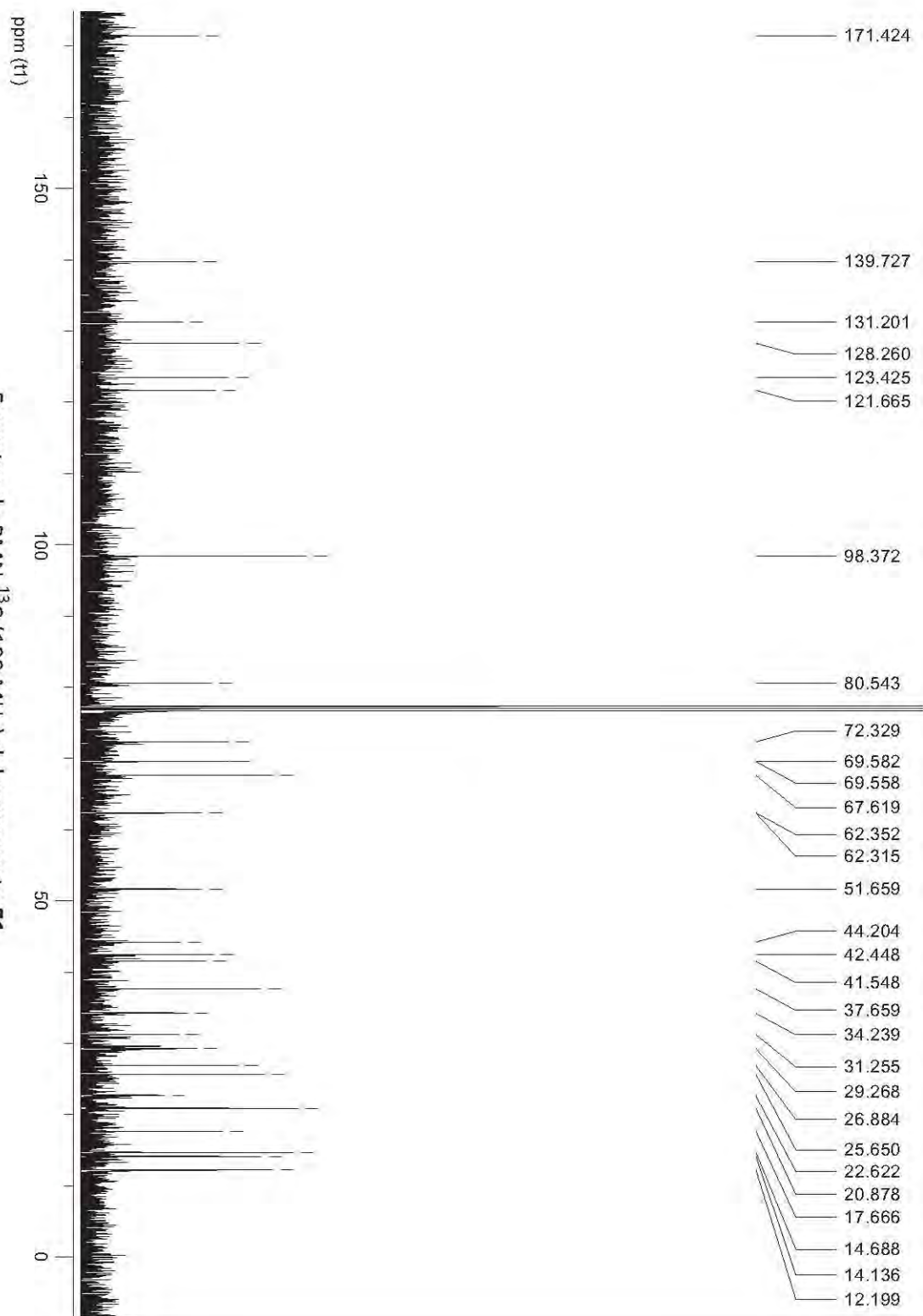
- [109] Gayarre, J.; Stamatakis, K.; Renedo, M.; Pérez-Sala, D. Differential selectivity of protein modification by the cyclopentenone prostaglandins  $PGA_1$  and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - $PGJ_2$ : Role of glutathione. *FEBS Lett.* 2005, 579, 5803-5808
- [110] a) Zanoni, G.; Porta, A.; DeToma, Q.; Castronovo, F.; Vidari, G. First Enantioselective Total Synthesis of (8*S*, 12*R*, 15*S*)-Prostaglandin  $J_2$ . *J. Org. Chem.* 2003, 68, 6437-6439. b) Cooper, G. F.; Fried, J. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Prostaglandins and Some Prostaglandin Analogs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1973, 70, 1579-1584
- [111] Su, B. N.; Takaishi, Y. Morinins H-K, Four Novel Phenyl propanol Ester Lipid Metabolites from *Morina chinensis*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1325-1327
- [112] Dang, H. T.; Lee, H. J.; Yoo, E.S.; Hong, J.; Bao, B.; Choi, J.S.; Jung, J. H. New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents. *Bioorgan. Med. Chem.* 2008, 16, 10228-10235
- [113] Panosyan, A. G. Methods of analyzing prostaglandins. *Chem. Nat. Compd.* 1979, 14, 666-673
- [114] Crabbé, P. Application of Physical Methods to Some Structural and Stereochemical Problems in the Prostaglandin Field. *Tetrahedron.* 1985, 30, 1979-1985
- [115] Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. The Assignment of Absolute Configuration by NMR. *Chem. Rev.* 2004, 104, 17-117
- [116] Daniels, E. G.; Krueger, W. C.; Kupiecki, F. P.; Pike, J. E.; Schneider, W. P. Isolation and characterization of a new prostaglandin isomer. *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 5894-5895
- [117] March, J.; Smith, M. B. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. 2007. 5<sup>th</sup> ed. Wiley. 1107-1115
- [118] Franco, L. A. Estudio de la Actividad Antiinflamatoria de los Principios Activos de los Calices De *Physalis Peruviana*. Universidad Nacional de Colombia. Tesis Doctoral en Ciencias-Farmacéuticas. 2006
- [119] Miller, S. B. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin. Arthritis Rheum.* 2006, 36, 37-49

## **ANEXOS**

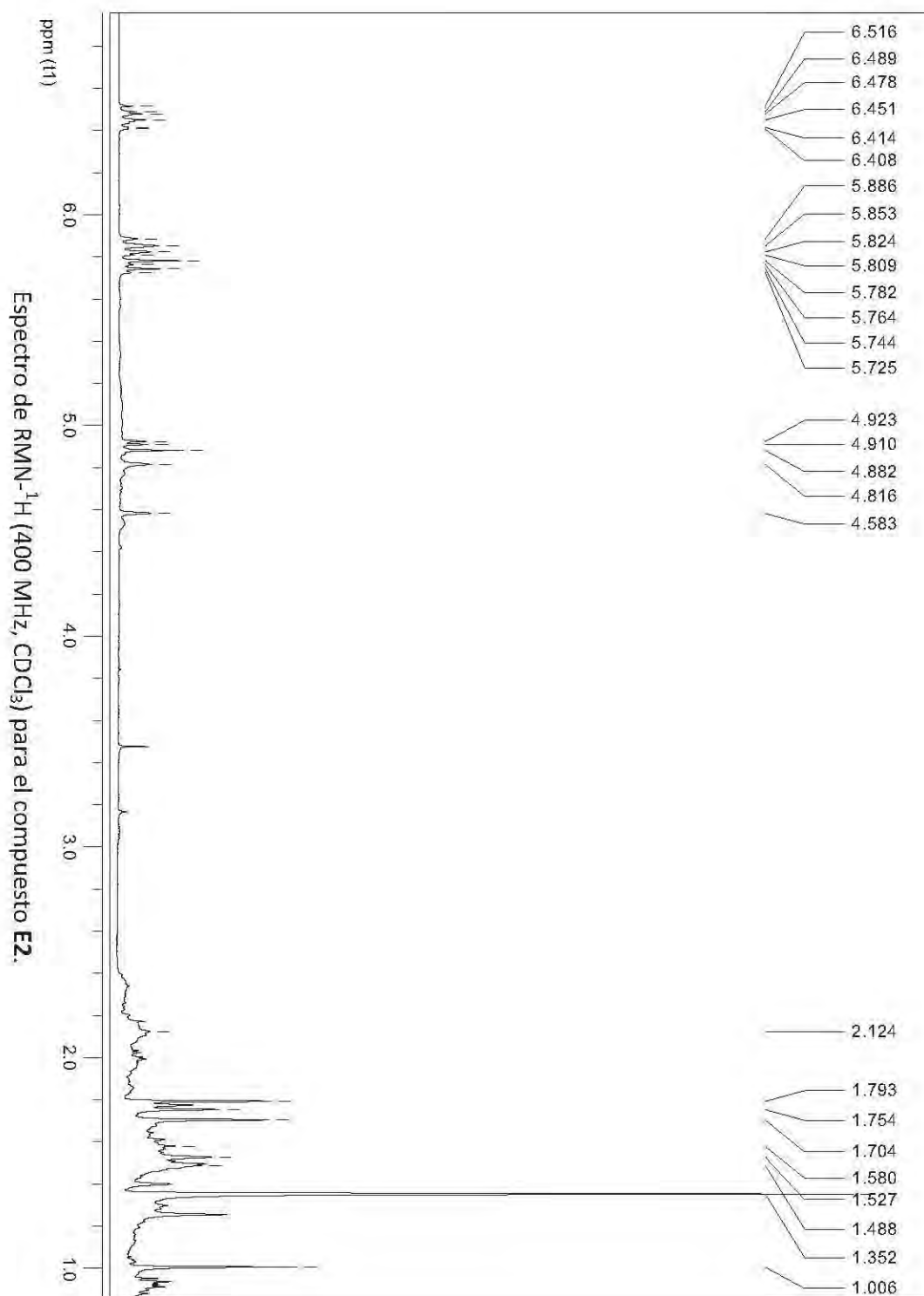
# ANEXO A



Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) del compuesto E1.

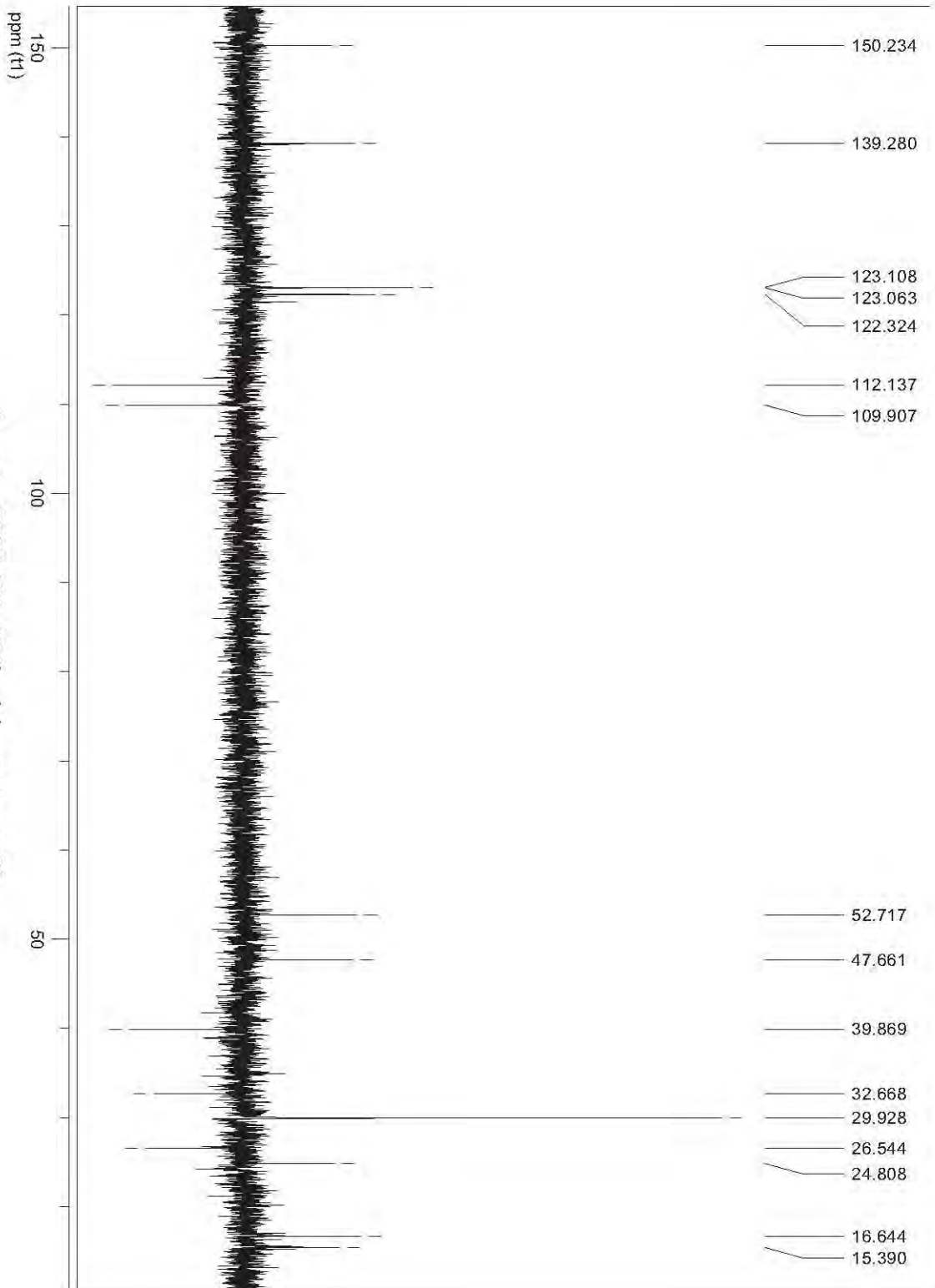


# ANEXO B

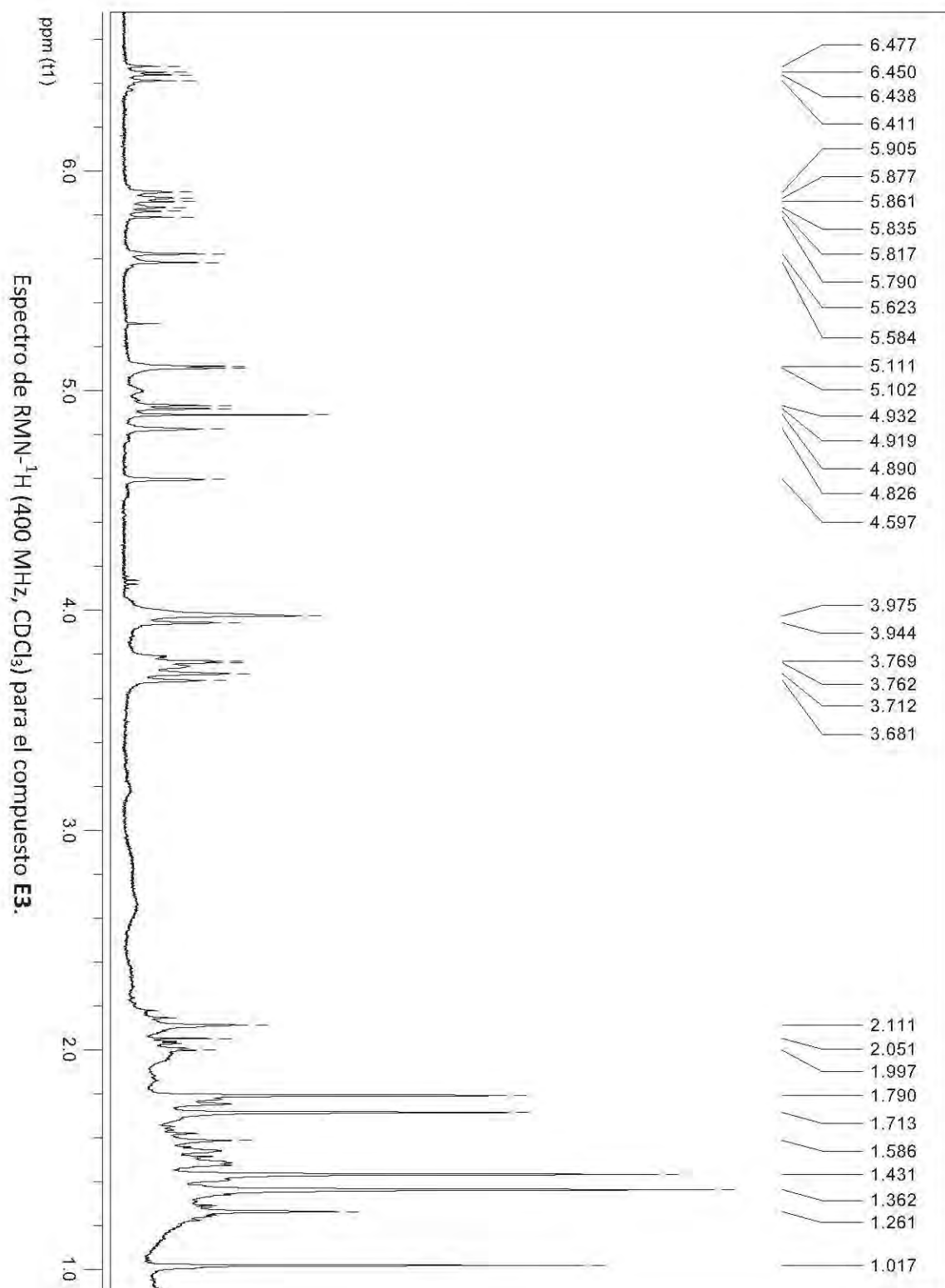




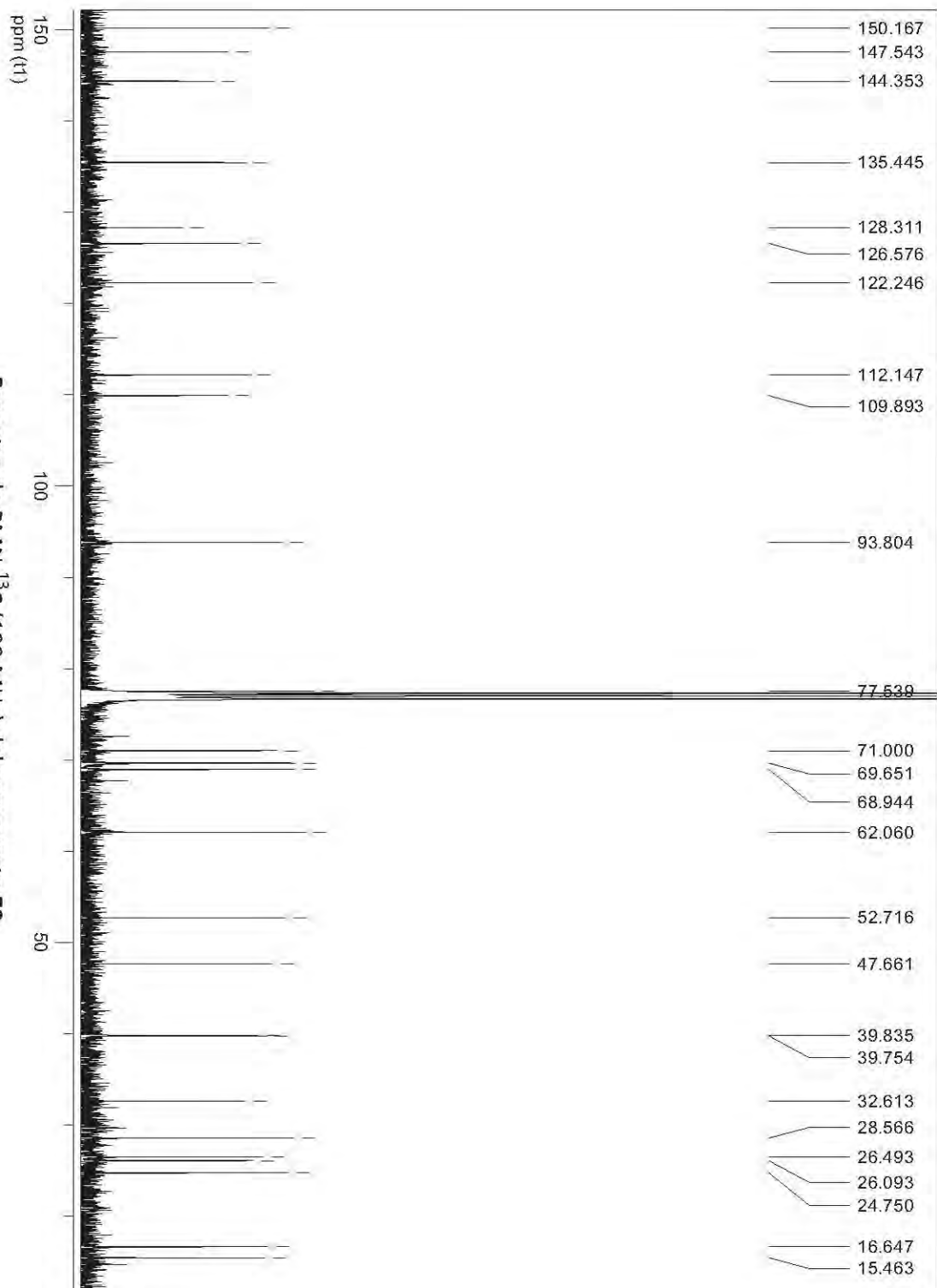
Espectro DEPT-135, CDCl<sub>3</sub>, del compuesto E2.



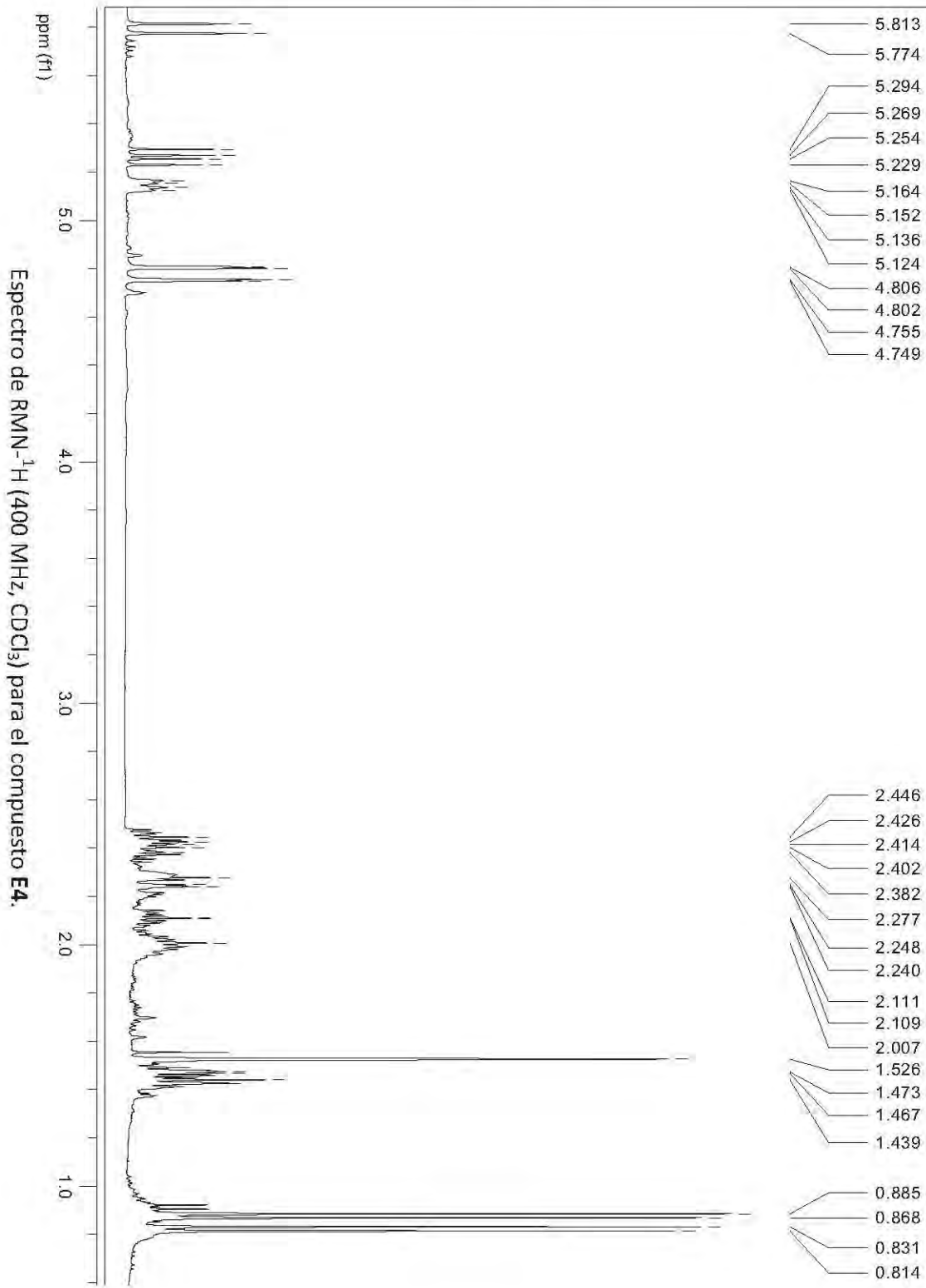
# ANEXO C

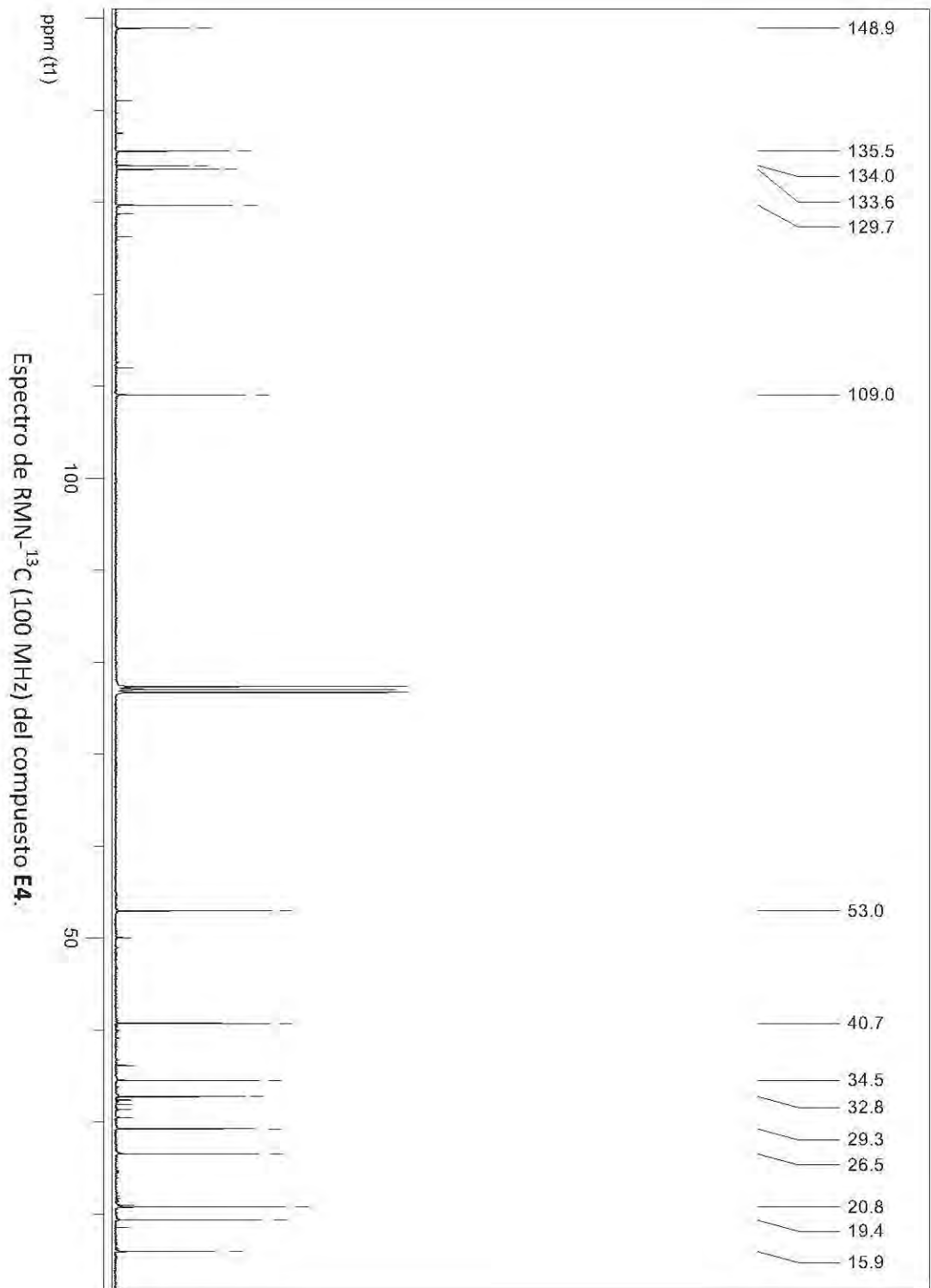


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) del compuesto **E3**.

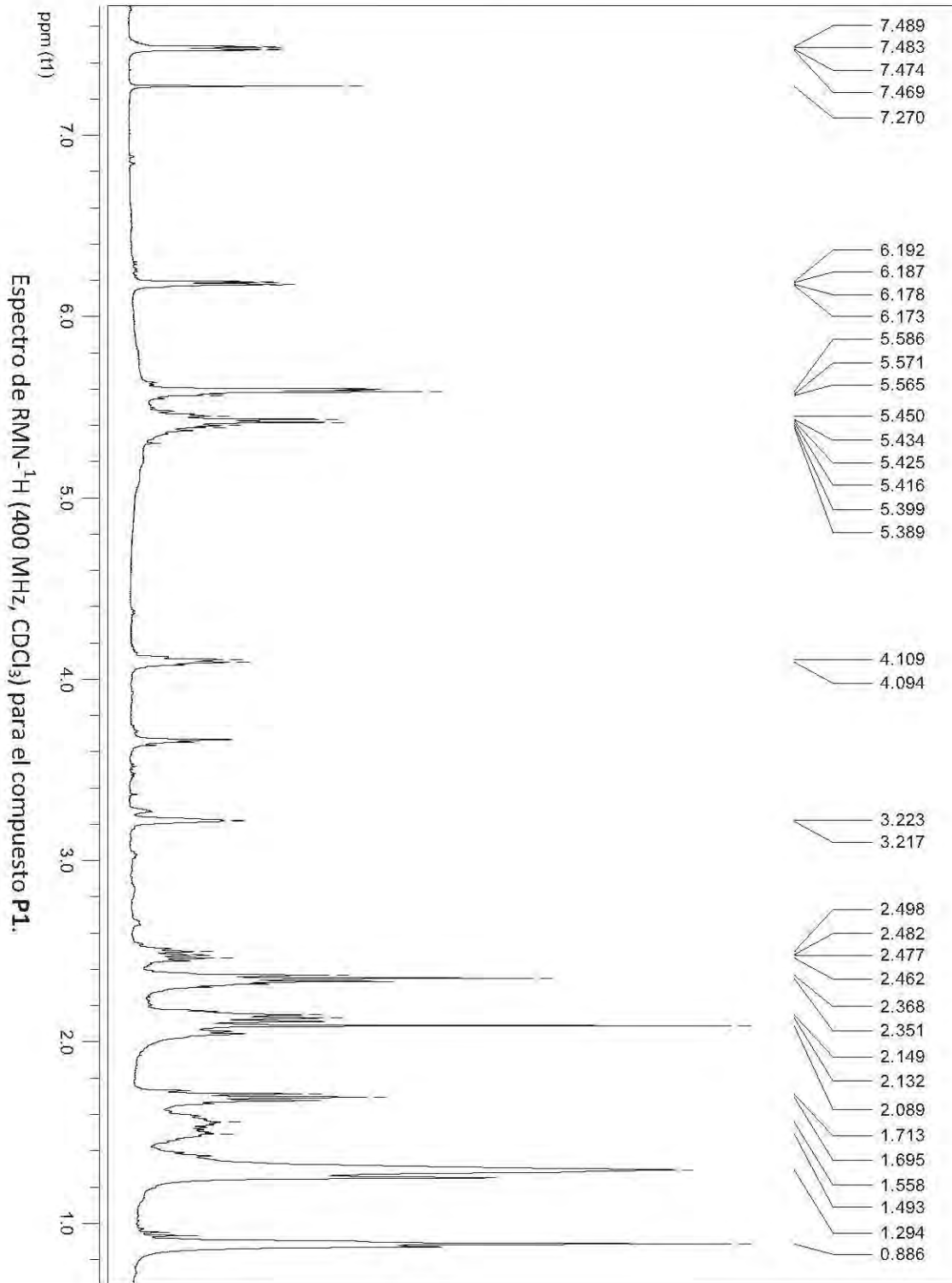


# ANEXO D

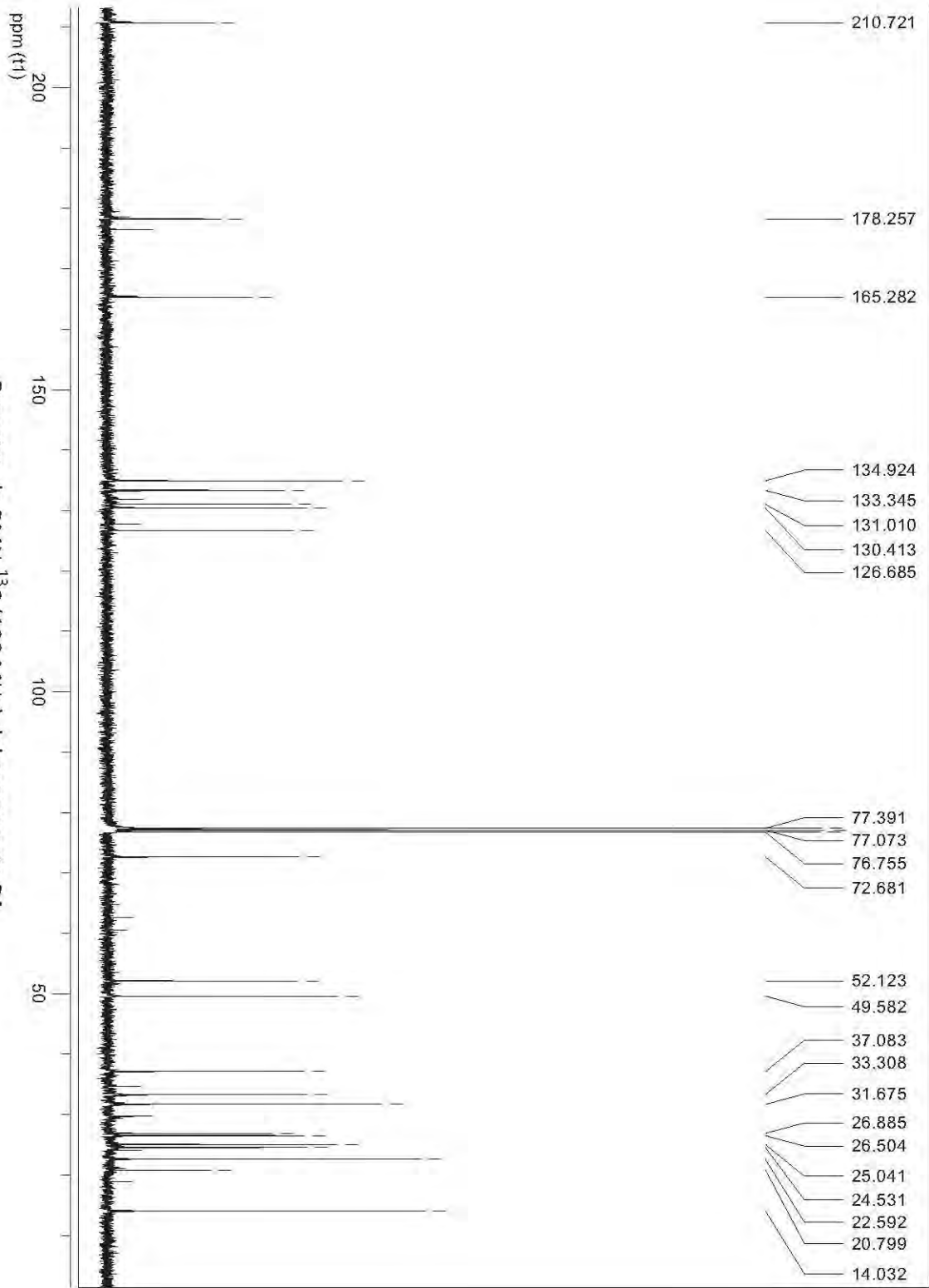




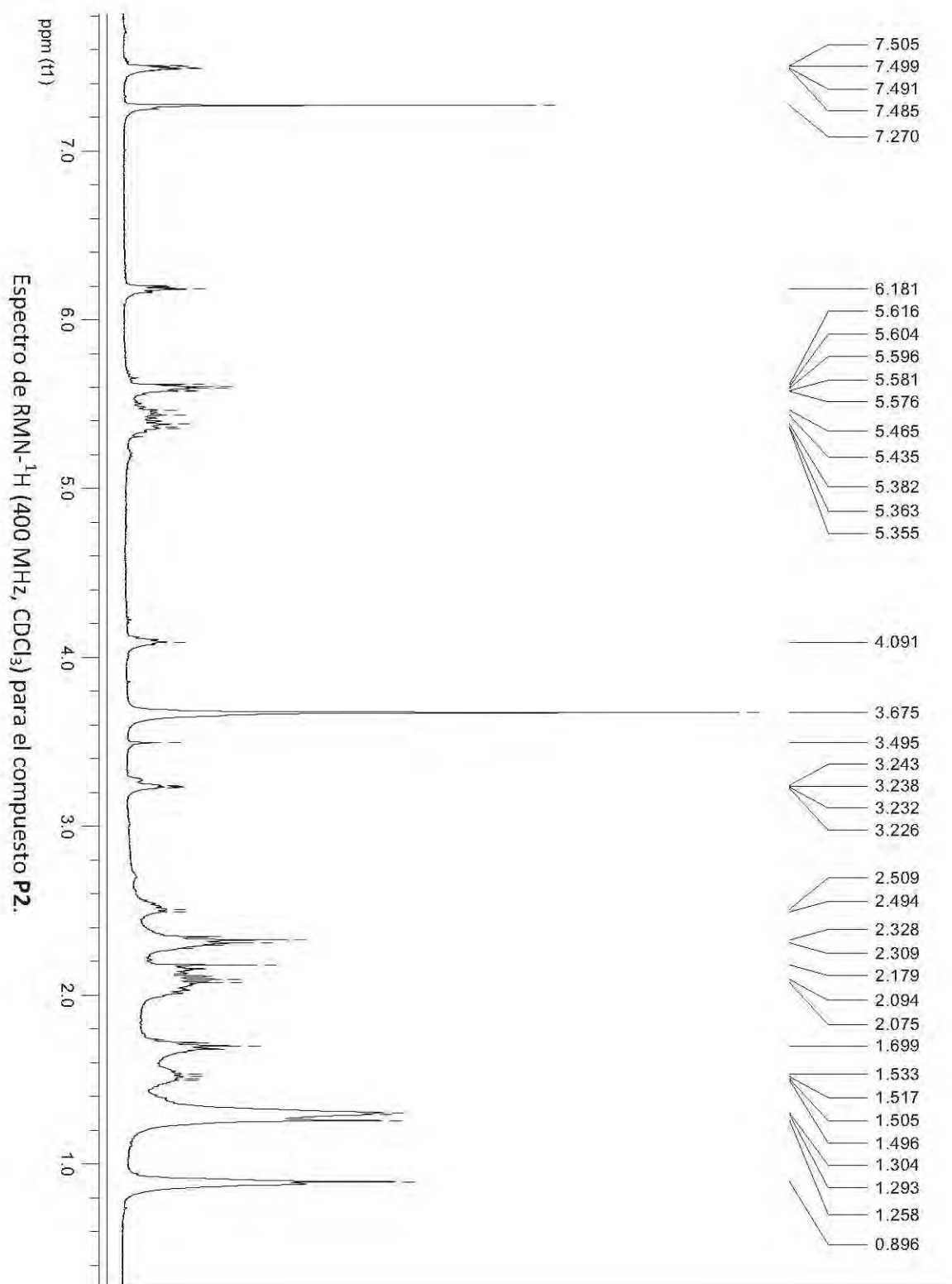
# ANEXO E



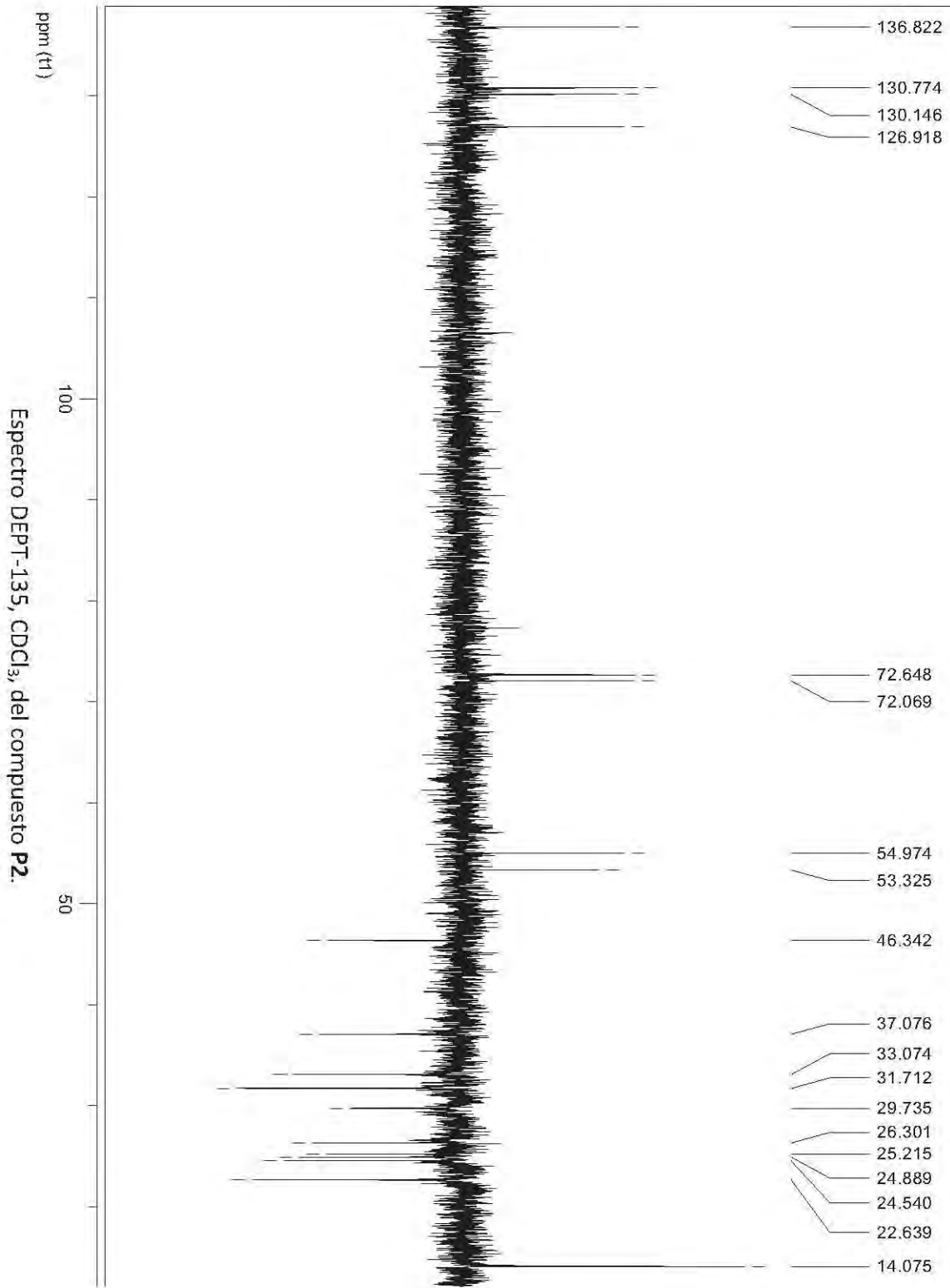
Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) del compuesto P1.



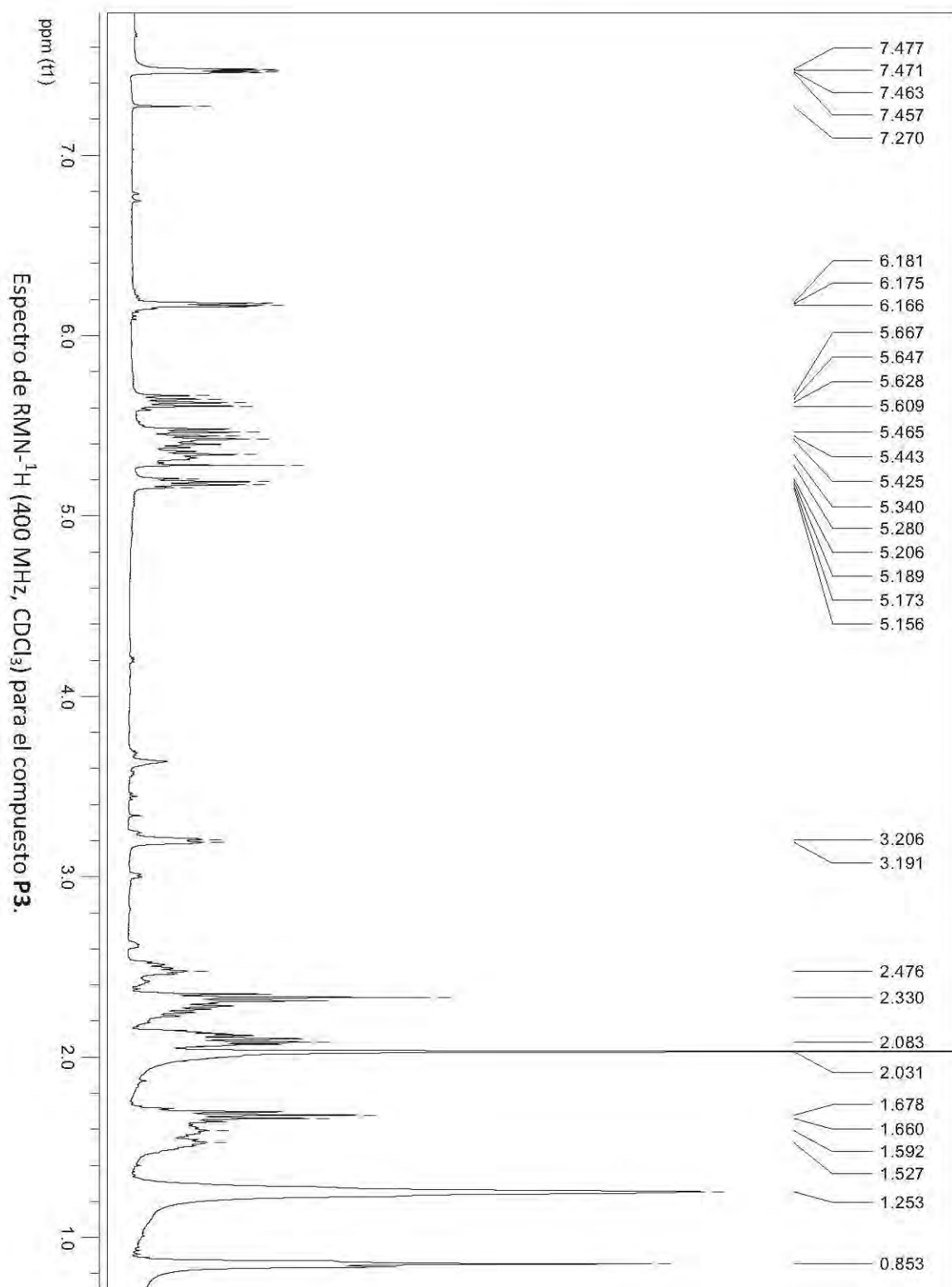
# ANEXO F



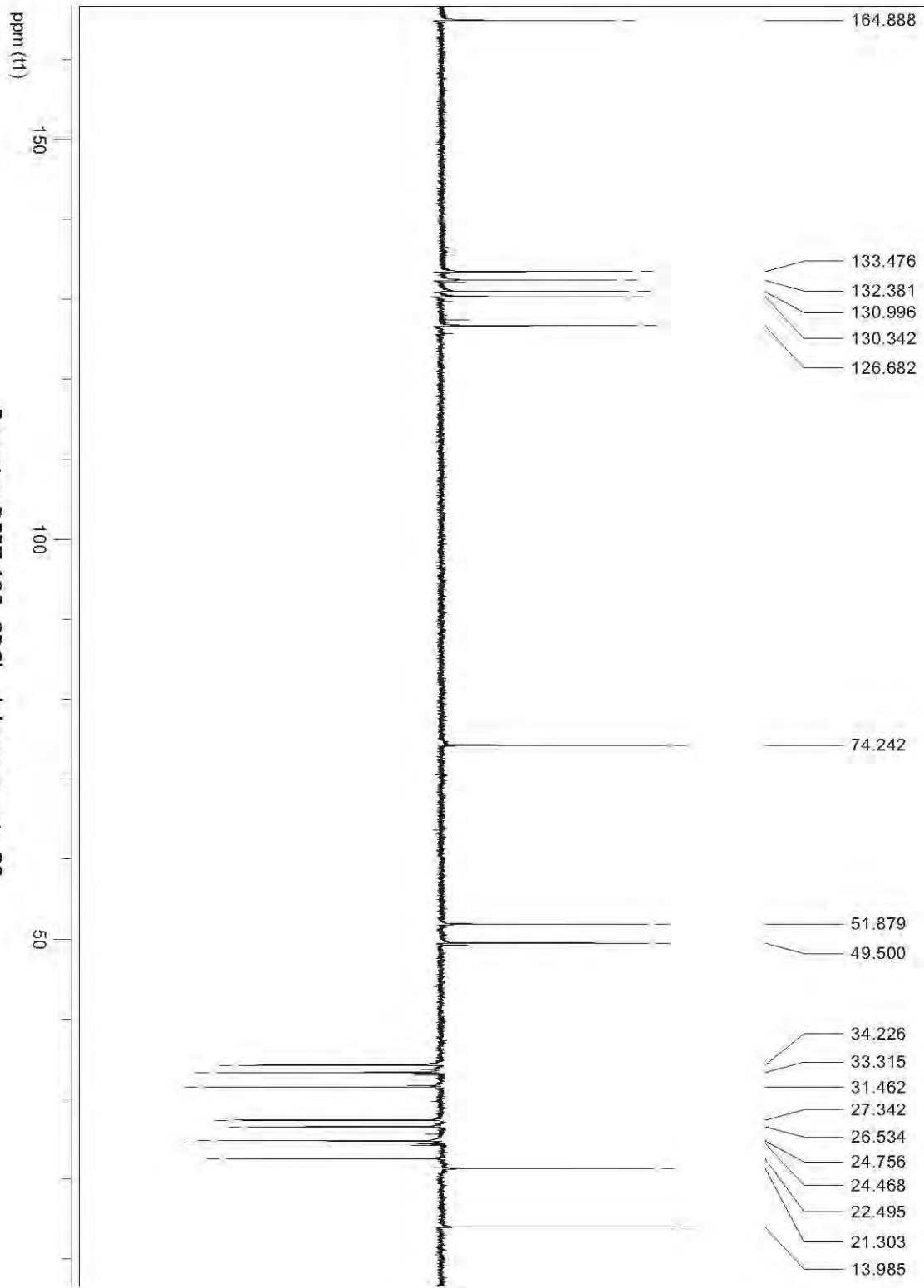




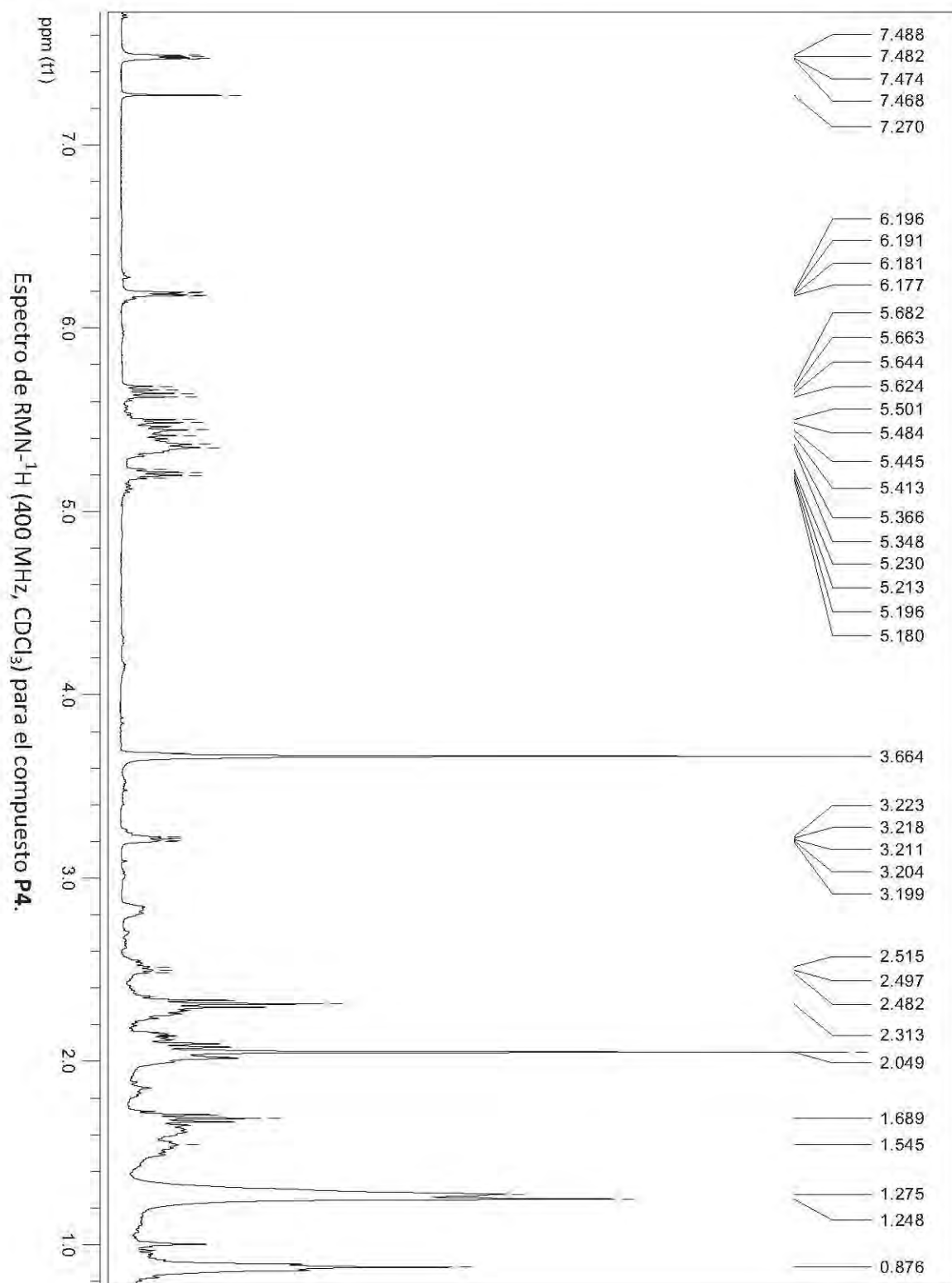
# ANEXO G

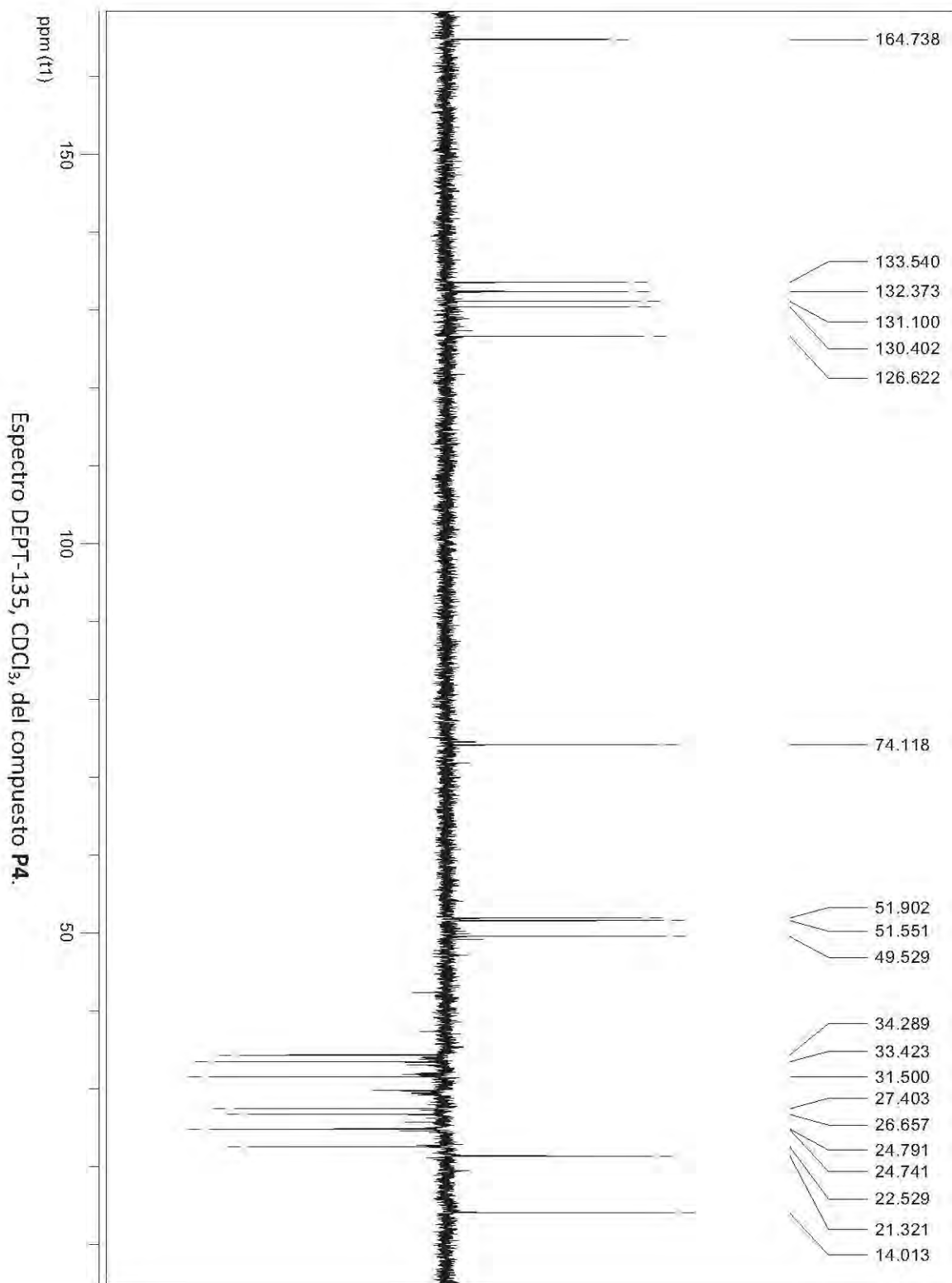


Espectro DEPT-135,  $\text{CDCl}_3$ , del compuesto **P3**.

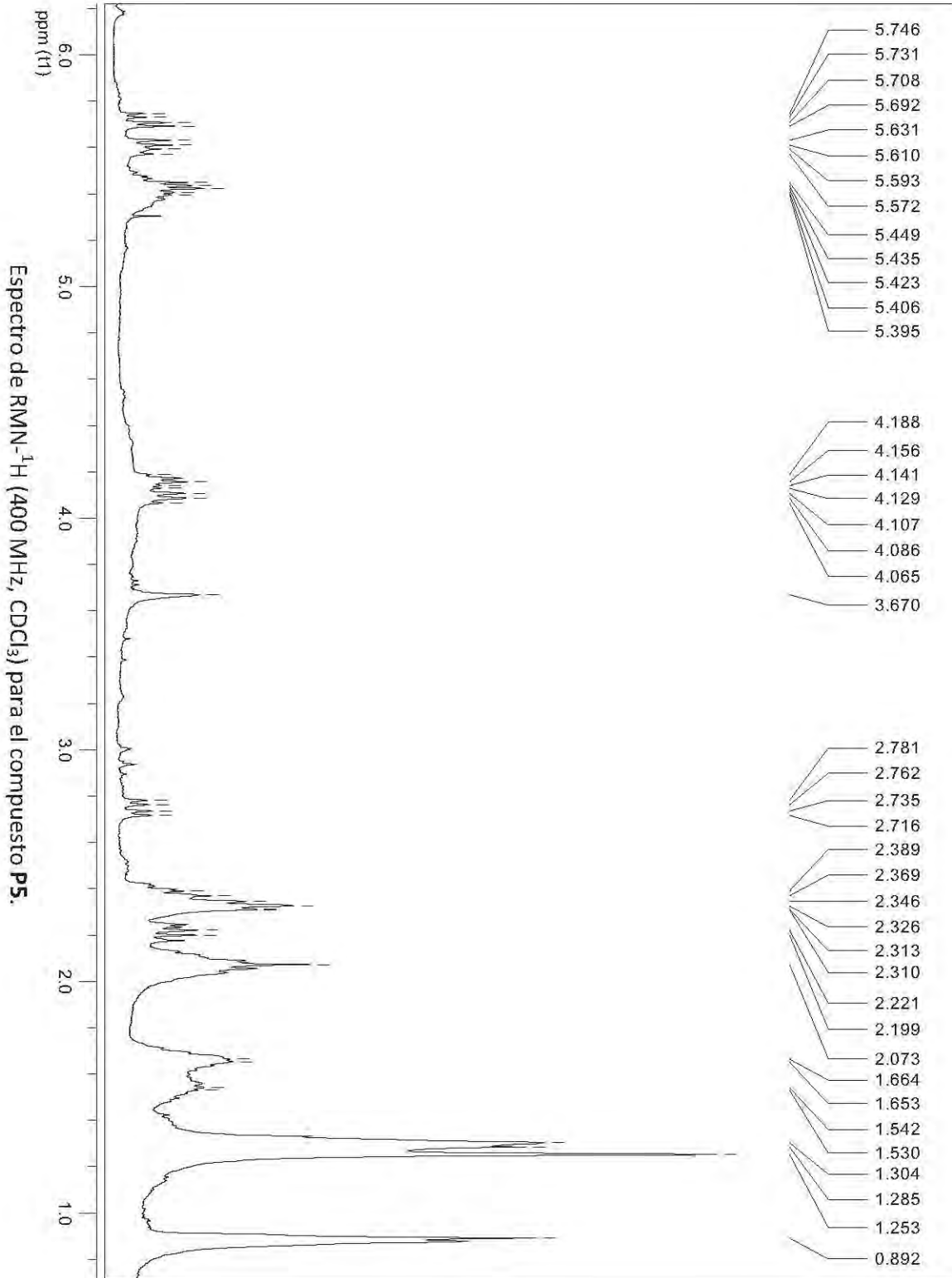


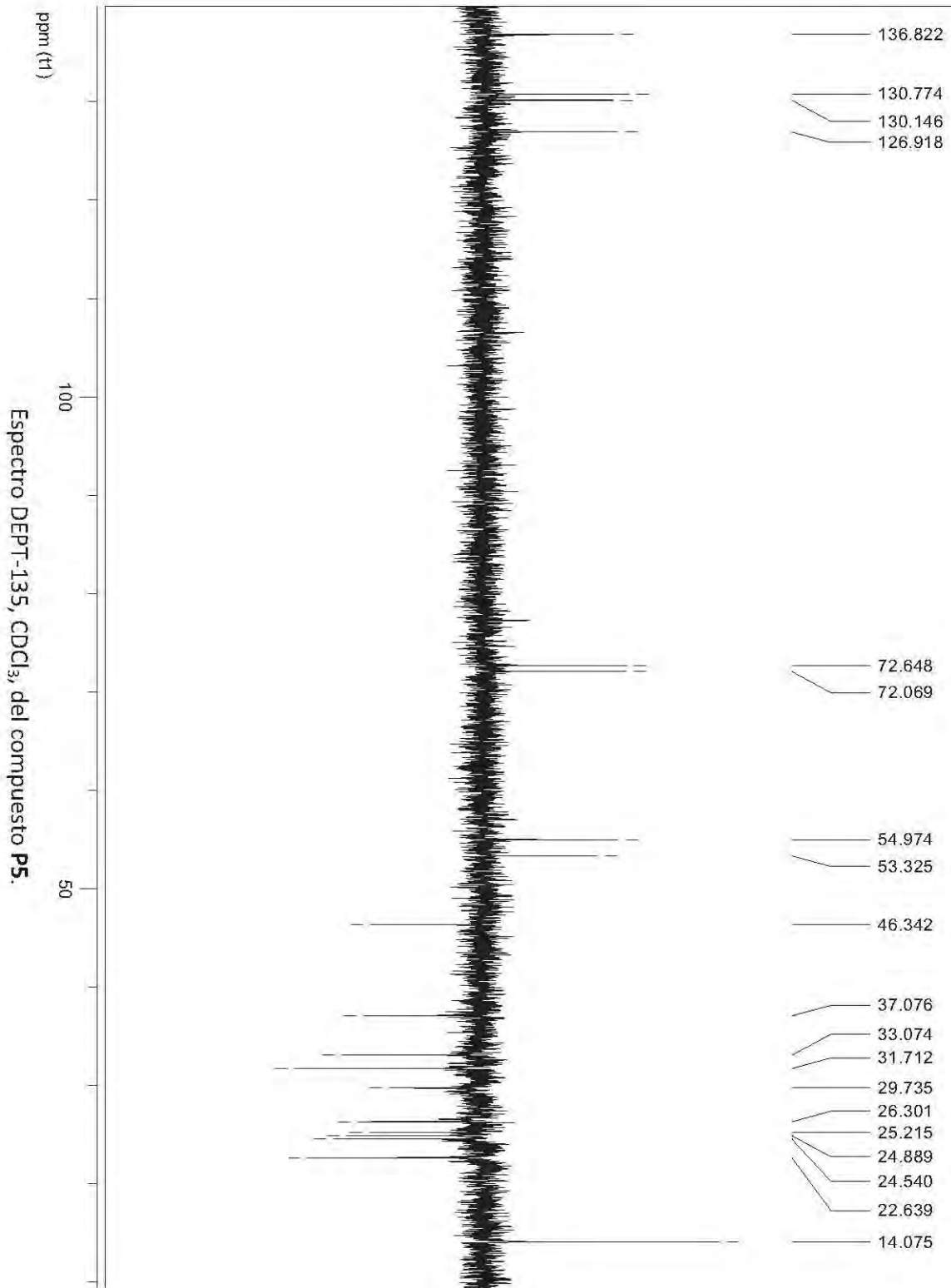
## ANEXO H





# ANEXO I





## ANEXO J

