



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura-actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano**

**Fabio Andrés Castellanos Castillo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia

2014



# **Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura-actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano**

**Fabio Andrés Castellanos Castillo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Química**

Director:

Ph. D. Leonardo Castellanos Hernández

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 Química

Bogotá, Colombia

2014



*Y con ciencia se llenarán las cámaras, de  
todo bienpreciado y agradable. (Pr 24:4)*



# Agradecimientos

En primer lugar a Dios, porque me permitió culminar con éxito este trabajo, me bendijo grandemente por dar con un gran equipo de trabajo y personas gratas para el desarrollo de este trabajo, toda la gloria para El.

A Colciencias y a la Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIB), por el financiamiento al trabajo de maestría realizado.

A la Universidad Nacional de Colombia, por ser el lugar el cual recibí toda mi formación profesional, siendo también mi segundo hogar.

Al grupo de investigación “Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia” en cuyas instalaciones se realizó este trabajo.

A todos los profesores que me brindaron sus conocimientos y apoyaron en toda mi carrera.

A los profesores Cristan Blanco y su grupo de investigación GIFTEX de la Universidad Industrial de Santander y Adriana Umaña y su grupo de investigación en hormonas de la Universidad Nacional por la colaboración, la asesoría y la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

A Leonardo Castellanos Hernández y Freddy Ramos Rodríguez por su orientación, por su apoyo en todo momento, por su paciencia, por ser tan buenos maestros, por creer tanto en mí y por su amistad valiosa.

A los marineros Diani, Alonso, Lina y Sandra por estar presentes en todo momento en estos años de trabajo en el laboratorio, muy buenos amigos. En cuanto a los demás marineros (que se han ido y han llegado) gracias por participar de todas estas alegrías y hazañas. Gracias a todos ellos

A Anita, por ser un apoyo incondicional en estos últimos años, por motivar diariamente el que hacer investigativo, thank you yuuuu.

A mis amigos Francis, Carlos, César, Laura, Jenny, David Oviedo, y todos aquellos que ayudaron enormemente en la consecución de las metas propuestas, además de los gratos momentos que ocurrieron en todo este tiempo de paso en la universidad.

A mi familia, y en especial a mis padres y tía Otilia, ya que ellos han sido un apoyo incondicional en toda mi vida y especialmente en este logro, mil gracias a ellos.

A mis primos beto y Sandra, grandes amigos, más que hermanos, fueron los causantes de muchas alegrías y parte de este trabajo fue gracias a ellos, muchísimas gracias.

Y finalmente a todos aquellos que no fueron nombrados y participaron de toda esta gesta, mil gracias.



## Resumen

La acetilcolinesterasa (AChE) es una de las enzimas más importantes en los seres vivos, ya que es la responsable de la sinapsis colinérgica y otros procesos nerviosos; no obstante, su inhibición ha encontrado aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de diferentes enfermedades, así como en el control de insectos plaga, por lo que la búsqueda de inhibidores de esta enzima (AChEI) es de interés para las ciencias biomédica y agroquímica. En este marco, y queriendo aportar a la química de productos naturales marinos, en esta tesis se evaluaron 117 extractos de organismos marinos recolectados en el mar Caribe colombiano, correspondientes a octocorales (74), esponjas (17) y matts de cianobacterias (26). Se empleó un ensayo por bioautografía en CCD utilizando *Fast Blue Salt* como agente revelador de la actividad, y un enzima proveniente obtenida de *Electrophorus electricus*. En general, los octocorales mostraron ser la fuente más importante de AChEI, particularmente los extractos de gorgónidos de los géneros *Eunicea*, *Plexaura* y *Pseudoplexaura*.

El extracto más activo fue *Pseudoplexaura* sp. (Muestra N° 94), del cual se pudo aislar de manera bioguiada el cembranoide **1a** como el compuesto responsable de la actividad del extracto. Este compuesto fue identificado inicialmente como el cembrano styelólido de acuerdo a lo reportado por Wasylyck en 1989; sin embargo, un análisis más profundo mediante RMN y difracción de rayos X (RX), nos mostró que la estructura de **1a** realmente correspondía al acetato de crassina, aislado de *Pseudoplexaura* porosa. Adicionalmente, el análisis por RX nos permitió determinar la estereoquímica absoluta de **1a**, y corregir la estructura del syelólido. Paso seguido, y haciendo uso de la quimioteca del laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional, se ensayaron otros cembranoides, unos aislados de octocorales de los géneros *Eunicea* y *Pseudoplexaura*, y otros obtenidos por transformación de los naturales (semisíntesis). Los resultados mostraron que muchos de estos cembranos son

activos. Una evaluación semicuantitativa de ellos permitió establecer que el 14-acetoxicrassina (**1a**) es el compuesto más activo, seguido de asperdiol (**4**), y de los cembranos (+)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,3*E*,11*E*)-7,18-Oxa-cembra-2,8-diol (**24**), (-)-1*R*,3*R*,4*R*,8*S*,12*R*-3-acetoxi-plexaurolona (**28**), y (-)-1*R*,2*S*,7*R*,8*R*-18-cetoasperdiol (**30**).

Con el ánimo de entender cómo interactúan estos cembranos con el sitio activo de la acetilcolinesterasa, se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular entre los compuestos inhibidores y la enzima AChE usando el paquete computacional AutoDock,. Para esto se halló la conformación más estable de los inhibidores (cembranos) mediante Gabedit 2.4.7, y se usó un archivo pdb (1DX6) reportado para una enzima AChE aislada de *Torpedo californica*. De esta manera se estudiaron 65 cembranos por *docking* en un sistema rígido, con los residuos presentes en la cavidad del sitio activo estáticos; y en un sistema flexible, dado por la flexibilidad de los residuos y el ligando ensayado. Gracias a estos estudios se pudo ver que los datos obtenidos del sistema flexible correlacionan mejor con los datos obtenidos en el ensayo de inhibición semicuantitativo, dando la posibilidad de diseñar nuevos derivados con actividad de inhibición de la AChE.

**Palabras Clave:** Acetilcolinesterasa, inhibidores de AChE, cembranos, docking.

## Abstract

Acetylcholinesterase (AChE) is one of the most important enzymes among a living organism, because it is involved in cholinergic synapsis and other nervous process. On the other hand, the inhibition of AChE has found many pharmacological and agrochemical applications, for example in the treatment of different neurological diseases, such as Alzheimer disease, as well as pesticide for controlling pest (arachnids and coleopteres). In this context, we tested for the acetylcholinesterase inhibitory activity 117 marine organisms extracts (74 octocorals, 17 sponges, and 26 cyanobacteria matts), using as enzyme AChE from *Electrophorus electricus* and Fast Blue Salt as revealing agent in a bioautography assay in TLC. Among them, octocorals showed to be the most important source of AChEI, particularly, the extracts of the gorgonides of *Eunicea*, *Plexaura* and *Pseudoplexaura* genera. The extracts of *Xestospongia* and *Iotrochota* sponges were also active, while the extracts of cyanobacteria matts were not active.

The extract of *Pseudoplexaura* sp. (sample N° 94) was the most active. The bioguided chemical study from these extract allowed isolating compound **1a** as the responsible for the AChEI activity showed by the crude extract. This compound was identified as styelolide according to the RMN data reported by Wasylyck (1989); however, the RX analysis showed us that **1a** actually corresponds to the cembranoid 14-acetoxicrassine, previously isolated from *Pseudoplexaura porosa*. In addition, the absolute stereochemistry was established by the RX analysis, and also this analysis indicated that the published structure for styelolide does not correspond to that of the natural product **1a**. Afterward, some natural and semisynthetic cembranoides (Obtained from our in home chemical library) were evaluated for their AChEI activity by the previous described TLC methodology. The results showed that cembranoides are as active as galantamine (commercial drug used as positive control). Semi quantitative TLC AChEI analysis showed that 14-acetoxicrassine (**1a**) is the most active compound, followed by asperdiol

(**4**), and cembranes (+)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,3*E*,11*E*)-7,18-Oxa-cembra-2,8-diol (**24**), (-)-1*R*,3*R*,4*R*,8*S*,12*R*-3-acetoxi-plexaurolona (**28**), y (-)-1*R*,2*S*,7*R*,8*R*-18-cetoasperdiol (**30**).

With the aim to understand the cembranes interaction with AChE active site, molecular docking analyses were carried out using AutoDock software package. For each compound the most stable conformer was calculated by means of Gabedit 2.4.7 software, and its interaction with AChE was calculated using an X-ray diffraction file (1DX6.pdb) reported for *Torpedo californica* enzyme. In this way, 65 cembranes were studied by molecular docking in a rigid system and in a flexible system; the results obtained by the second systems were in agreement with those obtained for the semiquantitative experimental data, giving the possibility to design new derivatives with increased AChE inhibition.

**Keywords:** Acetylcholinesterase, AChE inhibitors, cembranes, docking.

# Contenido

	<b>Pág.</b>
Resumen y abstract	IX
Lista de Figuras	XV
Lista de Tablas	XVII
Lista de Símbolos y Figuras	XIX
<b>1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa: Estado del arte</b>	<b>1</b>
1.1. Introducción	1
1.2. Los inhibidores de AChE	2
1.2.1 Los AChEI en la medicina	4
1.2.1.1 AChEI y enfermedad de Alzheimer (AD)	4
1.2.1.2 AChEI y la Miastenia Gravis (MG)	6
1.2.1.3 AChEI y Glaucoma	7
1.2.2 Los AChEI en la agricultura	8
1.2.3 AChEI y la guerra química	11
1.3 Fuentes de IAcE	12
1.4 Por qué estudiar diterpenos como AChEI en Colombia	13
1.5 Bibliografía	14
<b>2. Bioprospección de extractos naturales marinos como fuente de inhibidores de acetilcolinesterasa</b>	<b>19</b>
Resumen	19
2.1 Introducción	20
2.1.1 Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa	21
2.1.2 Inhibidores de acetilcolinesterasa	22
2.2. Materiales y métodos	23
2.2.1 Organismos a estudiar	24
2.2.2 Ensayo de inhibición de AChE	25
2.2.3 Estudio químico de Pseudoplexaura sp. (OCP.94)	26
2.2.4 Transformaciones químicas de compuestos	27
2.2.4.1 Reacción de acetilación del compuesto 1	27
2.2.4.2 Reacción de reducción del compuesto 1	28
2.2.5 Análisis semicuantitativo	28
2.3 Resultados y Discusión	29
2.3.1 Estudio químico de Pseudoplexaura sp. (OCP.94)	32
2.3.1.1 Obtención de derivados	38

---

2.3.2 Identificación de los compuestos responsables de la inhibición en otras especies de octocorales	42
2.4 Conclusiones	49
2.5 Bibliografía	49
<b>3. Estudios de acoplamiento molecular de cembranos y la enzima acetilcolinesterasa</b>	<b>55</b>
Resumen	55
3.1 Introducción	56
3.1.1 Conceptos teóricos y prácticos del <i>docking</i>	57
3.1.2 Estudios in silico de inhibidores de acetilcolinesterasa	59
3.2 Materiales y métodos	62
3.2.1 Software utilizado para el estudio	62
3.2.2 Compuestos para estudio de acoplamiento molecular.	62
3.2.3 Estudios de <i>docking</i> preliminares	63
3.2.4. Estudios <i>docking</i> en sistemas rígidos	65
3.2.5 Estudios de acoplamiento en sistema flexible	65
3.3 Resultados y discusión	65
3.3.1 Estudios preliminares	67
3.3.2 Docking en sistema rígido	73
3.3.3 Relación entre la estructura y la interacción con el sitio activo	77
3.3.3.1 Efecto de grupos funcionales	77
3.3.3.2 Estereoquímica e interacción con el sitio activo	82
3.3.4 Docking en un sistema flexible	83
3.3.5 Relación de datos teóricos-experimentales	89
3.4 Conclusiones	90
3.5 Bibliografía	91

## Lista de Figuras

	Pág.
<b>CAPITULO 1 Inhibidores de la acetilcolinesterasa: Estado del arte</b>	
<b>Figura 1.1</b> A) Diferentes subsitios presentes en la cavidad del sitio activo. B) Disposición de la acetilcolina en el sitio activo de la enzima, en donde ocurre la hidrólisis del neurotransmisor	2
<b>Figura 1.2.</b> Compuestos que interactúan con la cavidad aromática.	3
<b>Figura 1.3</b> Ejemplo de compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico	4
<b>Figura 1.4</b> Rivastigmina: Principio activo del medicamento Exelon, usado en tratamientos contra AD.	6
<b>Figura 1.5</b> Compuestos con actividad AChEI utilizados para el tratamiento de MG	7
<b>Figura 1.6</b> Estructuras de compuestos AChEI usados en el tratamiento del Glaucoma.	8
<b>Figura 1.7</b> Compuestos organofosforados usados como pesticidas por su actividad AChEI	9
<b>Figura 1.8</b> Carbamatos representativos por su uso en pesticidas	10
<b>Figura 1.9</b> Monoterpenos con fuerte actividad AChEI y usados como insecticidas.	11
<b>Figura 1.10</b> Compuestos más conocidos como agentes nerviosos en los llamados agentes de guerra química de la serie G.	12
<b>Figura 1.11</b> Compuestos AChEI de origen marino	13
<b>CAPITULO 2. Bioprospección de extractos naturales marinos como fuente de inhibidores de acetilcolinesterasa.</b>	
<b>Figura 2.1</b> Resultados del ensayo de inhibición de AChE de los extractos de organismos marinos del Caribe Colombiano agrupados por taxas	30
<b>Figura 2.2</b> Géneros de octocorales cuyos extractos dieron positivo al ensayo de inhibición de la AChE, los números corresponden a los extractos activos al ensayo.	31
<b>Figura 2.3 A)</b> Diagrama de fraccionamiento de la muestra OCP.94, el color rojo alrededor de las cajas indica resultado positivo al ensayo de inhibición de AChE; los cuadros rojos corresponden a los compuestos obtenidos. <b>B)</b> Foto del ensayo de inhibición de AChE de las fracciones obtenidas, comparado con la galantamina (gal)	33

<b>Figura 2.4</b> Estructuras propuestas para el compuesto <b>1</b> y los sistemas de spin determinados por COSY y HSQC, así como principales correlaciones de HMBC	35
<b>Figura 2.5</b> A) Diagrama ORTEP del compuesto <b>1</b> . B) estructura del acetato de crassina ( <b>1a</b> )	36
<b>Figura 2.6</b> A) Cromatograma de gases obtenido de la fracción F1; B) Estructuras de los compuestos obtenidos de la fracción F1 por GC-MS	38
<b>Figura 2.7</b> Reacción de síntesis de <b>2</b> por acetilación de <b>1a</b>	41
<b>Figura 2.8</b> Reacción de reducción de <b>1a</b>	41
<b>Figura 2.9</b> Estructura de los cembranoides más activos en el ensayo de inhibición de AChE	44
<b>Figura 2.10</b> Estructura de cembranoides con actividad media en la inhibición de la AChE	44
<b>Figura 2.11</b> Compuestos obtenidos por semisíntesis que presentaron actividad de inhibición.	46
<b>Figura 2.12</b> Compuestos cembranoides probados mediante el ensayo de inhibición de la AChE en forma semicuantitativa	47
<b>Figura 2.13</b> Ensayo de inhibición de AChE semicuantitativo, utilizando como control positivo galantamina (Gal),	48

### **CAPITULO 3 Estudios de acoplamiento molecular de cembranos y la enzima acetilcolinesterasa..**

<b>Figura 3.1</b> Estructuras de inhibidores de AChE y sus derivados de mayor actividad de inhibición, expresado en constantes de inhibición (Ki). a) Galantamina, b) Tacrina, c) Huperzina A, d) derivado de Galantamina, e) Huprina (Híbrido de tacrina y huperzina A)	61
<b>Figura 3.2</b> Estructura base del cembrano, junto con los grupos se encuentran en los distintos compuestos estudiados	63
<b>Figura 3.3</b> Estructuras de los compuestos para realizar los estudios preliminares	63
<b>Figura 3.4</b> Uso del grid para determinar el sistema de estudio de acoplamiento, a la izquierda se muestra un grid de 120 x 120 x 120 Å; a la derecha un grid de 40 x 40 x 40 Å	64
<b>Figura 3.5.</b> Moléculas en representación plana (A) y su optimización en 3D para realizar el estudio por docking (B).	66
<b>Figura 3.6</b> Estructuras de los compuestos modelo para los estudios preliminares, donde el recuadro en rojo corresponde a la posición rígida del compuesto.	67
<b>Figura 3.7</b> A) Acoplamiento de la galantamina ( <b>64</b> ) (morado) en el sitio activo de la enzima, mostrando los residuos de aminoácidos (verde) en la enzima AChE (aguamarina). B) Secciones de la cavidad del sitio activo donde participan los inhibidores.	69
<b>Figura 3.8</b> Residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo que interactúan con los cembranos de referencia ( <b>1a</b> y <b>1b</b> ) y el control positivo (Galantamina, <b>64</b> ).	70
<b>Figura 3.9</b> A) Resultados obtenidos del acoplamiento molecular (valores de energía	71



de unión, en kcal/mol) de la galantamina y los cembranos de referencia usando AutoDock Vina, usando un grid de 120 x 120 x 120 Angstroms. B) Gráfico de afinidad de la galantamina y los cembranos **1a** y **1b** con las diferentes zonas de la AChE.

- Figura 3.10** Valores de energía de unión en kcal/mol de la acetilcolina en la enzima, el recuadro indica el sitio activo. En rojo se ubica el neurotransmisor en el sitio activo, en verde se encuentran las diferentes interacciones del neurotransmisor en la enzima. 72
- Figura 3.11** Estructuras en 3D del patrón positivo (64), del cembrano de referencia (1) y el asperdiol, uno de los más activos en el ensayo de inhibición 72
- Figura 3.12** Energías de unión (Kcal/mol) obtenidas para la interacción de los diterpenos con el sitio activo. Las líneas corresponden al valor obtenido por cada uno de los referentes: galantamina (**64**), 14-acetoxicrassina (1a), styelólido (1b) y asperdiol (4). 75
- Figura 3.13** Compuestos que dieron valores de energía de unión al sitio activo de la AChE más bajos que el styelolido (**1b**) (-11,21 kcal/mol) en el estudio por docking en sistema rígido. 75
- Figura 3.14** Comparación entre energías de unión y energía intermolecular obtenidas a partir de los cálculos de acoplamiento molecular, del más al menos afín (de izquierda a derecha). 76
- Figura 3.15** Energía libre torsional presentada por los cembranos estudiados. 77
- Figura 3.16** Acoplamiento del cembrano más activo (46) con el sitio activo de la enzima 78
- Figura 3.17** Acoplamiento del styelolido (**1b**) con el sitio activo de la enzima 79
- Figura 3.18** Interacción del cembrano 9 con los residuos del sitio activo de la enzima. 80
- Figura 3.19** Acoplamiento del cembrano **29** con el sitio activo de la enzima AChE. 81
- Figura 3.20** Interacción del compuesto 23 a los residuos de la cavidad del sitio activo. 82
- Figura 3.21** Estructuras de epímeros estudiados por Docking junto con el resultado de energía de unión del acoplamiento del compuesto con el sitio activo. 83
- Figura 3.22** Valores de Energía de unión vs. Energía intermolecular de los cembranos estudiados, obtenidos por Docking en un sistema flexible. 86
- Figura 3.23** Cembranos más afines, junto con la galantamina, en el estudio por Docking en sistema flexible 87
- Figura 3.24** Compuesto **51** que presenta valores cercanos a -5 kcal/mol 88
- Figura 3.25** Compuestos **41** que presenta energía de unión de -3,87 kcal/mol. 88
- Figura 3.26** Cembrano **34**, que presenta energía de unión alta en comparación con los demás cembranos ensayados, por lo tanto menos afín a la cavidad al sitio activo. 88
- Figura 3.27** Energías de unión en sistemas rígido y flexible. 89



## Lista de tablas

	Pág.
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Tabla 2.1</b> Algunos tipos de ensayo de inhibición de AChE, la mayoría de estos por bioautografía.	22
<b>Tabla 2.2.</b> Extractos más activos en el ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa	31
<b>Tabla 2.3</b> Asignación de desplazamientos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el compuesto <b>1a</b> .	34
<b>Tabla 2.4</b> Asignación de desplazamientos de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el compuesto <b>2</b>	40
<b>Tabla 2.5</b> Resultados del ensayo de inhibición de AChE con compuestos aislados de octocorales recolectados del caribe colombiano.	43
<b>Tabla 2.6</b> Resultado del ensayo de inhibición cualitativo de compuestos cembranoides obtenidos por semisíntesis	45
<b>Tabla 2.7.</b> Resultados comparativos del ensayo de inhibición semicuantitativo de cembranos procedentes de octocorales y obtenidos por semisíntesis	48
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Tabla 3.1</b> Diferentes algoritmos usados para estudios por docking (Meng et al. 2011)	58
<b>Tabla 3.2</b> Diferentes funciones scoring para determinar afinidad molecular en un complejo ligando-enzima (Meng et al. 2011).	59
<b>Tabla 3.3</b> Valores de energía intermolecular (E. I. F), energía libre de torsión (E. L. Tors) y energía de unión (E. T) de los diferentes cembranos estudiados por Docking en sistema flexible, energías dadas en kcal/mol.	84
<b>Tabla 3.4</b> Correlación de los resultados del ensayo de inhibición de AChE, en el análisis semicuantitativo, con los datos de energía de unión para el sistema rígido y el sistema flexible. Los valores de energía de unión están en kcal/mol.	90



## Lista de Símbolos y abreviaturas

<i>Símbolo</i>	<i>Término</i>
ACN	Acetonitrilo
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidor de acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
AD	<i>Alzheimer Disease</i> (enfermedad de alzheimer)
Asn	Asparagina
Asp	Ácido asapártico
br d	Doblete ancho
br s	Singlete ancho
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BuChE	Butirilcolinesterasa
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Doblete
dd	Doble doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
dt	Doble triplete
DCM	Diclorometano
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTNB	<i>5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)</i>
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESI	<i>Electro Spray Ionization</i>
eV	Electron Volt
FBS	<i>Fast Blue Salt</i>
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>

---

HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
Hz	Hertz
IE	Ionización por impacto electrónico
IK	Índice de Kovatz
Ile	Isoleucina
J	Constante de acoplamiento
Leu	Leucina
MG	Miastenia Gravis
M	multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
PG	Prostaglandina
Phe	Fenilalanina
PN	Producto natural
ppm	Partes por millón
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
RA	Reactivo analítico
RED-Al	Hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio de sodio
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
S	Singlete
SAR	<i>Structure-Activity Relationship</i>
Ser	Serina
T	Triplete
TEA	Trietilamina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV/Vis	Ultravioleta visible
$\delta$	Desplazamiento (ppm)
$\lambda$	Longitud de onda

---

# 1. Inhibidores de la acetilcolinesterasa: Estado del arte

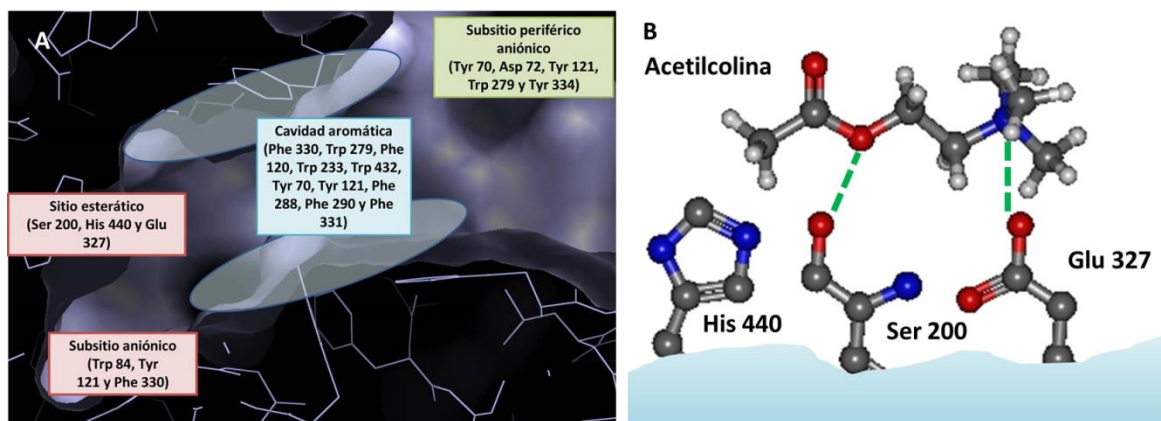
## 1.1 Introducción

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima del grupo de las hidrolasas (EC. 3.1.1.7) que está presente en la mayoría de los seres vivos, principalmente en los vertebrados - incluyendo a los seres humanos-, pero también en invertebrados como los insectos. Está localizada en el sistema nervioso y los músculos, y es la responsable de la regulación de la concentración de la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor involucrado en la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso, permitiendo la transmisión de la señal nerviosa en el sistema nervioso central y periférico (Wiesner et al. 2007).

La estructura de la AChE ha sido estudiada desde la década de 1990 (Sussman et al. 1991); no obstante, su función y presencia en los tejidos musculares ya había sido determinada en la década de 1930, mediante estudios de la incidencia de la AChE en fibras musculares de mamíferos (Brown et al. 1936). Estudios estructurales de la enzima en diferentes organismos han permitido establecer que tanto el sitio activo de la AChE, como en general toda la estructura de la enzima, están evolutivamente conservados y contienen regiones comunes y similares a otras enzimas tipo serina-hidrolasas (Pohanka 2011).

La AChE obtenida de la anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*) ha sido caracterizada en cuanto a su sitio activo, y se ha encontrado que éste presenta varias zonas que participan en la hidrólisis de la acetilcolina: El más importante es el "sitio activo", también conocido como sitio esterático, que está constituido por tres residuos: Ser 200, His 440 y Glu 327 (Figura 1.1 A y B). La orientación que adquiere el neurotransmisor en el proceso de hidrólisis se debe al subsitio aniónico, dado por los residuos de Trp 84, Tyr 121 y Phe

330. Esta orientación facilita la hidrólisis de la ACh en colina y acetato, paso importante en la sinapsis. Adicionalmente, esta enzima posee otros dos subsitios que son importantes en la interacción del neurotransmisor con el sitio activo de la enzima, la cavidad aromática y el subsitio periférico aniónico (Figura 1.1). La cavidad aromática abarca una gran cantidad de residuos aromáticos encargados de las interacciones  $\pi$ -catión de la parte del amonio cuaternario de la ACh y estos residuos aromáticos del sitio activo. El subsitio periférico aniónico aísla la cavidad aromática de la superficie externa de la enzima, además participa en funciones no catalíticas de la misma, como la adhesión a membranas, la diferenciación de células, etc. (Figura 1.1) (Pohanka 2012).



**Figura 1.1** A) Diferentes subsitios presentes en la cavidad del sitio activo. B) Disposición de la acetilcolina en el sitio activo de la enzima, en donde ocurre la hidrólisis del neurotransmisor (Quinn 1987).

## 1.2 Los inhibidores de AChE

Los inhibidores de AChE (AChEI) envuelven a un gran número de compuestos con estructuras muy variadas, y que en presencia de la AChE dan lugar a la inhibición de la enzima, por lo que alteran la sinapsis colinérgica (Khan 2009). Estos compuestos interactúan de maneras diferentes con la cavidad del sitio activo de la enzima, y en función de ellos se clasifican en tres grupos (Pohanka 2011):

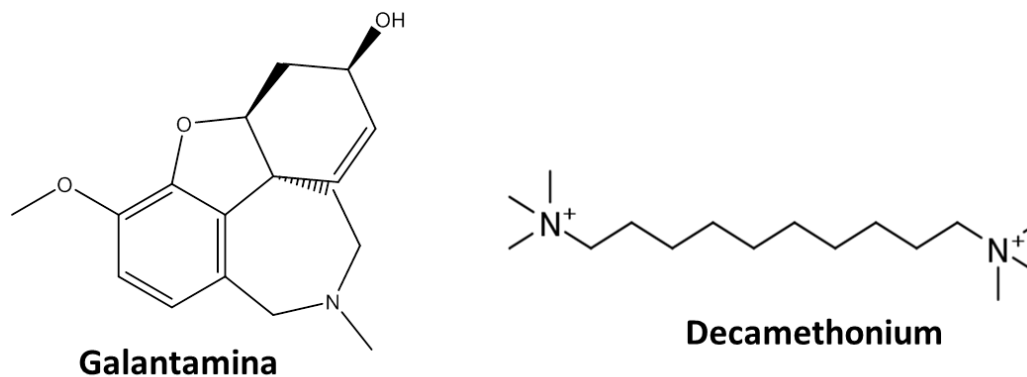
- *Compuestos que interactúan con el sitio activo:* La interacción de este tipo de inhibidores se da con la tríada presente en el sitio activo, principalmente con el



residuo serina de la misma, mediante la formación de ésteres estables que inactivan el sitio activo. Esta característica es común en compuestos usados como toxinas, pesticidas y agentes nerviosos, por ejemplo las armas químicas. No obstante en algunos casos también son usados como medicamentos; los cuales suelen ser carbamatos y organofosforados. En general estos compuestos son nocivos, tóxicos inclusive fatales por la formación de uniones covalentes con la serina, ocasionando pérdida parcial o completa de la actividad enzimática.

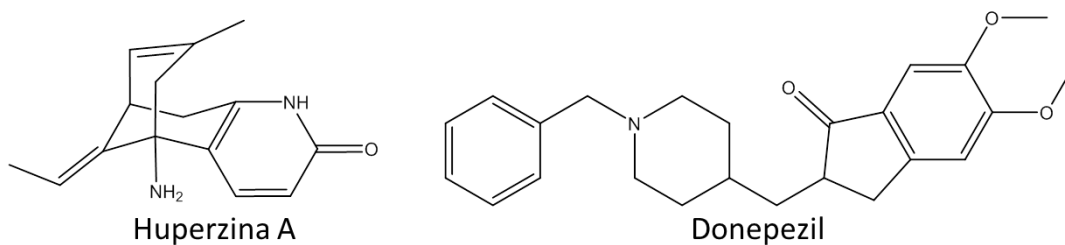
También se han identificado otro tipo de inhibidores que interactúan con el subsitio aniónico, gracias a los grupos aromáticos presentes en sus estructuras; por ejemplo acridinas, quinolinas e isoquinolinas. Un ejemplo atípico de este grupo es la galantamina (figura 1.2), aislada de la planta denominada gota de nieve (*Galanthus woronowii*, Amaryllidaceae), la cual interactúa no solo con el sitio activo y sino también con la cavidad aromática, de manera reversible, por lo que es usada como medicamento en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Pohanka 2011).

- *Compuestos que interactúan con la cavidad aromática:* En general este tipo de compuestos interactúan también con el sitio activo. No obstante, de la cavidad aromática no se puede decir que sea un blanco terapéutico para inhibidores de colinesterasas; sin embargo, compuestos como la galantamina y el decamethonium (obtenido por síntesis) (figura 1.2) presentan interacciones con esta cavidad y son usados como medicamentos (Pohanka 2011), este último como agente anestésico para inducir parálisis muscular (Lee et al. 2002).



**Figura 1.2** Compuestos que interactúan con la cavidad aromática.

- *Compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico:* Es uno de los principales blancos que se estudian para la búsqueda y diseño de medicamentos contra la enfermedad de Alzheimer (AD), gracias a que la formación de placas amiloides en las redes neuronales (una de las características de AD) puede ser aceleradas por la interacción con el subsitio periférico aniónico; así, si un compuesto interactúa con este sitio aniónico, las placas amiloides no interactuarían con él. No obstante, la formación de estas placas es tan sólo una de las posibles causas de la enfermedad, ya que el cuadro patológico del AD es muy complejo y aún no se entiende del todo, por lo que esta aproximación no se podría considerar como una cura. Entre los compuestos AChEI que interactúan con este subsitio se destacan la huperzina A (aislada de *Huperzia serrata*) y el donepezil (como mezcla racémica), que son comercializados para el tratamiento de la AD, siendo la primera además de muy potente como inhibidora de la AChE una molécula segura pues presenta pocos efectos secundarios (Figura 1.3), a diferencia de los otros inhibidores de AChE (Pohanka 2012).



**Figura 1.3** Ejemplo de compuestos que interactúan con el subsitio periférico aniónico

### 1.2.1 Los AChEI en la medicina

La AChE es una de las enzimas de mayor relevancia en los seres vivos, por lo que su estudio ha sido abordado continuamente por los investigadores biomédicos, sobre todo teniendo en cuenta que su inhibición ha encontrado aplicaciones en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la AD; en enfermedades neuromusculares, como la Miastenia Gravis (MG); y en trastornos oculares como el Glaucoma (Houghton et al. 2006). A continuación se describen cada uno de estos temas:

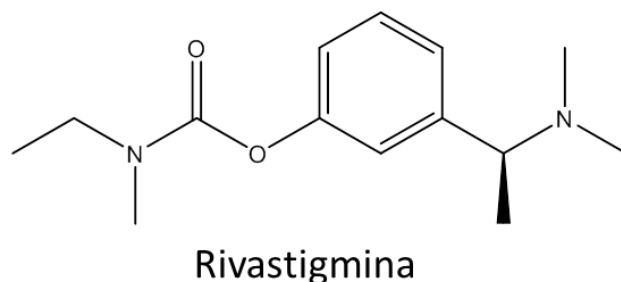
#### 1.2.1.1 AChEI y enfermedad de Alzheimer (AD)

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva, resultado de una amplia degeneración de la sinapsis así como de las neuronas presentes en la corteza cerebral, hipocampo y algunas estructuras subcorticales. El cuadro patológico muestra la formación de agregaciones celulares, y redes neurofibrilares intracelulares. Las agregaciones celulares son núcleos amiloides (un péptido de 40 a 42 aminoácidos formada por una proteína precursora amiloide) rodeados de neuroglías (células nerviosas encargadas de soporte y protección a las neuronas) y neuritas (partes del cuerpo de una neurona, también conocidas como neuronas en desarrollo o incompletas). Por su lado, las redes neurofibrilares corresponden a formaciones de filamentos intracelulares compuestas de microtúbulos asociados a proteínas Tau, las cuales están altamente fosforiladas y afectan el normal funcionamiento de las neuronas (Wecker 2010).

Todos estos factores se asocian a la severidad de la demencia y la pérdida sináptica que caracterizan la AD; sin embargo, el deterioro de las funciones de los neurotransmisores también parece jugar un papel importante en la enfermedad, entre ellos se destaca la baja cantidad de acetilcolina (ACh) en la corteza cerebral. La función de la acetilcolina en los procesos sinápticos hace que los receptores colinérgicos también se vean afectados, dado por el degeneramiento del sistema nervioso, en mayor medida los receptores nicotínicos (involucrados en varias funciones como el control voluntario del movimiento, la memoria y atención, el sueño y alerta, el dolor y la ansiedad) y en menor medida los receptores muscarínicos (relacionados con la memoria y el aprendizaje).

En este marco los AChEI han encontrado aplicación en el tratamiento contra el AD, de hecho la mayoría de medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de AD son compuestos de este tipo. Por ejemplo, la galantamina (Figura 1.2), el donepezil (Figura 1.3) y la rivastigmina (Figura 1.4). Estos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica (encargada de la protección cerebral de agentes externos que pueden ser nocivos presentes en el torrente sanguíneo), y siendo en general altamente selectivos hacia la AChE (aunque la rivastigmina inhibe tanto la AChE como la butirilcolinesterasa-BuChE-) (Wecker 2010). El uso de AChEI busca disminuir la actividad de la enzima AChE, aumentando así la concentración del neurotransmisor ACh, haciendo que la transmisión sináptica aumente, mejorando de esta manera los procesos cognitivos y los

estímulos musculares, lo que redundará en una mejora de la calidad de vida de los pacientes con AD (Viegas et al. 2005).



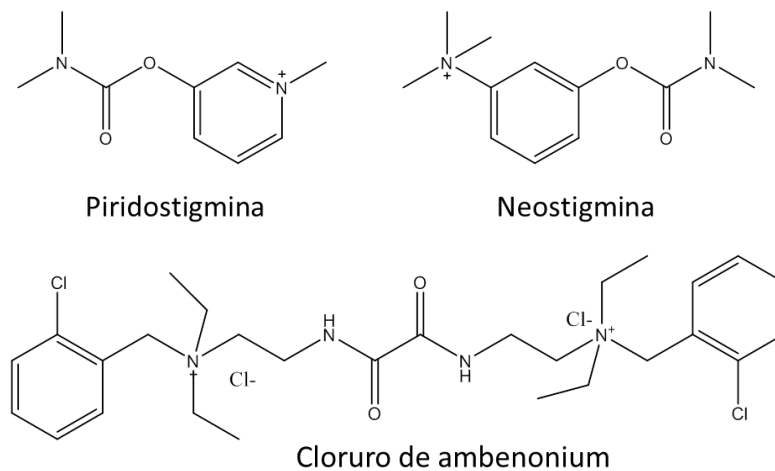
**Figura 1.4** Rivastigmina: Principio activo del medicamento Exelon, usado en tratamientos contra AD.

#### 1.2.1.2 AChEI y la Miastenia Gravis (MG)

La Miastenia Gravis (MG) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por una respuesta de los anticuerpos en contra de los receptores nicotínicos, ocasionando pérdida de la respuesta nerviosa en los músculos del paciente (Tarsy 1998). Así, el bloqueo mediado por anticuerpos en las uniones neuromusculares afecta negativamente la transmisión sináptica, ya que los anticuerpos se enlazan a las moléculas de los receptores, acelerando la hidrólisis de la ACh. Los síntomas de MG son similares a los presentados por envenenamiento con curare, e incluyen debilidad muscular, la cual se acentúa durante la actividad física, y puede incluso afectar a los músculos faciales. En etapas tardías se afectan los músculos relacionados con la respiración y extremidades lo que pone en peligro la vida del paciente (Mehndiratta et al. 2011).

Los tratamientos más comunes incluyen el uso de inhibidores de colinesterasas, uso de corticosteroides, terapia inmunosupresora, inmunoterapia de acción rápida y timentomía. El uso de AChEI se debe a la acción retardante que ellos tienen en el proceso de hidrólisis del neurotransmisor ACh en la unión neuromuscular. Los compuestos con actividad AChEI usados en el tratamiento de MG incluyen la piridostigmina, y en menor medida la neostigmina y el cloruro de ambemonium (Figura 1.5). En general estos compuestos han mostrado un buen desempeño en el tratamiento de la enfermedad;

aunque también han mostrado efectos secundarios por lo que se han desarrollado otras alternativas para su tratamiento (Kumar et al. 2011).

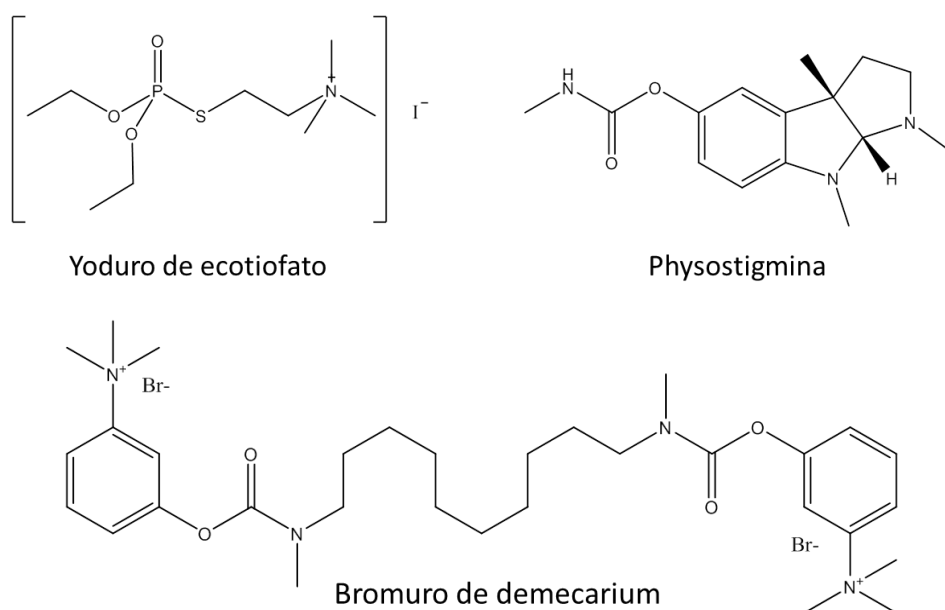


**Figura 1.5** Compuestos con actividad AChEI utilizados para el tratamiento de MG

### 1.2.1.3 AChEI y Glaucoma

El Glaucoma es un trastorno ocular producido por el degeneramiento del nervio óptico, siendo una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. La causa de esta afección se debe a la muerte de las células ganglionares de la retina, las cuales no pueden ser reemplazadas, ocasionándose así la pérdida de la visión en forma progresiva, lo que afecta la calidad de vida del paciente. Los tratamientos más utilizados incluyen el control de la presión intraocular con medicamentos o cirugía. El uso de medicamentos colinérgicos busca estimular los receptores nicotínicos siendo los compuestos similares a la ACh (miméticos) los más empleados. No obstante, este estímulo no sólo se puede hacer de manera directa (agonistas colinérgicos) sino que también se hace de manera indirecta, mediante el uso de inhibidores de acetilcolinesterasa. La manera directa se debe a la acción del medicamento sobre los receptores colinérgicos estimulando así el aumento en el flujo del humor acuoso del ojo al exterior, por la acción de los músculos cercanos al globo ocular, y por lo tanto disminuyendo la presión intraocular; sin embargo, presenta efectos adversos asociados a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, ya que los agonistas colinérgicos hacen que se incremente la permeabilidad, permitiéndose la entrada de otras sustancias a través de esta barrera protectora, algunas de estas sustancias pueden ser nocivas lo que agrava la inflamación del globo ocular. En la manera indirecta se busca que la inhibición

de la AChE aumente la concentración del neurotransmisor ACh, lo que prolonga su acción en los receptores colinérgicos. Los AChEI utilizados para el tratamiento del glaucoma incluyen a: el yoduro de ecotiofato, las sales de demecarium y la physostigmina (Figura 1.6). Los dos primeros presentan poca selectividad hacia la AChE provocando efectos adversos apreciables (diarrea, náusea, dolor de cabeza, etc.); en cambio la physostigmina presenta una mayor selectividad, por lo cual tiene menos efectos secundarios, pero no resulta ser estable en soluciones acuosas, por lo tanto su acción no es tan prolongada como la que presentan otros AChEI (Morrison et al. 2002).



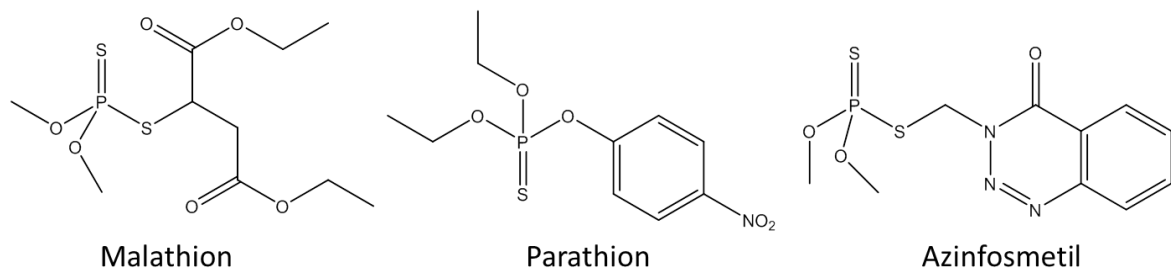
**Figura 1-6** Estructuras de compuestos AChEI usados en el tratamiento del Glaucoma.

### 1.2.2 Los AChEI en la agricultura

Los AChEI han encontrado aplicabilidad en la agricultura gracias a los efectos que ellos tienen sobre el sistema nervioso de algunos invertebrados que son considerados como plagas y pestes en los cultivos. Los compuestos usados como pesticidas incluyen algunos organofosforados y carbamatos, que pueden interactuar con el sitio activo de la enzima tanto de forma irreversible como reversible, ocasionando así el deceso del organismo que entra en contacto con el inhibidor, idealmente la plaga. El modo de acción de estos pesticidas busca una sobre expresión de la acetilcolina en los receptores

nicotínicos y muscarínicos, debido a la inhibición de la AChE, ocasionando procesos anormales en el organismo “fumigado”, que en la mayoría de casos conlleva a la muerte (Houghton et al. 2006). A continuación se presentan de manera general estos insecticidas.

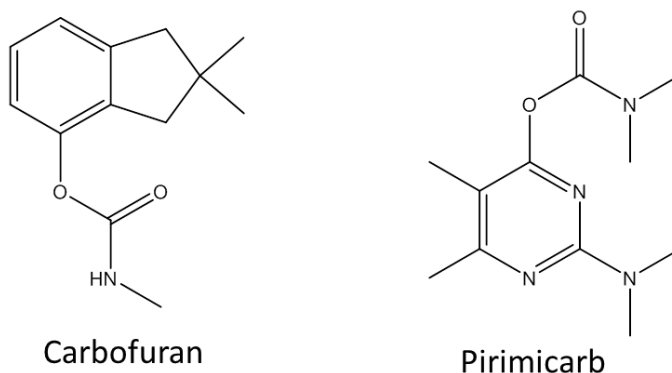
- Los organofosforados son compuestos derivados del ácido fosfórico, los cuales son bastante estables y fáciles de sintetizar. Dada su gran toxicidad estos compuestos han sido usados tanto como pesticidas como armas químicas. Esta toxicidad se debe a la interacción fuerte e irreversible entre ellos y la tríada del sitio activo de la enzima, causando así una pérdida definitiva de la actividad enzimática, y por consiguiente efectos adversos sobre la sinapsis colinérgica. La baja selectividad de estos pesticidas, que afectan adversamente a los humanos, ha llevado a que su uso sea restringido, y en otros casos prohibidos. Ejemplo de compuestos con uso insecticida y actividad AChEI incluyen al malathion, parathion y azinfosmetil (Pohanka 2011).



**Figura 1.7** Compuestos organofosforados usados como pesticidas por su actividad AChEI

- Los carbamatos son compuestos derivados del ácido carbámico, los cuales son menos lesivos que los organofosforados, debido a que la interacción con el sitio activo se da de forma reversible, permitiendo que la enzima pueda restablecer su actividad. Estos compuestos han sido ampliamente utilizados para el control de plagas en jardinería; además, en países del tercer mundo han sido buenos sustitutos de los organofosforados para el control del mosquito *Anopheles*, que es el vector de transmisión de la malaria. La vida media de estos compuestos es corta en el medio terrestre, pero por el contrario en ambientes acuáticos su vida media puede ser larga, por lo que estos resultan peligrosos para los peces y otros organismos acuáticos.

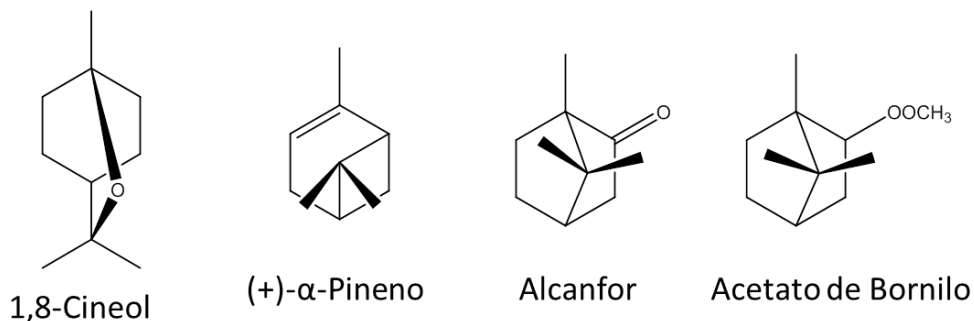
Entre los carbamatos con actividad AChEI más representativos están el carbofuran y el pirimicarb (Figura 1.8) (Eleršek et al. 2011).



**Figura 1.8** Carbamatos representativos por su uso en pesticidas

En el contexto anterior se puede establecer que sin bien los compuestos organofosforados y los carbamatos son útiles como pesticidas, su toxicidad hace que su uso se encuentre actualmente restringido, por lo que se deben buscar nuevas alternativas para reemplazarlos, siendo los metabolitos secundarios de las plantas una de las alternativas más exploradas para obtener insecticidas más seguros, dado que algunos de ellos muestran propiedades tóxicas, y repelentes frente a los insectos plaga (López et al. 2010). Entre los productos naturales con actividad insecticida se destacan algunos monoterpenoides (Figura 1.9), que han mostrado propiedades anticolinesterásicas, pues presentan efectos similares a los presentados por los inhibidores de la AChE del tipo organofosforado o carbamato (Houghton et al. 2006), sin ser tan tóxicos. Estos terpenos han mostrado ser activos contra insectos del orden Coleoptera (López et al. 2010), Phthiraptera (Picollo et al. 2008) y Diptera (Dou et al. 2013), siendo importante resaltar que parecen no afectar de manera grave a muchas especies de insectos consideradas como benéficas y que están presentes en los cultivos que se quieren fumigar.

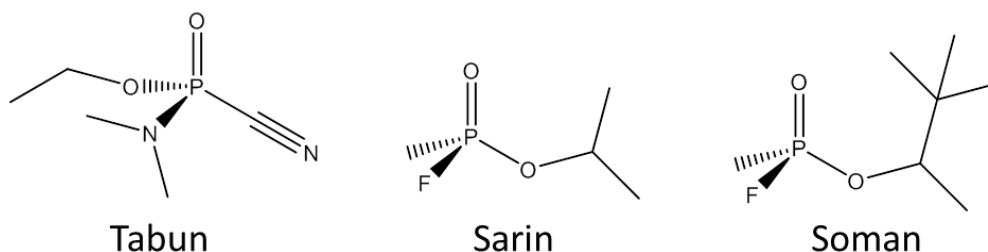




**Figura 1.9** Monoterpenos con fuerte actividad AChEI y usados como insecticidas.

### 1.2.3 AChEI y la guerra química

El uso de los compuestos con actividad AChEI como armas químicas surgió de la observación de los efectos tóxicos producidos por los insecticidas utilizados en el primer tercio del siglo XX. Así, se obtuvieron compuestos organofosforados como agentes nerviosos; aunque como ya se mencionó algunos derivados de ellos también se usan en fines más nobles como medicamentos en veterinaria, y agentes de control de plagas en la agricultura, entre otros. Los agentes nerviosos se han clasificado en: Serie G (tabun, sarin, soman) y los de la serie V (conocidos como agentes VX) (figura 1.10), los cuales varían de acuerdo a su volatilidad, siendo los primeros más nocivos por respiración y contacto con la piel, mientras que los segundos permanecen mucho más tiempo en el ambiente, siendo tóxicos por contacto (Pohanka 2011). La diferencia con los organofosforados usados como pesticidas radica en que los agentes nerviosos son más tóxicos a concentraciones más bajas, y los efectos son más duraderos, además su unión es irreversible con la enzima, por lo que no se da la reactivación de la actividad de la misma.



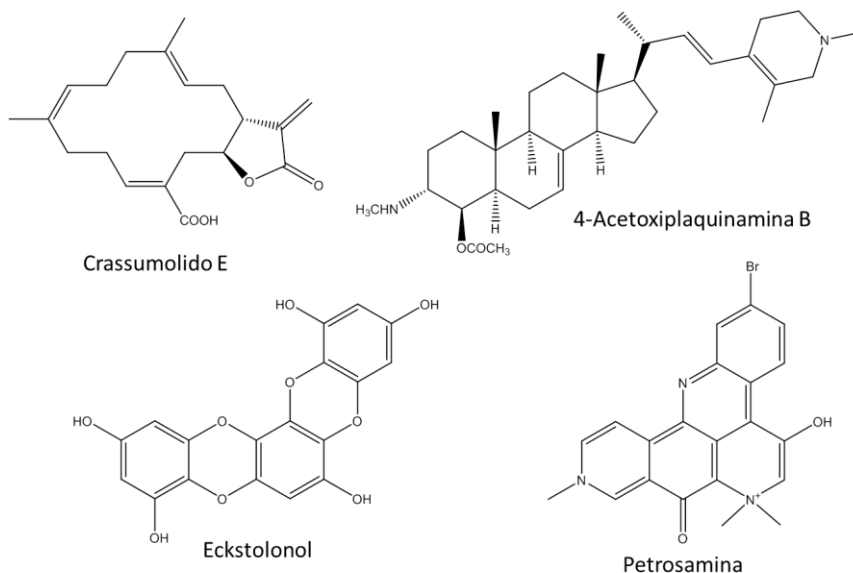
**Figura 1.10** Compuestos más conocidos como agentes nerviosos en los llamados agentes de guerra química de la serie G.

### 1.3 Fuentes de AChEI

Como se ha mostrado en los párrafos anteriores los AChEI han sido importantes en el tratamiento de enfermedades como la AD, MG y el Glaucoma, así como en pesticidas. Por lo tanto encontrar nuevos compuestos con esta actividad resulta ser una necesidad, siendo los productos naturales una de las fuentes más importantes de estos compuestos. Las plantas han sido los organismos que han proporcionado la mayor cantidad de compuestos con esta actividad inhibitoria. Entre ellas es importante destacar especies como *Physostigma venenosum*, *Lycopodium serratum* y *Galanthus woronowii*, de las cuales se han sido aislados compuestos con potente actividad de AChEI, como lo son la physostigmina, la huperzina A y la galantamina, respectivamente (Ikay Orhan et al. 2003). Entre estas plantas se han encontrado una gran variedad de compuestos con actividad AChEI incluyendo alcaloides, flavonoides, y terpenos, entre otros (Houghton et al. 2006).

De otro lado, los organismos marinos son reconocidos como una fuente de compuestos con actividad biológica igual o superior a los organismos terrestres (Montaser et al. 2011). Así, de los invertebrados marinos se han aislado compuestos con actividad antiinflamatoria, anticáncer, antiviral (Montaser et al. 2011, Newman et al. 2012, Blunt et al. 2013), antifouling (Fusetani 2011), entre otras; no obstante son pocos los ejemplos de búsquedas sistemáticas de compuestos con actividad AChEI entre los organismos marinos.

A continuación se presentan los compuestos de origen marino a los que se les ha reportado esta actividad AChEI: Estructuras terpenoides como el cembrano, crassumolido E, aislado del octocoral *Lobophytum* sp (Bonnard et al. 2010); el alcaloide esteroidal 4-acetoxiplaquinamina B, aislado de la esponja *Corticium* sp (Langjae et al. 2007); florotaninos como el eckstolonol, aislado del alga *Ecklonia stolonifera* (Yoon et al. 2008), y alcaloides como la petrosamina, de la esponja *Petrosia* sp (Figura 1.11) (Nukoolkarn et al. 2008).



**Figura 1.11** Compuestos AChEI de origen marino.

Como se puede deducir de lo anterior, son pocos los compuestos con actividad AChEI aislados de fuentes marinas lo que nos indican que esta actividad ha sido poco explorada para estos invertebrados, por lo cual en este trabajo nos proponemos hacer una búsqueda sistemática de compuestos AChEI entre organismos marinos recolectados en las costas de Colombia.

## 1.4 Por qué estudiar diterpenos como AChEI en Colombia

Las zonas marinas de Colombia poseen una riqueza enorme, dada por los arrecifes coralinos en donde se encuentran una gran diversidad de organismos, que han sido fuentes promisorias de compuestos con diferentes actividades biológicas aplicables en la medicina, en la agroindustria, entre otros. Esta riqueza de biodiversidad marina genera competencia entre los diferentes organismos, como octocorales y algas, lo que lleva a la producción de metabolitos para su defensa que podría incluir inhibidores de AChE (Montaser et al. 2011).

El potencial bioactivo de los compuestos aislados a partir de octocorales del Caribe Colombiano se ve reflejado en los compuestos antiinflamatorios de

*Pseudopterogorgia* (Correa et al. 2009), en los inhibidores de QS y antiinflamatorios de *Eunicea* (Reina et al. 2011, Tello et al. 2013) y *Pseudoplexaura* (Reina et al. 2011, Tello et al. 2011).

En cuanto a los cembranos como compuestos inhibidores de la acetilcolinesterasa existe un reporte de un octocoral *Lobophytum* sp., que presentó un compuesto cembranoide denominado crassumolido E, en el archipiélago de Comoros, al noroeste de Madagascar, en 2010 (Bonnard et al. 2010). No obstante, en nuestro país no se reportado esta actividad para los compuestos aislados de octocorales; sin embargo en nuestro grupo de investigación se han podido aislar una gran cantidad de este tipo de terpenos a partir de octocorales, por lo tanto en este trabajo de maestría nos propusimos valorar este recurso en cuanto a su actividad AChEI

## 1.5 Bibliografía

Blunt, J. W., B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro and M. R. Prinsep (2013). "Marine natural products." Natural Product Reports **30**(2): 237-323.

Bonnard, I., S. B. Jhaumeer-Laulloo, N. Bontemps, B. Banaigs and M. Aknin (2010). "New Lobane and Cembrane Diterpenes from Two Comorian Soft Corals." Marine Drugs **8**(2): 359-372.

Brown, G. L., H. H. Dale and W. Feldberg (1936). "Reactions of the normal mammalian muscle to acetylcholine and to eserine." The Journal of Physiology **87**(4): 394-424.

Correa, H., A. L. Valenzuela, L. F. Ospina and C. Duque (2009). "Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andres (SW Caribbean)." J Inflamm (Lond) **6**: 5.

Dou, D., J. G. Park, S. Rana, B. J. Madden, H. Jiang and Y. P. Pang (2013). "Novel selective and irreversible mosquito acetylcholinesterase inhibitors for controlling malaria and other mosquito-borne diseases." Sci Rep **3**: 1068.

Eleršek, T. and M. Filipič (2011). Cholinergic Pesticides. Pesticides - The impacts of Pesticide exposure. M. Stoytcheva. Rijeka, Croatia, InTech.

Fusetani, N. (2011). "Antifouling marine natural products." Natural Product Reports **28**(2): 400-410.

Houghton, P. J., Y. Ren and M.-J. Howes (2006). "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi." Natural Product Reports **23**(2): 181-199.

Khan, M. T. (2009). "Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects." N Biotechnol **25**(5): 331-346.

Kumar, V. and H. J. Kaminski (2011). "Treatment of myasthenia gravis." Curr Neurol Neurosci Rep **11**(1): 89-96.

Langjae, R., S. Bussarawit, S. Yuenyongsawad, K. Ingkaninan and A. Plubrukarn (2007). "Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge Corticium sp." Steroids **72**(9-10): 682-685.

Lee, C. and T. Jones (2002). "Molecular conformation-activity relationship of decamethonium congeners." Br J Anaesth **88**(5): 692-699.

Ikay Orhan and B. Sener (2003). "Acetylcholinesterase Inhibitors from Natural Resources." FABAD. Journal of pharmaceutical sciences **28**: 7.

López, M. D. and M. J. Pascual-Villalobos (2010). "Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control." Industrial Crops and Products **31**(2): 284-288.

Mehndiratta, M. M., S. Pandey and T. Kuntzer (2011). "Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis." Cochrane Database Syst Rev(2): CD006986.

Montaser, R. and H. Luesch (2011). "Marine natural products: a new wave of drugs?" Future Med Chem **3**(12): 1475-1489.

Morrison, J. C. and I. P. Pollack (2002). Glaucoma Science and Practice.

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2012). "Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." Journal of Natural Products **75**(3): 311-335.

Nukoolkarn, V. S., S. Saen-oon, T. Rungrotmongkol, S. Hannongbua, K. Ingkaninan and K. Suwanborirux (2008). "Petrosamine, a potent anticholinesterase pyridoacridine alkaloid from a Thai marine sponge *Petrosia n. sp.*" Bioorg Med Chem **16**(13): 6560-6567.

Picollo, M. I., A. C. Toloza, G. Mougabure Cueto, J. Zygadlo and E. Zerba (2008). "Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids." Fitoterapia **79**(4): 271-278.

Pohanka, M. (2011). "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(3): 219-229.

Pohanka, M. (2012). "Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 - present)." Expert Opin Ther Pat **22**(8): 871-886.

Quinn, D. M. (1987). "Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states." Chemical Reviews **87**(5): 955-979.

Reina, E., C. Puentes, J. Rojas, J. García, F. A. Ramos, L. Castellanos, M. Aragón and L. F. Ospina (2011). "Fuscoside E: A strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **21**(19): 5888-5891.

Sussman, J. L., M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker and I. Silman (1991). "Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein." Science **253**(5022): 872-879.

Tarsy, D. (1998). Myasthenia gravis and related diseases : disorders of the neuromuscular junction / edited by David P. Richman. New York, N.Y, New York Academy of Sciences.

Tello, E., L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro, J. Rodríguez, C. Jiménez and C. Duque (2011). "Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the Caribbean octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexaurolones." Tetrahedron **67**(47): 9112-9121.

Tello, E., L. Castellanos and C. Duque (2013). "Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors." Bioorganic & Medicinal Chemistry **21**(1): 242-256.

Viegas, C., Jr., S. Bolzani Vda, E. J. Barreiro and C. A. Fraga (2005). "New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors." Mini Rev Med Chem **5**(10): 915-926.

Wecker, L. C. L. M. B. T. M. D. G. F. C. W. S. (2010). "Brody's human pharmacology molecular to clinical." from <http://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-B9780323053747X00018>.

Wiesner, J., Z. Kriz, K. Kuca, D. Jun and J. Koca (2007). "Acetylcholinesterases--the structural similarities and differences." J Enzyme Inhib Med Chem **22**(4): 417-424.

Yoon, N. Y., H. Y. Chung, H. R. Kim and J. S. Choi (2008). "Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*." Fisheries Science **74**(1): 200-207.

## 2. *Screening* de extractos naturales marinos como fuente de inhibidores de acetilcolinesterasa.

### Resumen

La acetilcolinesterasa (AChE) es una de las enzimas más importantes en los seres vivos, siendo la responsable de la sinapsis colinérgica y otros procesos nerviosos; no obstante, su inhibición ha encontrado aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, o en los insecticidas. Así, la búsqueda de inhibidores de esta enzima (AChEI) es de interés hoy en día para la ciencia, estando esfuerzos de búsqueda de estas moléculas en los extractos de plantas, mientras los organismos marinos no se han estudiado a profundidad. En este marco, y queriendo aportar a la química de productos naturales marinos, se evaluaron 117 extractos de organismos marinos recolectados en aguas del Caribe colombiano, correspondientes a octocorales (74), esponjas (17) y matts de cianobacterias (26). Se empleó un ensayo por bioautografía en CCD utilizando *Fast Blue Salt* como agente revelador de la actividad, y una enzima proveniente obtenida de *Electrophorus electricus*. En general, los octocorales mostraron ser la fuente más importante de AChEI, particularmente los extractos de gorgónidos de los géneros *Eunicea*, *Plexaura* y *Pseudoplexaura*.

El extracto más activo correspondió a una *Pseudoplexaura* sp. (OCP94), en búsqueda de los compuestos responsables de la actividad se identificó al diterpeno de tipo cembranoide 14-acetoxicrassina (**1a**) como el compuesto activo. El compuesto **1a** fue acetilado para obtener 4,14-diacetoxicrassina (**2**), poco activo, y reducido para obtener los compuestos **2a** y **2b**, que presentaron una buena actividad. También, se aislaron otro



tipo de compuestos del tipo sesquiterpenoide (mezcla **3a** a **3d**) pero que no presentaron actividad inhibitoria.

Paso seguido, y haciendo uso de la quimioteca del laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional se ensayaron otros cembranoides, unos aislados de octocorales de los géneros *Eunicea* y *Pseudoplexaura*, y otros obtenidos por transformación de los naturales (semisíntesis). Los resultados mostraron que muchos de estos cembranos son activos, por lo que los más activos se evaluaron de manera semicuantitativa. Lo anterior permitió establecer que el 14-acetoxicrassina (**1a**) es el compuesto más activo, seguido de asperdiol (**4**), y de los cembranos (+)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,3*E*,11*E*)-7,18-oxa-cembra-2,8-diol (**24**), (-)-(1*R*,3*R*,4*R*,8*S*,12*R*)-3-acetoxi-plexaurolona (**28**) y (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,8*R*)-18-ceto-asperdiol (**30**). Estos resultados semicuantitativos serán la base para los estudios de *docking* que se presentan en el tercer capítulo.

## 2.1 Introducción

El término de bioprospección o prospección de la biodiversidad se ha definido recientemente como: Temática y trabajo colectivo orientados a la búsqueda, conocimiento y selección de organismos o productos derivados, con uso actual o potencial en salud, alimentación, industria y medio ambiente, entre otros; y su aprovechamiento sostenible en procesos productivos a escala industrial o artesanal, con aplicación nacional o internacional de los productos o servicios generados (Melgarejo et al. 2002). Sin embargo, es claro que esta búsqueda de compuestos bioactivos a partir de plantas (terrestres, es su mayoría) y microorganismos se ha hecho desde tiempos ancestrales (Molinski et al. 2009). Recientemente, se han venido explorando otras fuentes de compuestos, entre ellas los organismos marinos que se han destacado por producir compuestos de estructura novedosa y potente actividad biológica (Blunt et al. 2013). En la primer fase de la valoración bioprospectiva del recurso se lleva a cabo un *screening* en el cual se valoran una gran cantidad de extractos de manera preliminar para identificar cuáles tienen potencial como fuente de compuestos bioactivos.

Así, el gran potencial de los productos naturales como compuestos bioactivos ha sido juzgado mediante múltiples ensayos biológicos, que van desde *in vivo* hasta *in vitro*. Para las primeras fases de juzgamiento del potencial bioactivo de un extracto (o compuesto) se prefieren los ensayos *in vitro*, pues sus resultados suelen ser fiables y ayudan en la comprensión del mecanismo de acción del compuesto evaluado (Vinardell Martínez-Hidalgo 2007); así mismo, suelen requerir poca cantidad de muestra y ser económicos, además de pocas consideraciones éticas. Entre el conjunto de ensayos *in vitro* se destacan los que utilizan enzimas, dada su altísima especificidad, y que buscan identificar compuestos capaces de inhibirlas (entre otras actividades). Es más, hoy en día casi la mitad de los medicamentos que existen son inhibidores de enzimas relacionadas con diversas enfermedades (Copeland 2013). Entre los bioensayos con enzimas mejor conocidos se tiene la inhibición de acetilcolinesterasas (Choma et al. 2011), dada su potencial aplicación en el tratamiento de diferentes enfermedades.

### **2.1.1 Ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa**

Para evaluar el potencial de un extracto o compuesto como inhibidor de la AChE, existen varios métodos descritos en la literatura. En la Tabla 2.1 se muestran los ensayos *in vitro* más relevantes. Estos métodos están basados en la facultad de la acetilcolinesterasa de hidrolizar la acetilcolina, en acetato y colina; así como sustratos similares al neurotransmisor. Los productos de hidrólisis pueden ser detectados directamente o revelados mediante la formación de complejos coloreados o fluorescentes. Así, esta técnica se ha podido adaptar a la cromatografía en capa delgada (CCD), o a métodos colorimétricos en placas de 96 pozos. Dado que son ensayos fáciles de realizar y sensibles son apropiados para hacer estudios de productos naturales de manera bioguiada.

**Tabla 2.1** Algunos tipos de ensayo de inhibición de AChE, la mayoría de estos por bioautografía.

Tipo de ensayo	Descripción	Referencias
Método colorimétrico usando Ácido Ditiobis-Nitrobenzoico (DTNB) y acetiltiocolina	Formación de un compuesto de color amarillo, donde la inhibición se observa como manchas de color blanco o disminución del color amarillo	(Rhee et al. 2001)
Método colorimétrico usando acetato de 1-naftilo y <i>Fast Blue Salt</i> (FBS)	Formación de un compuestos coloreado (púrpura) por la reacción entre el naftol, producto de hidrólisis del acetato de 1-naftilo, y el compuestos azoico FBS. Las manchas de inhibición son blancas.	(Marston et al. 2002)
Método Quimioluminiscente implementado en técnicas HTS	Reacciones enzimáticas acopladas para producir quimioluminiscencia, determinada por la emisión de luz producida por el luminol y la peroxidasa utilizada.	(Guardigli et al. 2005)
Método colorimétrico usando $K_3(FeCN)_6$ y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Formación de un complejo coloreado azul en presencia de sales de hierro. La inhibición de la enzima se observa como manchas amarillas claras.	(Yang et al. 2011)

Los métodos resumidos en la tabla 2.1. han sido los más utilizados en la búsqueda de productos naturales con capacidad inhibitoria de AChE; sin embargo, algunos de ellos tienen desventajas importantes a la hora de interpretar los resultados; así por ejemplo, los ensayos colorimétricos desarrollados por Ellman, Marston y Yang presentan interferencias con compuestos con funciones aldehído o amina; estas interferencias son más notorias en el método propuestos por Ellman (Rhee et al. 2003). De otro lado, los métodos colorimétricos realizados en placas de 96 pozos presentan inconvenientes asociados a la solubilidad de los compuestos a ensayar; que en el caso de ser baja hacen necesario el uso de disolventes adicionales que podrían interferir en el proceso de inhibición, por lo que s selección es un paso importante (Danilo Ribeiro de et al. 2012). En cuanto a las técnicas HTS (*High-Throughput Screening*) en ensayos de inhibición de AChE, se tienen resultados muy fiables haciendo uso de poca cantidad de muestra, pero su implementación requiere de equipos especializados y reacciones enzimáticas acopladas, haciendo el ensayo más complejo y costoso que los colorimétricos (Guardigli et al. 2005).

### 2.1.2 Inhibidores de acetilcolinesterasa

Los estudios de bioprospección en búsqueda de inhibidores de acetilcolinesterasa han sido alentados por las múltiples aplicaciones que tienen este tipo de compuestos, ya sea en el campo de la medicina o de los insecticidas, tal y como se ilustró en el capítulo

anterior. Estos inhibidores presentan una gran variedad de estructuras y han sido buscados principalmente en plantas siendo la galantamina (Heinrich et al. 2004) y la huperzina (Wang et al. 2006) los más importantes. En el ambiente marino se han encontrado pocos compuestos con actividad inhibitoria de la AChE, pero vale la pena aclarar que hay muy pocos estudios de tipo sistemático, por lo que sería de esperarse que entre los invertebrados marinos haya compuestos con potente actividad, pero que sean aún desconocidos por la ciencia. Entre los compuestos aislados de fuentes marinas con actividad AChEI se tienen diterpenos del tipo cembrano aislados del octocoral *Lobophytum* sp.(Bonnard et al. 2010); los alcaloides esteroidales aislados de la esponja *Corticium* sp (Langjae et al. 2007); los florotaninos del alga *Ecklonia stolonifera* (Yoon et al. 2008), y los alcaloides del tipo piridoacrínico de la esponja *Petrosia* sp (Nukoolkarn et al. 2008). (Ver figura 1.11)

En el marco anterior en este capítulo de la tesis se buscó realizar un estudio sistemático de organismos marinos del Caribe Colombiano como fuente de compuestos AChEI, usando para ello un ensayo de inhibición en CCD basado en el método de Martson (acetato de 1-naftilo y *Fast Blue Salt*), para así identificar extractos con actividad promisoriosa. Algunos de los extractos más activos se estudiaron químicamente con el fin de conocer la estructura de los compuestos responsables de la actividad, y finalmente realizar algunos derivados en busca de mejorar la actividad. Con lo anterior buscábamos establecer una quimioteca de compuestos activos que podrían ser utilizados en estudios de acoplamiento molecular –*Docking*- posteriores (capítulo 3 de esta tesis).

## 2.2 Materiales y métodos

Para la realización del ensayo de inhibición de la AChE se emplearon los siguientes reactivos: Acetilcolinesterasa (C. 3.1.1.7) de *Electrophorus electricus* (tipo VI-S 500 A), albúmina de suero bovina (BSA por sus siglas en inglés), Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris base), acetato de 1-naftilo y *Fast Blue Salt* (FBS), que fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El patrón positivo para el ensayo fue galantamina, obtenida a partir de tabletas de Reminyl<sup>TM</sup> (Janssen-Cilag, 16 mg) mediante extracción líquido-líquido, usando NaOH

al 10% y acetato de etilo, la pureza del compuesto aislado en la fase orgánica fue confirmada mediante CCD y prueba de alcaloides con reactivo de Dragendorff.

Para las extracciones (metanol (MeOH), y diclorometano (DCM)), purificaciones (hexano, acetato de etilo (AcOEt) y MeOH) y bioensayos se emplearon disolventes grado analítico de Merck, Sigma-Aldrich y Alfa-Aesar. La cromatografía en columna se realizó sobre Sílica gel 60 (0,040-0,063 mm; 230-400 mesh ASTM) de Merck y Sephadex LH-20 (30-100  $\mu\text{m}$ ) de Sigma-Aldrich. Los controles cromatográficos se llevaron a cabo en placas de CCD Sílica gel 60 F254 de 20 x 20 cm, usando como revelador sulfato cérico amónico al 1% en una mezcla ácido sulfúrico/metanol 2:8, y posterior calentamiento. Así mismo se usó el bioensayo por bioautografía de Martson (Marston et al. 2002) empleando las mismas placas de sílica, y usando el procedimiento que se describe más adelante.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Hidrógeno y Carbono fueron registrados en un equipo Bruker Avance de 400 MHz, usando cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) deuterado al 99.5% (Merck).

Los análisis por CG-EM fueron hechos en un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 series II, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5975B, a 70 eV. La inyección se hizo en modo *split* (15:1) a una temperatura de 260 °C, y mediante un inyector automático Agilent 6850 series. Se empleó una columna Agilent 19091S-433E HP-5MS 5% Fenil-Metilsiloxano; la rampa de temperatura utilizada fue iniciando con 100 °C por 1 minuto, seguido por un incremento de 20 °C por minuto durante 11 minutos hasta llegar a 320 °C, temperatura que se mantuvo durante 4 minutos. El detector se mantuvo a 280 °C. Los análisis de CLAE-EM de alta resolución fueron realizados en un equipo LCMS-IT-TOF (Shimadzu), con ionización por electrospray ESI; el flujo de nebulización fue de 1,5 L/min, el voltaje de la fuente de ionización fue 1,5 kV, y la temperatura del CDL fue de 250°C, se registraron iones entre 100 y 1000 u en modo positivo y negativo.

### **2.2.1 Organismos a estudiar**

Las muestras de octocorales, esponjas y cianobacterias fueron recolectadas en el mar Caribe colombiano, e identificadas por el Dr. Sven Zea y la Dra. Mónica Puyana (algunas

muestras aún se encuentran en proceso de identificación). El grupo de investigación cuenta con permiso de la autoridad ambiental para la recolección de estos organismos. Los voucher de cada especie identificada fueron depositados en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia y en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andrés” INVEMAR. Estas muestras fueron refrigeradas, y luego extraídas con una mezcla de DCM:MeOH 50:50. Los extractos crudos fueron concentrados a presión reducida para su posterior ensayo de inhibición de AChE. Los datos de colecta y clasificación se encuentran en la Tabla A.1 de los anexos.

### **2.2.2 Ensayo de inhibición de AChE**

*Solución enzimática:* La solución enzimática se preparó disolviendo 0,53 mg de AChE (Aldrich) en 1,0 mL de una solución de Tris-HCl 0.05 M a pH 7,8; y 1,0 mL de solución de BSA, la cual fue previamente preparada disolviendo 50 mg de BSA en 50 mL de una solución 0,05 M de Tris-HCl buffer pH 7,8.

*Solución reveladora:* se empleó una mezcla 1:4 de una solución de acetato de 1-naftilo en etanol (2,5 mg/mL) y FBS en agua (2,5 mg/mL). Esta mezcla se preparó inmediatamente antes de cada ensayo (Marston et al. 2002).

*Bioensayo:* Los extractos fueron disueltos en DCM (1 mg/ml) y se aplicó 0,1 mg de cada uno en las placas de CCD. Posteriormente, las muestras fueron eluidas en tres sistemas de disolventes diferentes (Hex:AcOEt en proporciones 8:2, 1:1 y 0:1) en búsqueda de un amplio rango de polaridad; seguido a esto, las placas fueron secadas y asperjadas con la solución enzimática preparada anteriormente. Las placas se dejaron en incubación por 5 minutos a temperatura ambiente (20 °C). Finalmente, fueron reveladas mediante aspersion con la solución reveladora, al cabo de 2-3 minutos aparece un color púrpura en la placa, y las zonas de inhibición como manchas de color blanco en caso de haber compuestos con actividad AChEI. En todas las placas se empleó como control positivo Galantamina (0,05 mg por aplicación aprox).

Para compuestos puros se usó el mismo procedimiento empleando 0,1 mg de compuesto por aplicación. Estos compuestos fueron aislados de los octocorales *Pseudoplexaura* sp. (OCP.94), *Eunicea kinghti* y *Pseudoplexaura flagellosa*.

### 2.2.3 Estudio químico de *Pseudoplexaura* sp. (OCP.94)

El octocoral OCP.94 (*Pseudoplexaura* sp) fue recolectado en la bahía de Santa Marta, Caribe colombiano, en diciembre de 2011 mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad de entre 9 y 20 m. La muestra (295 g) fue sometida a maceración con una mezcla de DCM:MeOH 50:50 (500 mL x 3), obteniendo el extracto crudo (29 g) de color oscuro después de concentrarlo a presión reducida. El extracto fue sometido a partición con DCM:H<sub>2</sub>O, obteniéndose un extracto orgánico (7.62 g) y otro acuoso (20,7 g). Ambas fracciones fueron analizadas en el bioensayo de AChEI, encontrando que la actividad se centraba en la fracción orgánica.

Una porción del extracto orgánico (4,35 g) fue fraccionada por cromatografía en columna (4 x 20 cm) sobre sílica gel, usando 400 mL de las siguientes mezclas hexano (100%), hexano-AcOEt (80:20 v/v), hexano-AcOEt (50:50 v/v), AcOEt (100%), AcOEt-MeOH (80:20 v/v) y MeOH (100 %). De acuerdo al comportamiento por CCD las fracciones fueron agrupadas en 8 (F1 a F8), y fueron controladas por RMN y evaluadas en el bioensayo.

La fracción F1 (0,38 g) es un aceite de color amarillo claro que no resultó activo en el bioensayo, y fue analizada por CG-EM lo que permitió observar la presencia de 4 compuestos (**3a**, **3b**, **3c** y **3d**). Adicionalmente, se le registraron los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C a la mezcla. Las fracciones F2 (0,15 g) y F3 (1,44 g) no mostraron actividad AChEI, y fueron analizadas por RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C. La fracción F4 (1,09 g) presentó una fuerte actividad AChEI; una porción de la fracción F4 (290 mg) fue fraccionada por CC sobre sílica gel (2,5 x 18 cm) usando una mezcla de DCM:AcOEt 7:3. Se obtuvieron 3 fracciones (F4.1-F4.3), siendo la fracción F4.2 (113 mg) fuertemente activa y corresponde al compuesto **1a**, mientras la fracción F4.3 (32,0 mg) fue fraccionada por CC, usando una mezcla de DCM:AcOEt (desde 9:1 a 1:1), obteniendo las 3 fracciones F4.3.1-F4.3.3. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C, lo que permitió obtener los compuestos **3e** (9,0 mg) y **3f** (6,0 mg). Las fracciones F5 (0,28

g) y F6 (0,17 g) no mostraron actividad AChEI, y también fueron analizadas RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ . Las fracciones restantes fueron muy poco abundantes y no se analizaron.

*Datos correspondientes de RMN, EMAR-ESI y CG-EM de los compuestos aislados.*

**Compuesto 1a.** 14-acetoxicrassina. Sólido blanco. EMAR-ESI (modo positivo)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  377,2153. Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se encuentran en la tabla 2.3.

**Compuesto 3a.**  $\alpha$ -copaeno. Tr 5,14 min. EM-IE  $m/z$  (intensidad relativa %). 204 (19,6), 161 (98,9), 119 (100,0), 103 (5,8), 91 (46,3), 81 (22,5), 78 (5,9), 41 (21,2).

**Compuesto 3b.**  $\beta$ -Cubebeno. Tr 5,22 min. EM-IE  $m/z$  (intensidad relativa): 204 (15,2), 161 (100,0), 147 (6,2), 119 (26,5), 105 (44,5), 91 (44,304), 81 (29,4), 41 (18,0).

**Compuesto 3c.**  $\beta$ -Copaeno. Tr 5,49 min. EM-IE  $m/z$  (intensidad relativa): 204 (9,7), 175 (0,4), 161 (100,0), 133 (12,8), 105 (36,0), 91 (31,1), 79 (15,8), 41 (12,4).

**Compuesto 3d.**  $\alpha$ -Muuroleno. Tr 5,93 min. EM-IE  $m/z$  (intensidad relativa): 204 (22,4), 161 (62,4), 133 (13,0), 119 (26,9), 105 (100,0), 91 (40,3), 81 (23,3), 67 (8,5), 55 (12,6), 41 (25,4).

## 2.2.4 Transformaciones químicas de compuestos bioactivos

### 2.2.4.1 Reacción de acetilación del compuesto 1a.

El compuesto **1a** (42 mg, 0,1 mmol) fue agitado en trietilamina (5,0 mL), anhídrido acético (100  $\mu\text{L}$ , 1,0 mmol) y una pequeña cantidad de DMAP (4-Dimetilaminopiridina) a temperatura ambiente durante 2 días. Luego fueron adicionados 400  $\mu\text{L}$  (4,0 mmol) de anhídrido acético. La reacción fue monitoreada por CCD (DCM:AcOEt 80:20), y se comprobó que al cabo de 5 días de iniciada ya no había más compuesto **1a**. Así, la reacción fue detenida mediante adición de 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , y la mezcla fue extraída con 50 mL de DCM. La fase orgánica fue lavada con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  en agua (10 mL); y con salmuera (10 mL). Finalmente, la fase orgánica fue secada sobre sulfato



de sodio anhidro, filtrado y concentrado a presión reducida. La mezcla de reacción (45 mg) fue separada por CC sobre sílica gel (18 x 0,5 cm) usando un sistema de DCM:AcOEt 70:30, y posteriormente por CC sobre Sephadex LH-20 (20 x 1 cm), utilizando metanol como eluyente. El compuesto obtenido es un líquido de color amarillo marrón (25 mg, 0,06 mmol, 60,0 % de rendimiento) y fue identificado como 4,14-diacetoxicrassina (**2**).

**Compuesto 2.** 4,14-diacetoxicrassina. Sólido blanco. EMAR-ESI (modo positivo)  $m/z$ : [M+Na] 441,1945. RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  ver tabla 2.4.

#### 2.2.4.2 Reacción de reducción del compuesto **1a**

El compuesto **1a** (40 mg, 0,11 mmol) fue disuelto en 5 mL de THF seco, y agitado durante 5 minutos, seguido por la adición de  $\text{LiAlH}_4$  (25 mg, 0,67 mmol). La reacción fue realizada a temperatura ambiente por 12 horas, monitoreada por CCD (DCM:AcOEt 70:30). La reacción fue finalizada mediante una adición de 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; el producto de reacción fue sometido a extracción líquido-líquido usando DCM (20,0 mL x triplicado). La fase orgánica fue concentrada al vacío, luego el producto obtenido fue purificado mediante CC en sílica gel (0,5 x 4,0 cm), usando mezclas de DCM: AcOEt desde 9:1 hasta 1:1. El producto (20 mg) obtenido fue analizado mediante RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

#### 2.2.5 Análisis semicuantitativo

Los cembranos a ensayar fueron disueltos en AcOEt a una concentración de 10; 1; y 0,1 mg/mL. Luego se aplicaron sobre una placa de gel de sílica los microlitros necesarios, con ayuda de una micropipeta marca LabMate Soft de 1-10  $\mu\text{L} \pm 0,5 \mu\text{L}$ , para obtener 50; 10; 1; y 0,1  $\mu\text{g}$  por punto de aplicación. El ensayo se hizo por duplicado guardando una distancia de 1 cm entre cada aplicación. Posteriormente, se asperjaron las soluciones enzimática y reveladora en la misma forma descrita antes. Se usó como control positivo y compuesto de referencia la galantamina en las mismas cantidades usadas para los cembranos.

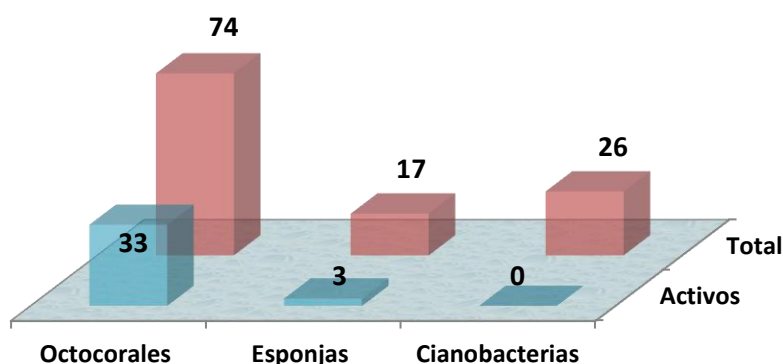
## 2.3 Resultados y Discusión

Los productos naturales han mostrado ser una fuente muy importante de compuestos con actividad biológica, particularmente para tratamientos contra el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades de alto impacto (Newman et al. 2012). Las principales fuentes de estos compuestos han sido las plantas y los microorganismos; sin embargo, en los últimos 30 años los organismos marinos han demostrado ser también una fuente promisoría de compuestos con aplicaciones en la industria cosmética, en química fina, agroquímicos y agente terapéuticos para el tratamiento de varios tipos de enfermedades (Gerwick et al. 2012, Leal et al. 2012). Estos antecedentes han mostrado el potencial de los productos naturales marinos como fuente de compuestos bioactivos; sin embargo, el estudio en cuanto a inhibidores de AChE no ha sido tan sistemático, y sólo se encuentran unos pocos estudios en la literatura, lo que está en contravía con lo realizado para extractos de plantas, donde hay una gran cantidad de información.

Gracias a todo este enorme potencial, en este trabajo decidimos abordar el problema desde una perspectiva más sistemática, y así estudiar un gran número de muestras, analizando 117 extractos procedentes de octocorales (74), esponjas (17) y matts de cianobacterias (26), mediante el ensayo de inhibición de AChE desarrollado por Marston y colaboradores (Marston et al. 2002), con el fin de identificar extractos que contuviesen compuestos con actividad inhibitoria. Así, haciendo uso de esta técnica bioautográfica y empleando tres sistemas de eluentes (baja, media y alta polaridad), pudimos juzgar la capacidad inhibitoria de los compuestos de diferente polaridad contenidos en el extracto.

Decidimos estudiar octocorales y esponjas porque ya existen reportes de que estos organismos puede producir compuestos con esta actividad, tal y como se ilustró en la introducción. De otro lado, si bien para las cianobacterias no se ha reportado esta actividad, ellas han mostrado ser una fuente muy importante de compuestos bioactivos principalmente compuestos con actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas, y toxinas de interés ambiental (Tan 2010), por lo que evaluar sus extractos como inhibidores de la AChE parecía ser prometedor.

Los resultados del ensayo mostraron que los organismos con mayor número de extractos bioactivos fueron los octocorales, seguidos de las esponjas, mientras los extractos procedentes de los matts de cianobacterias no mostraron actividad (Figura 2.1). En el caso de los octocorales, 33 de los 74 ensayados fueron positivos al ensayo (el 45 %), mientras que en el caso de las esponjas 3 extractos dieron positivo de los 17 ensayados (18 %); este resultado muestra a los octocorales como los más promisorios como fuente de inhibidores de la AChE (figura 2.1). La tabla de resultados para cada organismo se puede consultar en el anexo electrónico (Tabla A.1) así como las fotografías de los ensayos (Figura A.1)<sup>1</sup>

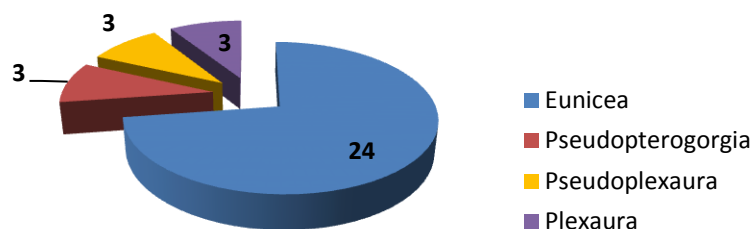


**Figura 2.1** Resultados del ensayo de inhibición de AChE de los extractos de organismos marinos del Caribe Colombiano agrupados por taxones.

Un análisis más cercano de los resultados muestra que los extractos de los octocorales de los géneros *Eunicea* son los más promisorios, seguidos de los géneros *Pseudopterogorgia*, *Pseudoplexaura* y *Plexaura* (tabla 2.2, figura 2.2), y todos estos gorgónidos son reconocidos por producir diterpenos (Berrue et al. 2009). En cuanto a las esponjas se pudo observar que alrededor del 18 % de los extractos ensayados fueron positivos al ensayo de inhibición, resaltando las especies del género *Xestospongia* y *Iotrochota* como los organismos promisorios como fuente de inhibidores AChE; las esponjas del género *Xestospongia* han sido fuente de compuestos tipo piridoacridinas, con actividad anticancerígena (Tasdemir et al. 2001), mientras las esponjas del género

<sup>1</sup> Algunos de los ensayos con extractos de invertebrados marinos fueron realizados durante el desarrollo de mi trabajo de grado como químico en el 2011.

*Iotrochota* han presentado compuestos tipo aminoácido con actividad antitripanosoma (Feng et al. 2012).



**Figura 2.2** Géneros de octocorales cuyos extractos dieron positivo al ensayo de inhibición de la AChE, los números corresponden a los extractos activos en el bioensayo.

**Tabla 2.2** Extractos más activos en el ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa

Nombre <sup>1</sup>	Voucher N°	Procedencia	Resultado <sup>1</sup>
<i>Eunicea</i> sp (Muestra NN Morro)	-	El Morro, Santa Marta (Col)	++
<i>Eunicea</i> sp (Muestra N° 84-9)	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
<i>Eunicea</i> sp (Muestra N° 90)	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
<i>Pseudoplexaura</i> sp (Muestra OCP94)	-	Bahía Taganga, Santa Marta (Col)	+++
<i>Eunicea knighti</i>	ICN-MHN-CO 0106	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
<i>Pseudopteroorgia elisabethae</i> (San Andrés)	INV-CNI 1615-1616	Providencia y San Andrés (Col)	++
<i>Pseudopteroorgia elisabethae</i> (Providencia)	INV-CNI 1612-1614	Providencia y San Andrés (Col)	++
<i>Plexaura homomalla</i>	ICN-MHN-PO 0256	San Andrés (Col)	++
<i>Eunicea laciniata</i> (STA 7)	ICN-MHN-CR-106	Santa Marta (Col)	++
<i>Eunicea</i> sp.(65, 66, 67)	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
<i>Eunicea</i> sp.( Muestra N° 1)	-	Providencia (Col)	+++
<i>Eunicea succinea</i> (Muestra N° 2)	ICN-MHN-PO 0251	Providencia (Col)	++
<i>Eunicea fusca</i> (Muestra N° 4)	ICN-MHN-PO 0252	Providencia (Col)	+++
<i>Eunicea flexuosa</i> (Muestra N° 7)	-	Providencia (Col)	+++
<i>Pseudopteroorgia</i> sp. (Muestra N° 10)	-	Convento, Providencia (Col)	++
<i>Eunicea</i> sp (Muestra N° 11, gricesita)	-	Providencia (Col)	+++
<i>Eunicea</i> sp (Muestra N° 18)	-	Convento, Providencia (Col)	+++
<i>Eunicea bipinnata</i> (Muestra N° 21)	-	Convento, Providencia (Col)	++
<i>Xestospongia próxima</i>	ICN-MHN-PO 0239	Islas del Rosario (Col)	+++
<i>Iotrochota inminuta</i> (tinta)	INV-POR-883	Santa Marta (Col)	++
<i>Xestospongia carbonaria</i>	ICN-MHN-PO 0244	Islas del Rosario (Col)	++

<sup>1</sup> El nombre en paréntesis se refiere a la codificación interna del grupo de marinos <sup>2</sup> Las cruces corresponden al resultado cualitativo del ensayo tomando como referencia el resultado obtenido con la galantamina que corresponde a ++++ en esta escala. (-) corresponde a actividad nula.

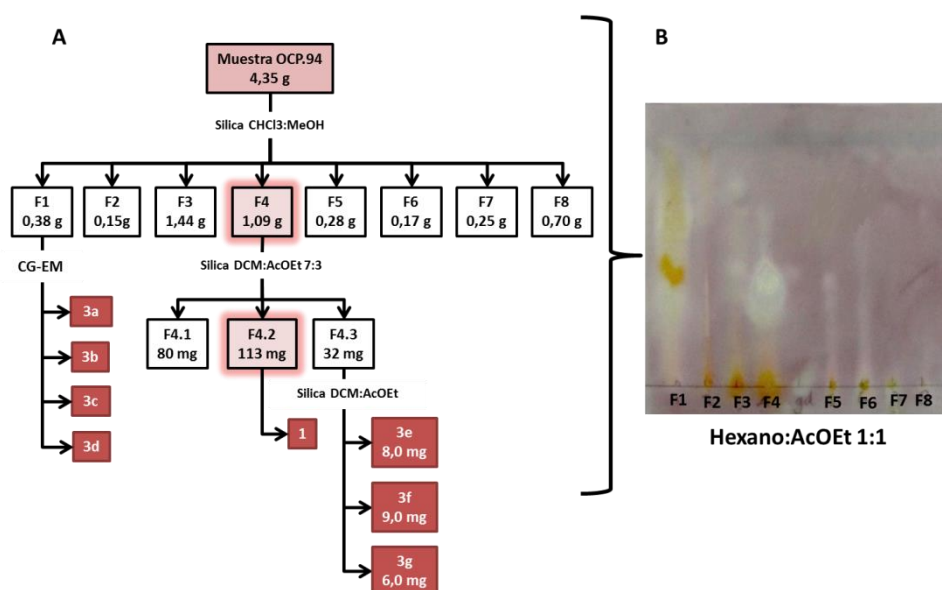
Todo lo anterior muestra el gran potencial de los octocorales como fuente de inhibidores de AChE (Tabla 2.2), siendo el género *Eunicea* la fuente de los extractos más activos; la mayoría de estos organismos son productores de metabolitos secundarios tipo diterpeno, al igual que los octocorales del género *Pseudoplexaura* (Rodríguez 1995), y contienen compuestos con estructuras del tipo briaranos, cembranos, dolabelanos, entre otros (Berrue et al. 2009), los cuales pueden ser los responsables de la actividad de inhibición de la AChE.

### **2.3.1 Estudio químico de *Pseudoplexaura* sp. (OCP.94)**

El extracto del octocoral OCP.94 (*Pseudoplexaura* sp)<sup>2</sup> fue seleccionado para su estudio químico por ser uno de los más activos en el bioensayo, y porque mostró tener prácticamente un sólo compuesto responsable de dicha actividad, a juzgar por su perfil en CCD (solo una mancha daba inhibición, en los tres sistemas cromatográficos ensayados). Así, la fracción orgánica fue sometida a CC sobre sílica gel obteniendo ocho fracciones (figura 2.3A) que fueron evaluadas en el bioensayo, encontrando que sólo la fracción F4 era activa (figura 2.3B), por lo que se procedió a purificarla obteniendo un sólido blanco (compuesto **1a**) que fue analizado espectroscópicamente como se indica a continuación. Este compuesto fue mostró una actividad similar a la galantamina, el control positivo en el ensayo de inhibición de AChE.

---

<sup>2</sup> En la actualidad la Dra Mónica Puyana, profesora de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, está trabajando en la identificación de la especie, y de las otras muestras que no están totalmente caracterizadas



**Figura 2.3 A)** Diagrama de fraccionamiento de la muestra OCP.94, el color rojo alrededor de las cajas indica resultado positivo al ensayo de inhibición de AChE; los cuadros rojos corresponden a los compuestos obtenidos. **B)** Foto del ensayo de inhibición de AChE de las fracciones obtenidas, comparado con la galantamina (gal).

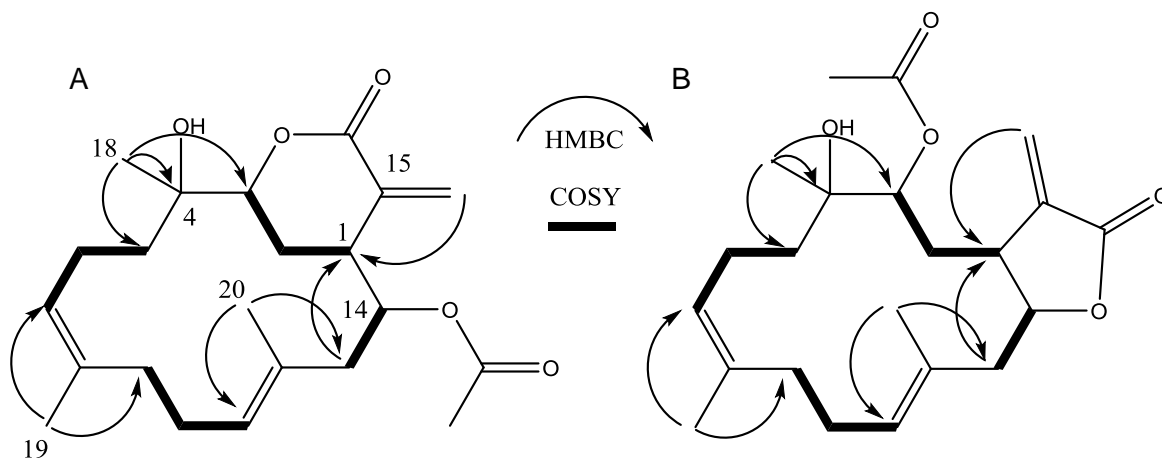
El espectro de masas EMAR-ESI(+) de **1a** mostró un ion en  $m/z$  377,2153 correspondiente al ión *pseudomolecular*  $[M+H]^+$  lo que permitió asignar la fórmula molecular de **1a** como  $C_{22}H_{32}O_4$  (error 46 ppm) lo que es congruente con un diterpeno con un grupo acetato. La presencia de 22 señales en RMN  $^{13}C$  (Figura A.3) confirma lo anterior, y muestra la presencia de tres dobles enlaces, uno de ellos exocíclico ( $\delta_C$ : 136,7; 135,6; 130,8; 128,3; 128,0 y 125,3 ppm); dos carbonos carboxílicos, uno del grupo acetilo y el otro de un éster  $\alpha,\beta$ -insaturado ( $\delta_C$ : 170,6 y 167,4 ppm, respectivamente); y tres carbonos oxigenados ( $\delta_C$ : 82,3; 74,2; y 73,4 ppm), incluyendo dos metinos y un carbono cuaternario (Crews et al. 2010). El espectro de RMN  $^1H$  (Figura A.2) mostró la presencia de dos protones olefínicos en  $\delta_H$  5,36 (ddd,  $J = 11,4; 5,4; 2,8$  Hz; 1H) y 5,23 (dd,  $J = 10,2; 4,9$  Hz, 1H); y dos protones de un metileno olefínico exocíclico en  $\delta_H$  6,43 (d;  $J = 2,3$  Hz; 1H) y 5,66 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H). También se puede observar la presencia del metilo del grupo acetato ( $\delta_H$ : 1,93, s, 3H), y de tres metilos adicionales en  $\delta_H$  1,69 (s, 3H); 1,58 (s, 3H) y 1,39 (s, 3H) (Crews et al. 2010). En resumen el compuesto **1a** es un diterpeno que presenta un grupo acetato, un éster  $\alpha,\beta$ -insaturado, dos dobles enlaces trisustituidos, y un grupo hidroxilo.

**Tabla 2.3** Asignación de desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **1a**.

N <sup>o</sup> C/N <sup>o</sup> H	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	37.4	2.67 (ddd, $J = 12.2, 6.4, 2.6$ Hz, 1H)
2	20.9	2.18 (m, 1H) 1.81 (m, 1H)
3	82.3	3.92 (dd, $J = 11.3, 1.0$ Hz, 1H)
4	74.2	-
5a	38.7	1.88 (m, 1H)
5b		1.63 (m, 1H)
6a	24.1	2.25 (m, 1H)
6b		2.06 (m, 1H)
7	125.3	5.05 (bt, $J = 7.8$ Hz, 1H)
8	135.6	-
9a	40.1	1.90 (m, 1H)
9b		2.22 (m, 1H)
10	22.1	2.32 (m, 1H), 1.73 (m, 1H)
11	128.3	5.23 (dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz, 1H)
12	130.8	-
13a	41.6	2.46 (dd, $J = 12.8, 5.0$ Hz, 1H)
13b		2.08 (m, 1H)
14	73.4	5.36 (ddd, $J = 11.4, 5.4, 2.8$ Hz, 1H)
15	136.7	-
16	167.4	-
17a	128.0	6.43 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H)
17b		5.66 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H)
18	24.8	1.39 (s, 3H).
19	14.6	1.58 (s, 3H)
20	14.9	1.69 (s, 3H)
21	170.6	-
22	21.0	1.93 (s, 3H)

Mediante el uso de los experimentos HSQC (Figura A.4) y COSY (Figura A.6) se identificaron tres sistemas de espín como se ilustra en la figura 2.4; y quedaron sin asignar tres metilos, un grupo acetato y un exometileno. Cada uno de los sistemas de espín se unieron mediante el análisis del espectro HMBC (Figura A.5), siendo las correlaciones claves las de los protones H<sub>3</sub> en 1,39 ppm con los carbonos en  $\delta_{\text{C}}$  82,3 (C, C-3); 74,2 (C, C-4) y 38,7 (CH<sub>2</sub>, C-5) lo que permitió conectar al metilo H<sub>3</sub>-18 con el carbono cuaternario C-4 y a este con sus vecinos C-3 y C-5. Así mismo, se pudo establecer la posición de los metilos sobre doble enlace por las correlaciones entre H<sub>3</sub>-19 en 1,58 ppm con las señales en  $\delta_{\text{C}}$  135,6 (CH, C-8), 125,3 (CH, C-7) y 40,1 (CH<sub>2</sub>, C-9); y la del H<sub>3</sub>-20 en 1,69 ppm con las señales en  $\delta_{\text{C}}$  130,8 (CH, C-12), 128,3 (CH, C-11) y

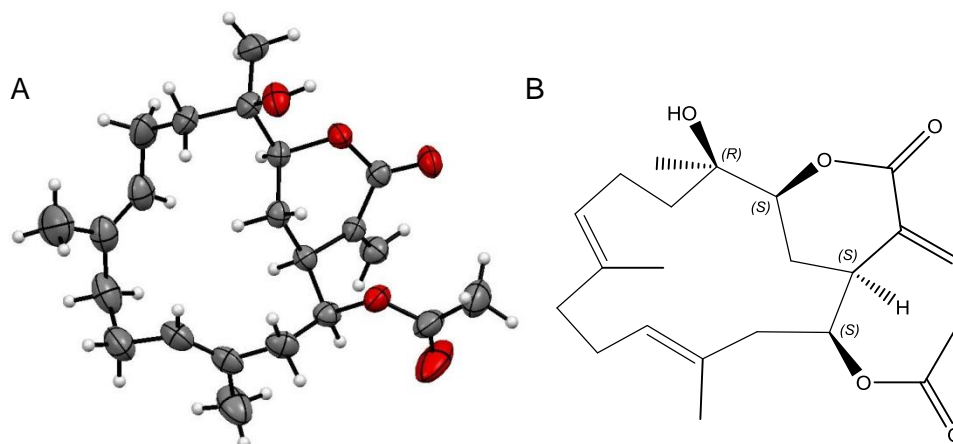
41,6 (CH<sub>2</sub>, C-13).(Tabla 2.3). La ausencia de correlaciones en HMBC entre H-3 y los carbonos del carboxilo del acetato o de la lactona; y la misma ausencia de correlación entre H-14 y los carboxilos de lactona y acetato no nos permiten diferenciar entre las dos estructuras propuestas en la figura 2.4.



**Figura 2.4** Estructuras propuestas para el compuesto **1** y los sistemas de spin determinados por COSY y HSQC, así como principales correlaciones de HMBC

La búsqueda de estas estructuras en la base de datos Antimarin (Blunt et al. 2013), sugirió que el compuesto elucidado corresponde al cembrano conocido como styelólido (**1b**), que corresponde a la estructura B de la figura 2.4. El cual había sido previamente aislado del tunicado *Styela plicata*, recolectado en las costas de Florida (EUA) por Wasylyk (Wasylyk et al. 1989), y cuyos datos espectroscópicos se corresponden de manera idéntica a lo encontrado por nosotros experimentalmente. En este trabajo el styelólido había sido aislado de la glándula digestiva del tunicado, el cual basa su alimentación en octocorales, por lo que se puede deducir que este cembrano fue adquirido por el tunicado mediante a dieta y no por su síntesis *de novo*.





**Figura 2.5** A) Diagrama ORTEP del compuesto **1**. B) estructura del 14-acetoxicrassina (**1a**)

Tomando ventaja que el compuesto elucidado cristalizaba, los monocristales fueron analizados por difracción de rayos X obteniendo el diagrama ORTEP que se ilustra en la figura 2.5A. Sorprendentemente la estructura coincide con la propuesta A de la figura 2.4., y no con el styelólido (**1b**), lo que sugiere que la elucidación de Wasylyk (Wasylyk et al. 1989) fue incorrecta, y que en este trabajo de maestría corregimos la estructura. Así, la estructura del compuesto elucidado corresponde al 14-acetoxicrassina (**1a**) (figura 2.5 B), aislado por primera vez en 1960 por Cierezsko et al, a partir del extracto de *Pseudoplexaura porosa*; posteriormente se sugirió que su origen se debe a la asociación entre la zooxantela y el gorgónido, aunque sea responsabilidad de la primera (Rice et al. 1970, Papastephanou et al. 1982). En cuanto a los datos de RMN del acetato de crassina no se encontraron reportes; sin embargo, los datos de RMN de la crassina sin acetilar presentaron similitudes en desplazamiento de RMN  $^{13}\text{C}$ , con diferencia relativamente grandes respecto al C-1 y C-15 (McMurry et al. 1990). Este compuesto posee actividad antitumoral (Weinheimer et al. 1975, Burres et al. 1989), e inmunosupresiva (Matsushima et al. 2009), por lo que ha despertado el interés de múltiples químicos sintéticos (McMurry et al. 1990).

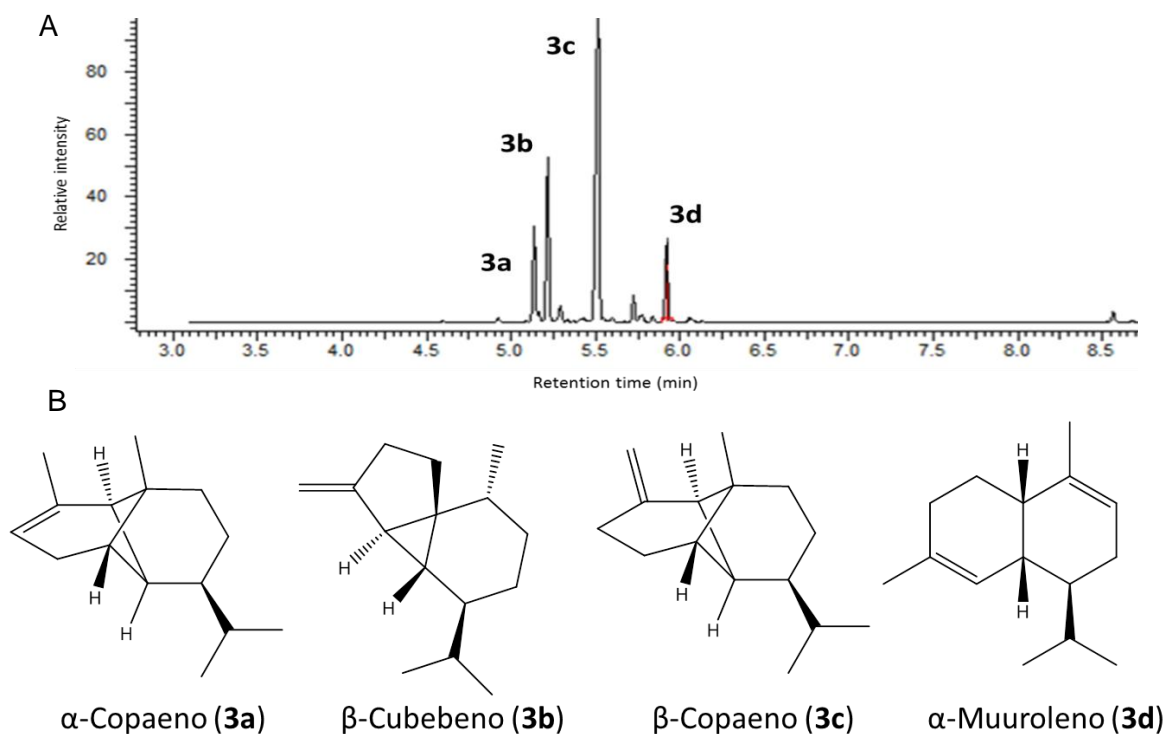
A partir de la fracción F4, además del compuesto **1a**, también se aislaron dos compuestos que eluyen de manera muy cercana a **1a**, pero que no presentaron actividad de inhibición. Su separación se llevó cabo por CC sobre sílica gel (Figura 2.3A), y sus espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  muestran la presencia de una serie de compuestos relacionados

entre sí. Los espectros de RMN del compuesto **3g** (Figura A.7) muestran que se trata de un compuesto polihidroxiado (señales para metino entre 60-75 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$ ), con varios grupos acetálicos señales entre 90 y 100 ppm en RMN  $^{13}\text{C}$ , y entre 4,5 y 5,5 ppm en RMN  $^1\text{H}$ ) lo que sugiere la presencia de varias unidades de azúcar. Así mismo, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan señales para metilos entre 20-25 ppm, lo que sugiere la presencia de deoxiazúcares, como la fucosa por ejemplo, también se observan señales entre  $\delta_{\text{C}}$  35 y 45 que pueden asignarse a carbonos unidos a nitrógeno. Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de **3e** y **3f**, resultan ser muy similares pero tienen la presencia de un gran número de señales en torno de 29 ppm y 128 ppm, así como una en 170 ppm, todo lo que sugiere la presencia de una cadena de ácido graso insaturado unida a estos azúcares (Figura A.8 y A.9). La búsqueda de compuestos con estas características en Antimarin no arrojó coincidencias del 100%, pero sugiere la presencia de compuestos del tipo triglicósido, correspondientes a aminoazúcares, pero que sólo se han aislado de bacterias. La poca cantidad de cada uno de estos compuestos junto con la no actividad en el ensayo, nos llevaron a no seguir caracterizándolos.<sup>3</sup>

La fracción inactiva F1 fue analizada por CG-EM y según el cromatograma obtenido (Figura 2.6A) se identificaron cuatro compuestos principales (**3a-3d**). Los espectros de masas de cada uno de los compuestos (Figura A.10) sugieren la presencia de sesquiterpenos no oxigenados. Estos espectros fueron comparados con los reportados en la base de datos NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>) y ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) y son iguales con los reportados para el  $\alpha$ -Copaeno (**3a**),  $\beta$ -Cubebeno (**3b**),  $\beta$ -Copaeno (**3c**), y  $\alpha$ -Muuroleno (**3d**) (Figura 2.6B). Para confirmar la presencia de estos compuestos se le registraron los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  a la mezcla (Figuras A.11), y se pudieron identificar todas y cada una de las señales reportadas en RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  para estos compuestos (Joulain et al. 1998).

---

<sup>3</sup> No obstante los compuestos deben corresponder a compuesto no antes reportados en la naturaleza, por lo que su estudio será atendido por investigadores del grupo de investigación en el desarrollo de otros trabajos.



**Figura 2.6** A) Cromatograma de gases obtenido de la fracción F1; B) Estructuras de los compuestos obtenidos de la fracción F1 por GC-MS

La fracción no activa F2 fue analizada por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figuras A.12) encontrando que se trata de una mezcla de ácidos grasos. La fracción F3 fue analizada también por RMN  $^1\text{H}$ , y se pudo observar presencia del compuesto **1a** en poca cantidad más compuestos de tipo lipídico no identificados (Figura A.13). Las fracciones F5 y F6 fueron analizadas por RMN (Figura A.14) mostrando que no presentan compuestos de tipo diterpeno, y mostrando la presencia de un gran número de metilenos, lo que sugiere la presencia de grasas. Por no identificar terpenoides en estas fracciones, y por no ser activas tampoco, no se continuó con el estudio de ninguna de ellas.

### 2.3.1.1 Obtención de derivados

Aprovechando que el compuesto bioactivo **1a** se aisló en gran cantidad (centenas de mg), se buscó usarlo como base para obtener derivados con posible aumento en la actividad de inhibición. Las reacciones realizadas fueron realizadas de acuerdo a las posibilidades que presenta la estructura obtenida, y tan solo de manera exploratoria.<sup>4</sup>

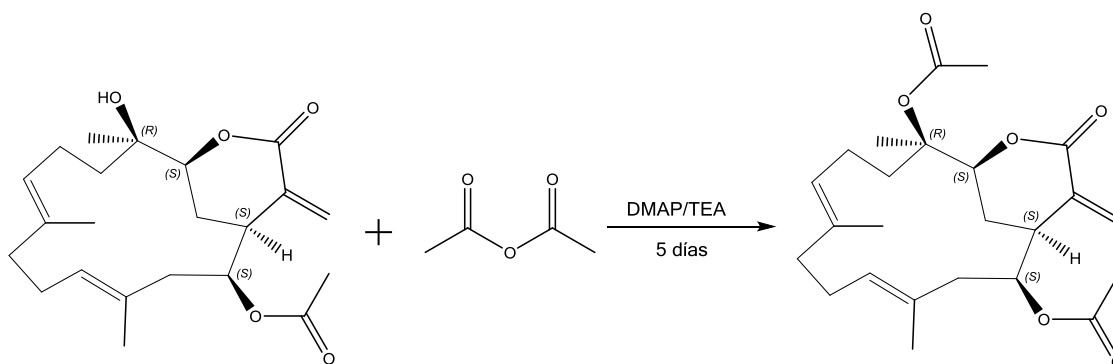
La primera reacción realizada fue una acetilación al hidroxilo terciario presente en la posición 4 de la estructura del compuesto **1a** (Figura 2.7), el alto impedimento estérico de la posición era un reto sintético, por lo que se buscaron en la literatura las condiciones de reacción para alcoholes terciarios encontrando un reporte de Xu y colaboradores en el 2005 (Xu et al. 2005). Esta reacción fue realizada con anhídrido acético, y catalizada por DMAP (4-Dimetilaminopiridina) en trietilamina (TEA), a temperatura ambiente monitoreando continuamente por CCD. El producto obtenido (compuesto **2**) fue analizado por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (figuras A.15 y A.16) observándose la aparición de dos señales nuevas, una en  $\delta_c$  170,3 ppm, correspondiente al carboxilo del acetato, y otra en  $\delta_c$  20,7 ppm correspondiente al metilo del grupo acetato. Además, se pudo verificar el cambio en el desplazamiento químico de C-4 de  $\delta_c$  74,2 a 84,7 ppm gracias a la sustitución del grupo hidroxilo por el grupo acetato (Crews et al. 2010). Todo lo anterior confirma la acetilación del compuesto en C-4. Los análisis por espectrometría de masas mostraron un ión en  $m/z$  441,1945 que corresponde a  $[M+Na]^+$  que concuerda con la fórmula esperada para el compuesto acetilado **2**. La asignación de los espectros de RMN para **2** se encuentra en la Tabla 2.4. En el ensayo de inhibición de AChE en CCD, este compuesto acetilado no presentó actividad inhibitoria.

---

<sup>4</sup> Un trabajo de semisíntesis con este compuesto se está iniciando dentro del grupo de investigación

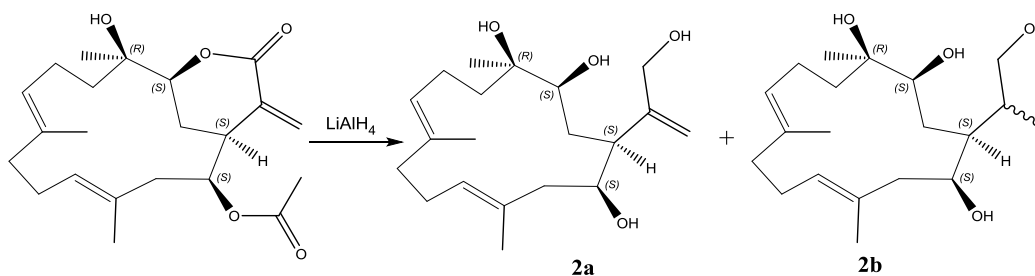
**Tabla 2.4** Asignación de desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **2**.

N $^{\circ}\text{C}/\text{N}^{\circ}\text{H}$	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	37.6	2.68 (ddd, $J = 11.6, 5.4, 2.5$ Hz, 1H)
2a	22.0	-
2b	-	-
3	82.1	3.90 (bd, $J = 11.0$ Hz, 1H)
4	84.7	-
5 a	35.1	-
5b	-	-
6 a	24.2	-
6b	-	-
7	125.3	5.08 (bt, $J = 7.9$ Hz, 1H)
8	136.1	-
9 a	40.0	-
9b	-	-
10	21.2	-
11	128.3	5.27 (m, 1H)
12	130.3	-
13 a	41.7	-
13b	-	-
14	72.8	5.42 (ddd, $J = 11.5, 5.2, 2.6$ Hz, 1H)
15	136.5	-
16	167.1	-
17 a	128.1	6.50 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H)
17b-	-	5.70 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H)
18	22.7	1.74 (s, 3H)
19	14.9.	1.59 (s, 3H)
20	15.0,	1.71 (s, 3H)
21	170.6	-
22	21.1	1.98 (s, 3H)
23	170.3	-
24	20.7	2.03 (s, 3H)



**Figura 2.7** Reacción de síntesis de **2** por acetilación de **1a**

El compuesto **1a** también fue tratado con el reductor  $\text{LiAlH}_4$ , con el fin de reducir tanto la lactona como el grupo acetato (Wojtkielewicz et al. 2007). La purificación por CC de la mezcla de reacción permitió recuperar un producto con un  $r_f$  inferior al de **1a**, y cuyo espectro de masas muestra un ion en  $m/z$  377,2149, que corresponde a  $[\text{M} + \text{K}]^+$  y es consistente con un compuesto de fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$ , tal y como se esperaba para el producto de reacción **2a** (figura 2.8). No obstante, al registrar el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (Figura A.17) se pudo observar que al menos hay tres compuestos obtenidos de la reacción de reducción, se pueden observar señales  $\delta_c$  151,9 (c) y 114,9 ( $\text{CH}_2$ ) que corresponden al doble enlace exocíclico de **2a**, así mismo se observa la aparición de varias señales en  $\delta_c$  65,3; 65,3; 68,1 lo que es consistente con el metileno oxigenado producto de la reducción de la lactona. Finalmente, la aparición de metilos entre  $\delta_c$  10 y 25 ppm, indican que el doble enlace conjugado también fue reducido por una adición 1,4 del hidruro al sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado (Clayden et al. 2012) dando la mezcla de diastereoisómeros **2b**. La poca cantidad de producto no hizo posible la separación. En cuanto al ensayo de inhibición, el producto de reacción presentó actividad similar a la galantamina.



**Figura 2.8.** Reacción de reducción de **1a**.

### 2.3.2 Identificación de los compuestos responsables de la inhibición en otras especies de octocorales

El estudio químico anterior, nos permitió identificar al cembranoide acetato de crassina como un compuesto con potente actividad AChEI, mostrando una actividad similar a la galantamina. De otro lado, los otros extractos bioactivos habían sido obtenidos de octocorales productores de diterpenos, como lo son los géneros *Eunicea*, y *Pseudoplexaura* (Tello et al. 2011). Es más, los extractos de estos organismos presentan perfiles en CCD similares al presentado por el organismo OCP.94, donde los  $r_f$  de compuestos bioactivos (manchas blancas) son de mediana polaridad y presentan un  $r_f$  similar al de **1a**. Por lo anterior se realizaron ensayos de inhibición con algunos de los compuestos puros aislados en nuestro laboratorio a partir de *Eunicea knighti*, *Eunicea fusca*, *Plexaura homomalla* y *Pseudoplexaura flagellosa* y para los que se había reportado actividad inhibitoria del *Quorum sensing*, *antiinflamatoria* y *antifouling* (Tello et al. 2009, Reina et al. 2011, Tello et al. 2011, Tello et al. 2012, Reina et al. 2013). Los resultados del bioensayo mostraron que los cembranos ensayados presentaron actividad inhibitoria (Tabla 2.5), y en algunos casos ésta resultó ser similar a la obtenida para la galantamina.

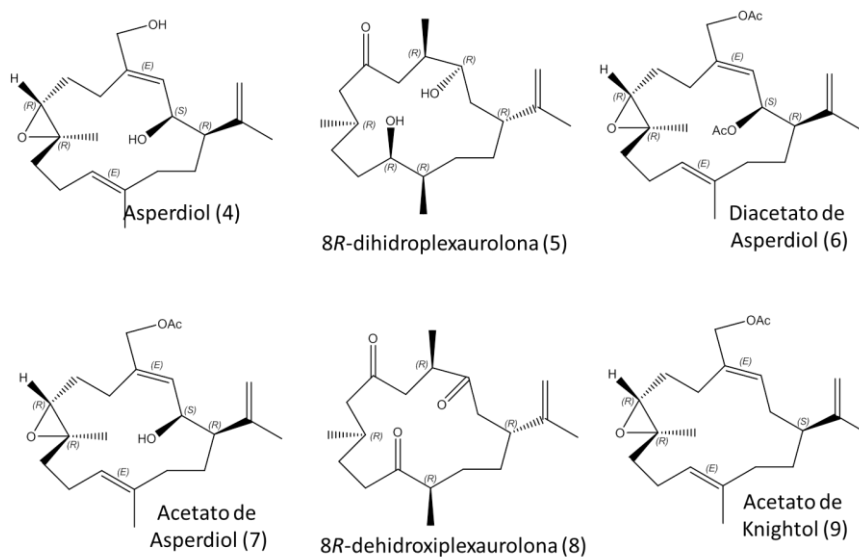
Los compuestos ensayados se pueden agrupar en tres clases, cembranos, derivados del fuscól, y protaglandinas. Los cembranos resultaron ser los más activos, siendo el asperdiol (**4**) más activo que la galantamina, y con una actividad similar a la presentada por el compuesto **1a**, los derivados acetilados del asperdiol (compuestos **6** y **7**) también resultaron ser fuertemente bioactivos, pero no mejores que **4**; así mismo el acetato de knightol (**9**) resultó ser muy activo. De otro lado, la 8*R*-dihidroplexaurolona (**5**), aislada de *Pseudoplexaura flagellosa*, también presentó una actividad fuerte seguida por la 8*R*-dehidroxiplexaurolona (**8**) (Figura 2.9). Los otros cembranoides ensayados mostraron actividad media; sin embargo, cabe resaltar que la 8*S*-dehidroplexaurolona (**10**), 8*S*-dehidroxiplexaurolona (**11**), 8*R*-dehidroxiplexaurolona (**12**), 8*S*-plexaurolona (**13**), 8*R*-plexaurolona (**14**), 8*S*-dihidroplexaurolona (**15**), knightal (**16**) y knightol (**17**) (figura 2.10) pueden usarse como compuestos base para la obtención de derivados con actividad mejorada.

**Tabla 2.5** Resultados del ensayo de inhibición de AChE con compuestos aislados de octocorales recolectados del caribe colombiano.

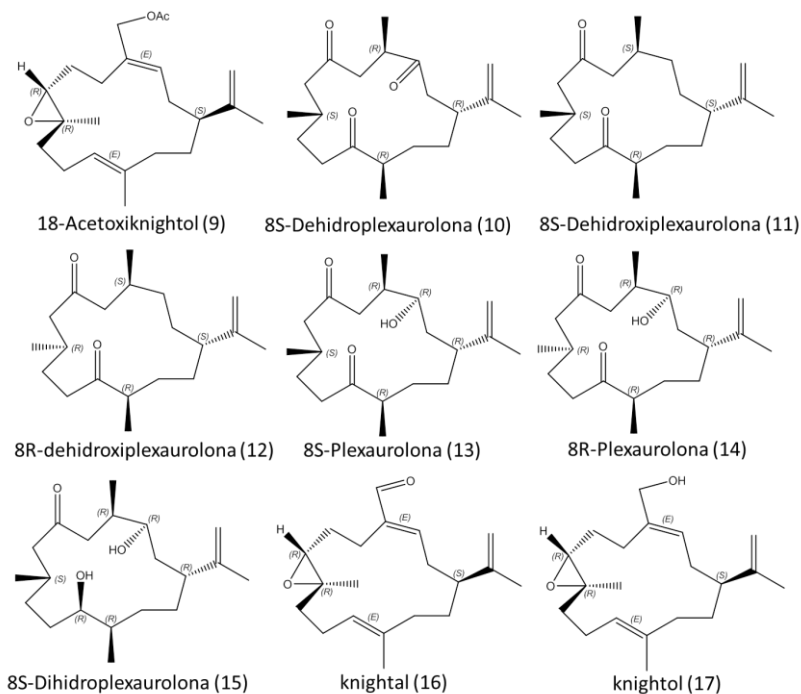
Tipo de compuesto	Compuesto ensayado	Resultado <sup>1</sup>	Organismo del que se aisló	
<b>Cembranos</b>	Acetato de crassina ( <b>1a</b> )	+++++++	<i>Pseuoplexaura</i> sp	
	Asperdiol ( <b>4</b> )	+++++++	<i>Eunicea knighti</i>	
	8R-dihidroplexaurolone ( <b>5</b> )	+++++	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	Acetato de asperdiol ( <b>7</b> )	++++	<i>Eunicea knighti</i>	
	Asperdiol diacetilado ( <b>6</b> )	+++++	<i>Eunicea knighti</i>	
	8R-dehidroxiplexaurolona ( <b>8</b> )	+	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	18-acetoxiknightol ( <b>9</b> )	+++	<i>Eunicea knighti</i>	
	8S-dehidroplexaurolona ( <b>10</b> )	++	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	8S-dehidroxiplexaurolona ( <b>11</b> )	++	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	8R-dehidroxiplexaurolona ( <b>12</b> )	+++	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	8S-plexaurolona ( <b>13</b> )	+	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	8R-plexaurolona ( <b>14</b> )	+	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	8S-dihidroplexaurolona ( <b>15</b> )	++	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	
	knightal ( <b>16</b> )	+	<i>Eunicea knighti</i>	
	knightol ( <b>17</b> )	+	<i>Eunicea knighti</i>	
	<b>Fuscoles</b>	Fuscol	++	<i>Eunicea fusca</i>
		Fuscósido B	+++	<i>Eunicea fusca</i>
<b>Prostaglandinas</b>	(15R)-Ac.PGA <sub>2</sub> Me (éster metílico, acetilado en C-15)	+ <sup>2</sup>	<i>Plexaura homomalla</i>	
	(15R)-PGA <sub>2</sub>	-	<i>Plexaura homomalla</i>	
	(15R)-AcPGA <sub>2</sub> (acetato en C-15)	+++ <sup>2</sup>	<i>Plexaura homomalla</i>	
	(15R)-PGA <sub>2</sub> Me (éster metílico)	+ <sup>2</sup>	<i>Plexaura homomalla</i>	
	PGB <sub>2</sub> (tromboxano B <sub>2</sub> )	++++ <sup>2</sup>	<i>Plexaura homomalla</i>	
	15-deoxi-Δ <sup>15</sup> -PGB <sub>2</sub> Me (éster metílico)	++ <sup>2</sup>	<i>Plexaura homomalla</i>	
	(15R)-MePGB <sub>2</sub> Me (éster metílico en 15, metiléter)	+++ <sup>2</sup>	<i>Plexaura homomalla</i>	
PGE <sub>2</sub>	-	<i>Plexaura homomalla</i>		
<b>Dolabelanos</b>	(1R,3E,7E,11S)-13-ceto-dolabela-3,7(18)-trieno ( <b>65</b> )	-	<i>Eunicea laciniata</i>	
	β-Araneoseno ( <b>66</b> )	-	<i>Eunicea laciniata</i>	

<sup>1</sup> Las cruces corresponden al resultado cualitativo del ensayo tomando como referencia el resultado obtenido con la galantamina que corresponde a ++++ en esta escala. (-) corresponde a actividad nula.<sup>2</sup> Los ensayos con estos compuestos no son contundentes, y podrían tratarse de falsos positivos





**Figura 2.9** Estructura de los cembranoides más activos en el ensayo de inhibición de AChE



**Figura 2.10** Estructura de cembranoides con actividad media en la inhibición de la AChE

Los derivados del fuscól resultaron también activos, pero no se contaba con una gran cantidad de derivados para continuar con un estudio de estructura actividad; mientras las prostaglandinas, aisladas de *Plexaura homomalla*, resultaron activas aunque los

resultados no son conclusivos, pues puede tratarse de un falso positivo dado por la el carácter lipofílico de las mismas.

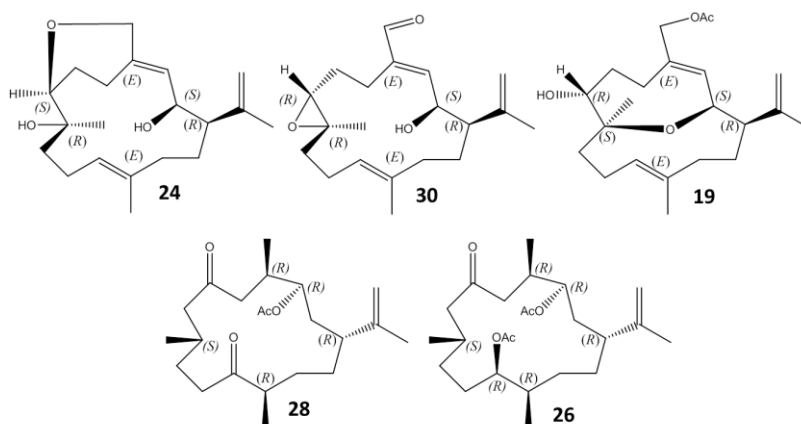
Así, una vez establecido que los cembranos naturales son activos como inhibidores de la AChE, se ensayó un segundo grupo de compuestos los cuales había sido obtenidos previamente por semisíntesis (Tello et al. 2013). Este segundo grupo presenta una mayor diversidad estructural en cuanto a los grupos funcionales presentes en el esqueleto cembranoide. Lo cual hace posible realizar estudios de estructura actividad (capítulo 3).

**Tabla 2.6** Resultado del ensayo de inhibición cualitativo de compuestos cembranoides obtenidos por semisíntesis

Nº	Nombre	Resultado	Nº	Nombre	Resultado
18	(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-8-cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-2,7-diol	-	26	(+)-(1R,3R,4R,8S,11R,12R)-3,11-diacetoxi-dihidroplexaurolona	+
19	(-)-(1R,2S,7R,8S,3E,11E)-18-acetoxicembra-2,8-oxa-3,11,15(17)-trien-7-ol	+++	27	(-)-(1R,3R,4R,8R,11R,12R)-3,11-diacetoxi-dihidroplexaurolona	+++
20	(+)-(1R,2S,3E,11E)-18-acetoxicembra-7-ceto-3,11,15(17)-trien-2-ol	++	28	(-)-(1R,3R,4R,8S,12R)-3-acetoxi-plexaurolona	+++
21	(-)-(1S,2R,7R,8R,15R)-3,4-11,12-15,17-triepoxi-asperdiol acetato	-	29	(-)-(1R,7R,8R)2,18-diceto-asperdiol	-
22	(+)-(1R,2S,3E,11E)-7-cetocembra-18-metoxi-2-ol	+	30	(-)-(1R,2S,7R,8R)-18-ceto-asperdiol	++++
23	(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-2,8-oxa-cembra-7,18-diol	-	2	4,14 diacetato de crassina	-
24	(+)-(1R,2S,7S,8R,3E,11E)-7,18-oxa-cembra-2,8-diol	++++		Galantamina	(++++)
25	(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-8-cloro-7-hidroxi-asperdiol	-			

De acuerdo a los resultados, los cembranos (+)-(1R,2S,7S,8R,3E,11E)-7,18-oxa-cembra-2,8-diol (**24**) y (-)-(1R,2S,7R,8R)-18-ceto-asperdiol (**30**) son los más activos presentando una actividad de inhibición similar a la galantamina, e incluso son más activos que el acetato de crassina. No obstante, los cembranos (-)-(1R,2S,7R,8S,3E,11E)-18-acetoxicembra-2,8-oxa-3,11,15(17)-trien-7-ol (**19**) y (-)-(1R,3R,4R,8S,12R)-3-acetoxi-plexaurolona (**28**) también son fuertemente activos, seguidos de (+)-(1R,3R,4R,8S,11R,12R)-3,11-diacetoxi-dihidroplexaurolona (**26**) que es débilmente activo. En la figura 2.11 se puede observar que estos compuestos activos poseen una gran cantidad de grupos oxigenados polares, como hidroxilos y carbonilos. En cuanto a los derivados del compuesto **1a**, el producto de reacción con LiAlH<sub>4</sub> mostró actividad de

inhibición un poco menor a la galantamina, corroborando que la presencia de hidroxilos en la estructura son importantes en cuanto a la actividad inhibitoria de la AChE; el producto acetilado no presentó inhibición de la AChE. Por lo que para trabajos posteriores se sugiere la purificación de los productos de reducción, así como la síntesis de nuevos derivados polihidroxilados.

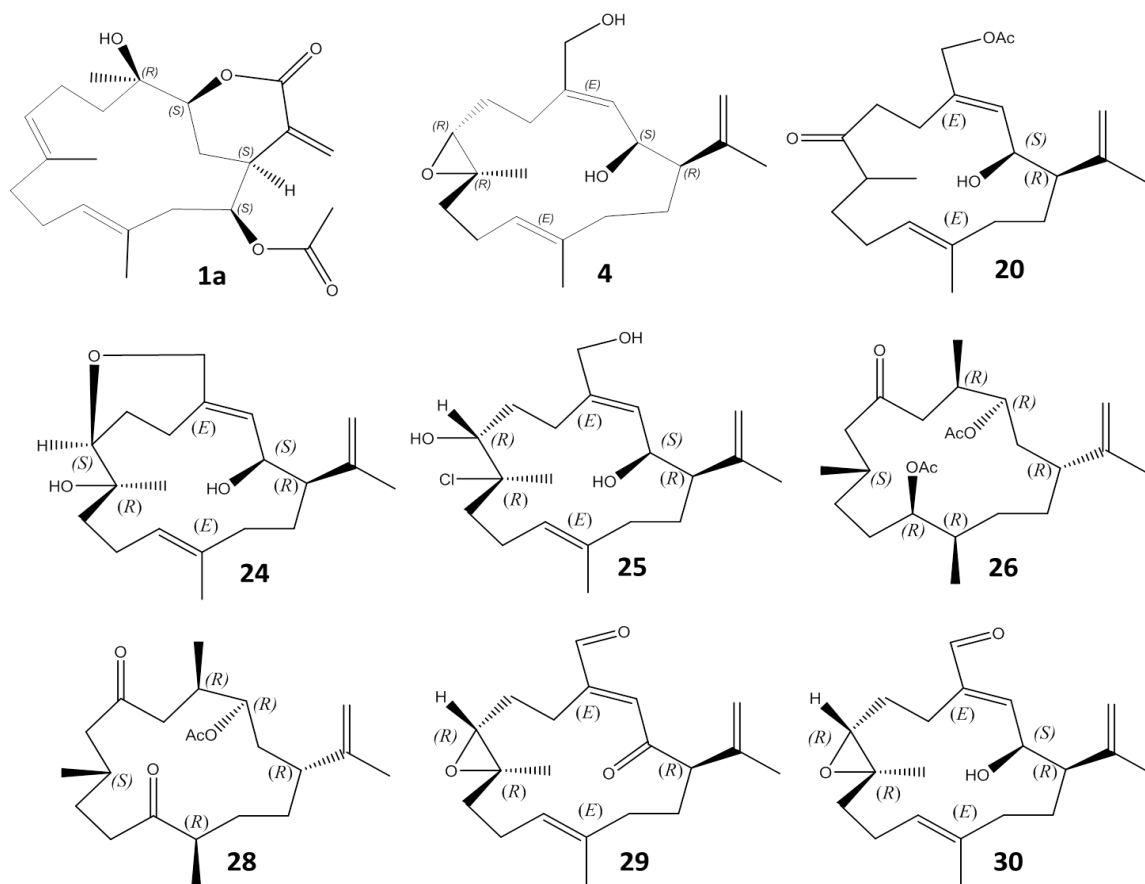


**Figura 2.11** Compuestos obtenidos por semisíntesis que presentaron actividad de inhibición.

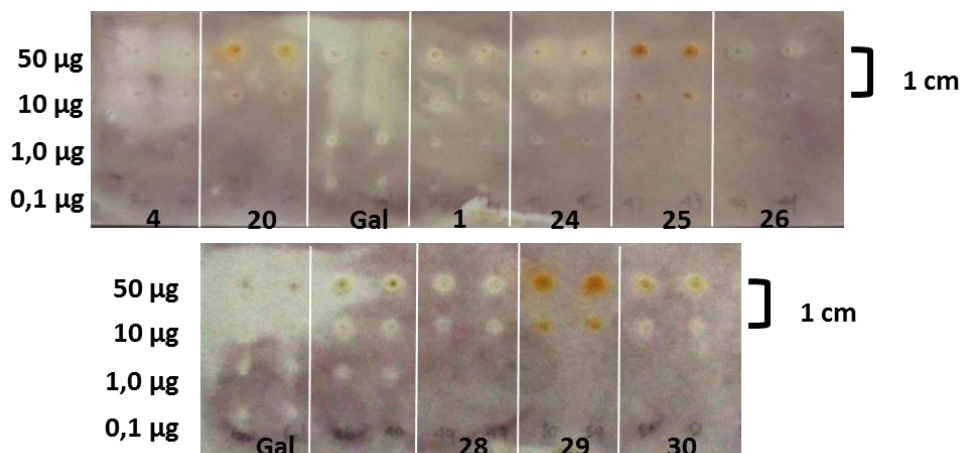
El paso siguiente fue hacer un estudio semicuantitativo con los cembranos de los que disponíamos cantidad suficiente en el laboratorio (figura 2.12), este estudio será muy útil en el entendimiento de la relación estructura-actividad, y permitirá verificar los estudios por *docking* del siguiente capítulo. Como método de ensayo se empleó el propuesto por Marston, y en él se emplea una placa CCD, por lo que no se presentan problemas de solubilidad, lo que sí pasa en los métodos fotométricos;<sup>5</sup> y como agente revelador Fast Blue Sal y acetato de naitilo. Los compuestos fueron aplicados de manera equidistante (a 1 cm entre sí), usando cantidades de compuesto y control positivo iguales para poder hacer comparaciones acerca de la capacidad de inhibición de los compuestos. Los

<sup>5</sup> Durante el desarrollo de esta tesis se llevaron a cabo ensayos colorimétricos usando el método de Marston en solución. No obstante la baja solubilidad en agua de los cembranos ensayados no nos permitió avanzar en este sentido, pues los resultados eran poco fiables. Ensayos para mejorar la metodología se están haciendo ahora bajo la tutoría de la Profesora Adriana Umaña, y tratando de adecuar la metodología de Ellmann

resultados se muestran en la figura 2.13, y se puede ver que solamente **1a** es capaz de inhibir la AChE a 0,1  $\mu\text{g}$ , similar a la galantamina, por lo tanto muestra ser el más potente inhibidor de la AChE entre los cembranos ensayados. El siguiente compuesto en actividad fue el asperdiol (**4**), seguido del (+)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,3*E*,11*E*)-7,18-Oxa-cembra-2,8-diol (**24**). En cuanto a los demás compuestos ensayados, se puede ver que (-)-(1*R*,7*R*,8*R*)-2,18-diceto-asperdiol (**29**) y (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,8*R*)-18-ceto-asperdiol (**30**) presentan halos de inhibición a 10  $\mu\text{g}$ , no obstante ya no presentan actividad a 1,0  $\mu\text{g}$ . Por último las muestras (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,8*R*,3*E*,11*E*)-8-cloro-7-hidroxi-asperdiol (**25**), (+)-(1*R*,3*R*,4*R*,8*S*,11*R*,12*R*)-3,11-Diacetoxi-dihidroxelauroloona (**26**) y (-)-(1*R*,7*R*,8*R*)-2,18-diceto-asperdiol (**29**) presentan actividad en cantidades de 50  $\mu\text{g}$ , sin embargo en cantidades inferiores a ésta no presentan inhibición (Tabla 2.7).



**Figura 2.12** Compuestos cembranoides probados mediante el ensayo de inhibición de la AChE en forma semicuantitativa.



**Figura 2.13** Ensayo de inhibición de AChE semicuantitativo, utilizando como control positivo galantamina (Gal),

**Tabla 2.7** Resultados comparativos del ensayo de inhibición semicuantitativo de cembranos procedentes de octocorales y obtenidos por semisíntesis. Activo (+), no activo (-)

Nº Muestra	Nº Estructura	50 µg	10 µg	1,0 µg	0,1 µg
	Gal	+	+	+	+
Acetato de crassina	1 <sup>a</sup>	+	+	+	+
Asperdiol	4	+	+	+	-
(-)-(1R,2S,7R,8R)-18-Ceto-asperdiol	20	+	-	-	-
(+)-(1R,2S,7S,8R,3E,11E)-7,18-Oxa-cembra-2,8-diol	24	+	+	+	-
(-)-(1R,2S,7R,8R,3E,11E)-8-Cloro-7-hidroxi-asperdiol	25	+	+	-	-
(+)-(1R,3R,4R,8S,11R,12R)-3,11-Diacetoxi-dihidroplexaurozona	26	+	-	-	-
(-)-(1R,3R,4R,8S,12R)-3-Acetoxi-plexaurozona	28	+	+	-	-
(-)-(1R,7R,8R)-2,18-Diceto-asperdiol	29	-	-	-	-
(-)-(1R,2S,7R,8R)-18-Ceto-asperdiol	30	+	+	-	-

En resumen, se pudo establecer que el acetato de crassina es el cembrano más activo, lo que posiblemente se deba a la lactona que presente en su estructura, que no está presente en ningún otro cembrano de los ensayados. De otro lado los compuestos fuertemente activos **4** y **24** presentan en su estructura un grupo hidroxilo en C-2, por lo tanto puede ser un factor importante a la hora de evaluar qué grupo funcional puede aportar en la interacción con el sitio activo de la enzima para provocar la inhibición. Los

demás compuestos no presentan una relación clara en cuanto a sus grupos funcionales y la actividad inhibitoria observada.

## 2.4 Conclusiones

Los estudios de *screening* mostraron que los organismos marinos, particularmente los octocorales poseen potencial como fuente de compuestos AChEI, donde octocorales del género *Eunicea* mostraron ser los más promisorios.

El estudio químico de *Pseudoplexaura* sp. permitió identificar al cembrano acetato de crassina (**1a**) como el compuesto responsable de la actividad del extracto teniendo una actividad similar a la de la galantamina. También se aislaron compuestos tipo sesquiterpeno (**3a-3d**), aunque no presentaron actividad inhibitoria frente a la AChE.

Se obtuvieron por semisíntesis el 4,14-diacetato de crassina (**2**) y una mezcla de compuestos de la reducción del compuesto **1a**, donde los productos de la reducción mostraron actividad inhibitoria frente a la AChE, en cambio el producto de acetilación no mostró tal actividad, sugiriendo que a presencia de hidroxilos aumenta la actividad.

Algunos de los cembranoides de la Quimioteca del Laboratorio de Productos Naturales Marinos resultaron ser activos en el ensayo de inhibición. Los ensayos semicuantitativos permitieron establecer como compuestos más activos los cembranoides asperdiol (**4**), (+)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,3*E*,11*E*)-7,18-oxa-cembra-2,8-diol (**24**), (-)-(1*R*,3*R*,4*R*,8*S*,12*R*)-3-acetoxi-plexaurologona (**28**) y (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,8*R*)-18-ceto-asperdiol (**30**).

## 2.5 Bibliografía

Berrue, F. and R. G. Kerr (2009). "Diterpenes from gorgonian corals." Nat Prod Rep **26**(5): 681-710.

Blunt, J. and M. Munro (2013). Antimarin, Canterbury, U.

Blunt, J. W., B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro and M. R. Prinsep (2013). "Marine natural products." Natural Product Reports **30**(2): 237-323.

Bonnard, I., S. B. Jhaumeer-Laulloo, N. Bontemps, B. Banaigs and M. Aknin (2010). "New Lobane and Cembrane Diterpenes from Two Comorian Soft Corals." Marine Drugs **8**(2): 359-372.

Burres, N. S., J. E. Hunter and A. E. Wright (1989). "A mammalian cell agar-diffusion assay for the detection of toxic compounds." J Nat Prod **52**(3): 522-527.

Clayden, J., N. Greeves and S. Warren (2012). Organic Chemistry, OUP Oxford.

Copeland, R. A. (2013). Why Enzymes as Drug Targets? Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, John Wiley & Sons, Inc.: 1-23.

Crews, P., J. Rodríguez and M. Jaspars (2010). Interpretation and use of proton and carbon chemical shifts. Organic Structure Analysis. United States of America, Oxford University Press: 59-114.

Choma, I. M. and E. M. Grzelak (2011). "Bioautography detection in thin-layer chromatography." Journal of Chromatography A **1218**(19): 2684-2691.

Danilo Ribeiro de, O., L. o. Gilda Guimar?es, C. Newton Gonçalves, V. Mariana Neves and L. o. Suzana Guimar?es (2012). Ethnomedical Knowledge Among the ?Quilombolas? from the Amazon Region of Brazil with a Special Focus on Plants Used as Nervous System Tonics. Medicinal Plants, Science Publishers: 142-178.

Feng, Y., R. A. Davis, M. L. Sykes, V. M. Avery and R. J. Quinn (2012). "Iotrochamides A and B, antitrypanosomal compounds from the Australian marine sponge Iotrochota sp." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **22**(14): 4873-4876.

Gerwick, William H. and Bradley S. Moore (2012). "Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology." Chemistry & Biology **19**(1): 85-98.

Guardigli, M., P. Pasini, M. Mirasoli, A. Leoni, A. Andreani and A. Roda (2005). "Chemiluminescent high-throughput microassay for evaluation of acetylcholinesterase inhibitors." Analytica Chimica Acta **535**(1-2): 139-144.

Heinrich, M. and H. Lee Teoh (2004). "Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge." Journal of Ethnopharmacology **92**(2–3): 147-162.

Joulain, D. and W. A. König (1998). The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E.B.-Verlag.

Langjae, R., S. Bussarawit, S. Yuenyongsawad, K. Ingkaninan and A. Plubrukarn (2007). "Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium* sp." Steroids **72**(9-10): 682-685.

Leal, M. C., J. Puga, J. Serôdio, N. C. M. Gomes and R. Calado (2012). "Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades – Where and What Are We Bioprospecting?" PLoS ONE **7**(1): e30580.

Marston, A., J. Kissling and K. Hostettmann (2002). "A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants." Phytochemical Analysis **13**(1): 51-54.

Matsushima, H., H. Tanaka, N. Mizumoto and A. Takashima (2009). "Identification of crassin acetate as a new immunosuppressant triggering heme oxygenase-1 expression in dendritic cells." Blood **114**(1): 64-73.

McMurry, J. E. and R. G. Dushin (1990). "Total synthesis of (.+.-)-isolobophytolide and (.+.-)-crassin by titanium-induced carbonyl coupling." Journal of the American Chemical Society **112**(19): 6942-6949.

Melgarejo, L. M., J. Sánchez, C. Reyes, F. Newmark and M. Santos-Acevedo (2002). Plan Nacional en bioprospección continental y marina (propuesta técnica). Serie de Documentos Generales INVEMAR. Bogotá: 122.

Molinski, T. F., D. S. Dalisay, S. L. Lievens and J. P. Saludes (2009). "Drug development from marine natural products." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 69-85.

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2012). "Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." Journal of Natural Products **75**(3): 311-335.



Nukoolkarn, V. S., S. Saen-oon, T. Rungrotmongkol, S. Hannongbua, K. Ingkaninan and K. Suwanborirux (2008). "Petrosamine, a potent anticholinesterase pyridoacridine alkaloid from a Thai marine sponge *Petrosia* n. sp." Bioorg Med Chem **16**(13): 6560-6567.

Papastephanou, C. and D. G. Anderson (1982). "Crassin acetate biosynthesis in a cell-free homogenate of zooxanthellae from *Pseudoplexaura porosa* (Houttuyn); implications to the symbiotic process." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry **73**(3): 617-624.

Reina, E., C. Puentes, J. Rojas, J. García, F. A. Ramos, L. Castellanos, M. Aragón and L. F. Ospina (2011). "Fuscoside E: A strong anti-inflammatory diterpene from Caribbean octocoral *Eunicea fusca*." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **21**(19): 5888-5891.

Reina, E., F. A. Ramos, L. Castellanos, M. Aragón and L. F. Ospina (2013). "Anti-inflammatory R-prostaglandins from Caribbean Colombian soft coral *Plexaura homomalla*." J Pharm Pharmacol **65**(11): 1643-1652.

Rhee, I. K., M. van de Meent, K. Ingkaninan and R. Verpoorte (2001). "Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining." J Chromatogr A **915**(1-2): 217-223.

Rhee, I. K., R. M. van Rijn and R. Verpoorte (2003). "Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography." Phytochemical Analysis **14**(3): 127-131.

Rice, J. R., C. Papastephanou and D. G. Anderson (1970). "Isolation, localization and biosynthesis of crassin acetate in *pseudoplexaura porosa* (houttuyn)." The Biological Bulletin **138**(3): 334-343.

Rodríguez, A. D. (1995). "The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals." Tetrahedron **51**(16): 4571-4618.

Tan, L. (2010). "Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery." Journal of Applied Phycology **22**(5): 659-676.

Tasdemir, D., K. M. Marshall, G. C. Mangalindan, G. P. Concepcion, L. R. Barrows, M. K. Harper and C. M. Ireland (2001). "Deoxyamphimedine, a new pyridoacridine alkaloid from two tropical Xestospongia sponges." J Org Chem **66**(9): 3246-3248.

Tello, E., L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro and C. Duque (2009). "Cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip Eunicea knighti." J Nat Prod **72**(9): 1595-1602.

Tello, E., L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro and C. Duque (2012). "Disruption in quorum-sensing systems and bacterial biofilm inhibition by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral Eunicea knighti." J Nat Prod **75**(9): 1637-1642.

Tello, E., L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro, J. Rodríguez, C. Jiménez and C. Duque (2011). "Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the Caribbean octocoral Pseudoplexaura flagellosa. Revised structures of plexaurulones." Tetrahedron **67**(47): 9112-9121.

Tello, E., L. Castellanos and C. Duque (2013). "Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors." Bioorganic & Medicinal Chemistry **21**(1): 242-256.

Vinardell Martínez-Hidalgo, M. P. (2007). "ALTERNATIVAS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL EN TOXICOLOGÍA: SITUACIÓN ACTUAL." Acta bioethica **13**: 41-52.

Wang, R., H. Yan and X. C. Tang (2006). "Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine." Acta Pharmacol Sin **27**(1): 1-26.

Wasylyk, J. M. and M. Alam (1989). "Isolation and Identification of a New Cembranoid Diterpene from the Tunicate Styela plicata." Journal of Natural Products **52**(6): 1360-1362.

Weinheimer, A. J. and J. A. Matson (1975). "Crassin acetate, the principal antineoplastic agent in four gorgonians of the Pseudoplexaura genus." Lloydia **38**(5): 378-382.

Wojtkielewicz, A. and J. W. Morzycki (2007). "Synthesis of gamma- and delta-lactones from 1alpha-hydroxy-5,6-trans-vitamin D3 by ring-closing metathesis route and their reduction with metal hydrides." Steroids **72**(6-7): 552-558.

Xu, S., I. Held, B. Kempf, H. Mayr, W. Steglich and H. Zipse (2005). "The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols—A Mechanistic Study (DMAP=4-(Dimethylamino)pyridine)." Chemistry – A European Journal **11**(16): 4751-4757.

Yang, Z. D., Z. W. Song, J. Ren, M. J. Yang and S. Li (2011). "Improved thin-layer chromatography bioautographic assay for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants." Phytochem Anal **22**(6): 509-515.

Yoon, N. Y., H. Y. Chung, H. R. Kim and J. S. Choi (2008). "Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*." Fisheries Science **74**(1): 200-207.

### 3. Estudios de acoplamiento molecular de cembranos y la enzima acetilcolinesterasa.

#### Resumen

Los ensayos *in vitro* nos mostraron que los cembranos son capaces de inhibir la AChE, y para entender cómo ocurre esta inhibición se realizaron estudios de acoplamiento molecular mediante el paquete computacional AutoDock entre los compuestos inhibidores y la enzima AChE. Así, 65 cembranoides fueron modelados y optimizados en búsqueda de los conformeros más estables, el modelo 3D de la enzima fue el archivo obtenido por difracción de rayos X (1DX6.pdb) para la AChE aislada de *Torpedo californica*, disponible en la base de datos *Protein Data Bank*.

Los resultados del estudio por *docking* mostraron que los cembranoides son afines por el sitio activo de la enzima. Los resultados obtenidos del estudio de acoplamiento en un sistema rígido mostraron que las interacciones entre estos diterpenos y el sitio activo son del tipo puentes de hidrógeno, fuerzas Van der Waals y fuerzas dipolo-dipolo, dando como los inhibidores más afines a la cavidad del sitio activo a los compuestos 14-acetoxicrassina (**1a**) (-10,76 kcal/mol), styelólido (**1b**) (-11,21 kcal/mol), (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,8*R*,3*E*,11*E*)-8-Cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-2,7-diol (**18**) (-11,61 kcal/mol), (+)-(1*R*,2*S*,3*E*,11*E*)-18-Acetoxicembra-7-ceto-3,11,15(17)-trien-2-ol (**20**) (-11,52 kcal/mol), (-)-(1*S*,7*R*,3*E*,8*Z*,11*E*)-18-Acetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol (**39**) (-11,37 kcal/mol), (+)-(1*S*,7*R*,8*R*,3*E*,11*E*)-8-Cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-7-ol (**40**) (-11,52 kcal/mol), (-)-(1*R*,2*S*,3*E*,11*E*)-18-Acetoxicembra-2-hidroxi-3,11,15(17)-trien-8-al (**44**) (-11,25 kcal/mol) y (-)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,11*R*,12*R*,3*E*)-18-Acetoxicembra-7,12-diiodo-8,11-oxa-3,15(17)-dien-2-ol (**46**) (-12,38 kcal/mol), gracias a la presencia de grupos oxigenados como el acetato en C-18, y halógenos en los C-7, C-8 y C12. No

obstante la lactona presente en el compuesto **1a** y **1b** presenta puentes de hidrógeno con residuos de tirosina y serina respectivamente que favorece la afinidad de estos compuestos con la cavidad del sitio activo.

El estudio asumiendo un sistema flexible, como una aproximación a sistemas dinámicos de interacciones inhibidor-enzima, mostró que la mayoría de los cembranoides presentaron energías de unión cercanas a las obtenidas en el sistema rígido. Los compuestos que presentaron mejor afinidad en este sistema fueron aquellos que presentaron en la estructura grupos epóxido en C-7 y C-8, y un carbonilo en C-18, cuyos compuestos fueron knightal (**16**) (-8,42 kcal/mol), (-)-1*R*,7*R*,8*R*-2,18-Diceto-asperdiol (**29**) (-8,25 kcal/mol) y 11(*R*)-Hidroxi-12(20)-en-knightal (**56**) (-8,79 kcal/mol); en cuanto a los compuestos **1a** y **1b** presentaron valores de energías de unión intermedias (-6,40 y -5,26 kcal/mol, respectivamente). Los resultados de los estudios de acoplamiento en sistema rígido y flexible fueron contrastados con los resultados obtenidos en el análisis semicuantitativo de la inhibición de la enzima AChE, donde los resultados del sistema flexible se relacionan mejor con los resultados experimentales; por lo tanto la aproximación a los valores experimentales por parte del sistema flexible son muy cercanos, por lo tanto es una herramienta potencial para diseñar nuevos compuestos cembranoides con actividad de inhibición de la AChE.

### 3.1 Introducción

El uso de herramientas computacionales para diseñar estructuras de compuestos químicos (ligandos o sustratos inhibidores, para el caso de este estudio en concreto), así como para predecir y describir sus características; además, de sus relaciones con agentes externos (como enzimas por ejemplo) se conoce como “estudios de acoplamiento molecular” o *docking* (Bachwani et al. 2011). Los estudios por *docking* envuelven dos procesos básicos: una primera parte que corresponde a la predicción de la conformación de la molécula objeto de estudio (o ligando) en búsqueda de una orientación y posición adecuada de ésta en la molécula con la que se estudia su interacción (una enzima por ejemplo); y una segunda parte donde se hace una valoración de la afinidad entre este ligando y la molécula externa (enzima). Esos dos procesos están

íntimamente relacionados con métodos de muestreo y esquemas de afinidad (*Scoring*), respectivamente (Meng et al. 2011).

Las bases del *docking* se pueden encontrar en el modelo de llave-cerradura propuesto por Fischer en 1894 (Fischer 1894), en el que se entiende que un ligando se une a un receptor como lo hace una llave a una cerradura, donde las similitudes entre ligando y receptor define esta unión (Copeland 2002). Sin embargo, hoy en día esta aproximación ha sido revaluada dado que es claro que se trata de un sistema dinámico y no rígido (Koshland 1963). Estos aspectos se tienen en cuenta para poder realizar un estudio de acoplamiento *in silico*, tanto para un sistema rígido (modelo llave-cerradura), como para un sistema flexible (aproximación más reciente), siempre en busca de un entendimiento de los resultados experimentales, que serán quienes determinen el valor del estudio *in silico*.

### 3.1.1 Conceptos teóricos y prácticos del *docking*

De acuerdo al sistema de estudio (interacciones ligando-receptor, enzima-inhibidor, entre otros) se deben elegir los diferentes parámetros para llevar a cabo el análisis. Estos incluyen inicialmente el modelo de estudio (estructura de la enzima por ejemplo), seguido por la elección de un método de cálculo adecuado para el sistema (el algoritmo a utilizar), y por último el método de tratamiento de los resultados para el análisis del acoplamiento entre el ligando y un receptor, como por ejemplo los estudios QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) (Bachwani et al. 2011).

En los estudios por *docking* las simulaciones de acoplamiento de un ligando y un receptor son bastante costosas en cuanto a recursos computacionales, adicionalmente existen varios algoritmos para hacerlo. Así, y con el fin de minimizar los costos computacionales, se realizan muestreos con diferentes algoritmos para optar por el más adecuado. Estos algoritmos están basados en diferentes cálculos matemáticos que reproducen las condiciones experimentales, junto con las funciones de *scoring*, permitiendo que haya un gran número de conformaciones de la molécula a estudiar (inhibidor) lo que podría correlacionarse mejor con lo que realmente ocurre en la

naturaleza. Hoy en día existen paquetes computacionales que emplean diferentes tipos de algoritmos para poder realizar tanto un estudio de acoplamiento como de afinidad molecular (Tabla 3.1) (Meng et al. 2011).

**Tabla 3.1** Diferentes algoritmos usados para estudios por *docking* (Meng et al. 2011).

Algoritmos	Características	Software
Correspondientes	Basados en la forma molecular del ligando en el sitio activo. Realiza procesos rápidos, ideales en el diseño de librerías y bases de datos.	DOCK, FLOG, LibDock, SANDOCK
Construcción incremental	Valora la interacción del ligando con el sitio activo por fragmentos, incrementando el número de partes o complementando los fragmentos. Adecuado para sistemas flexibles.	DOCK 4.0, FlexX, Hammerhead, SLIDE, eHiTS
MCSS, LUDI	Parten de fragmentos o grupos funcionales, analizando interacciones entre estas partes y el sitio activo, dando al final una nueva molécula afín al sitio activo. LUDI se enfoca en puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.	MCSS, LUDI
Monte Carlo	Genera diferentes posiciones del ligando en el sitio activo a través de rotación de enlaces. Su principal ventaja es que permite evaluar cambios grandes de energía potencial, lo que es poco probable en simulaciones de dinámica molecular.	Primeras versiones de AutoDock, ICM, QXP, Affinity.
Genéticos	Mediante métodos estocásticos, genera códigos binarios (denominados genes) a partir de los grados de libertad del ligando, estos son combinados de manera aleatoria, generando "mutaciones" que corresponden a la posición del ligando en el sitio activo, dando nuevas formas al ligando.	AutoDock, GOLD, DIVALI, DARWIN.
Dinámica molecular	Un compilado de varios algoritmos enfocados en la simulación de la flexibilidad tanto de los ligandos como de los receptores (proteína). Sin embargo, requiere bastantes recursos computacionales, por lo que es necesario realizar todo el proceso de manera fragmentada.	AMBER, GROMACS, MDynaMix

Las funciones de *scoring* buscan valorar la unión del ligando con un sitio específico del receptor; así, se analiza la interacción de los compuestos con un blanco (por ejemplo el sitio activo de la enzima), y se determina la conformación adecuada del ligando en el receptor, empleando tiempos de cómputo convenientes. Estas funciones abarcan estimaciones, cálculos y asimilaciones en cuanto a energías de unión entre el ligando y la proteína. Mediante los estudios por *docking* y *scoring* se puede determinar la afinidad del ligando-receptor empleando sistemas o rígidos, o flexibles o híbridos, de acuerdo a los recursos computacionales existentes en el mercado (Tabla 3.2) (Meng et al. 2011).

**Tabla 3.2** Diferentes funciones *scoring* para determinar afinidad molecular en un complejo ligando-enzima (Meng et al. 2011).

Función <i>Scoring</i>	Descripción	Software
Funciones basada en fuerzas de campo.	Se consideran los puentes de H, solvataciones y contribuciones entrópicas. Buena exactitud en la predicción en energías de unión	DOCK, GOLD, AutoDock.
Funciones empíricas.	Se evalúa la energía de unión como la suma de los productos de varias energías del sistema con un coeficiente resultante de regresiones lineales de sistemas conocidos de interacciones ligando-receptor.	PLP, ChemScore
Funciones basada en el conocimiento.	Evalúa de manera estadística varios complejos cristalinos de ligando-proteína para determinar el contacto interatómico más favorable en estos complejos.	PMF, DrugScore, SMOG, Bleep.

### 3.1.2 Estudios *in silico* de inhibidores de acetilcolinesterasa

La enzima acetilcolinesterasa pertenece a la familia de las hidrolasas, cuya función principal es hidrólisis de la acetilcolina durante la sinapsis colinérgica, resultando en la terminación del impulso nervioso. La estructura tridimensional de ella fue determinada por primera vez para la presente en los tejidos nerviosos del pez *Torpedo californica*. En los vertebrados esta enzima está presente con otro tipo de hidrolasas similares, como por ejemplo la butirilcolinesterasa (BuChE), la cual también es capaz de hidrolizar la acetilcolina; sin embargo, su especificidad se basa en las funciones que realiza cada una

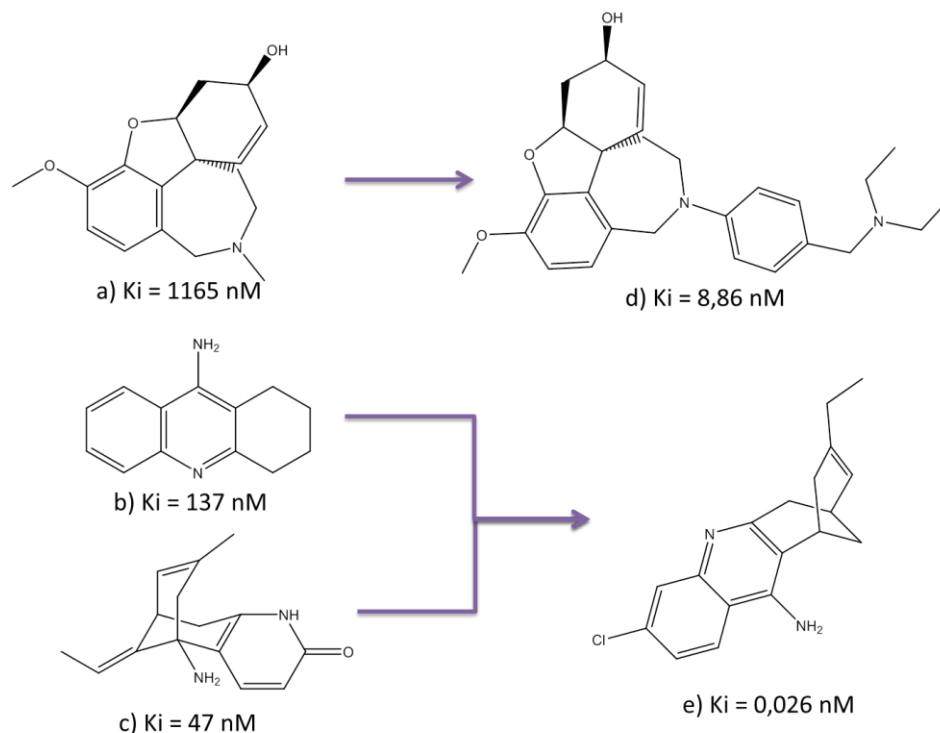


en los tejidos, así como en la selectividad hacia los inhibidores y neurotransmisores (acetil y butirilcolina, respectivamente) (Singh et al. 2013).

Como se había visto en el capítulo 1, la cavidad del sitio activo se puede dividir en varias zonas (sitio esterático, subsitio aniónico, cavidad aromática y subsitio periférico aniónico) (figura 1.1). Para efectos prácticos, los inhibidores con función farmacológica tienen mejor afinidad hacia dos sitios de ellos, la tríada catalítica y el subsitio periférico aniónico. La tríada catalítica comprende tres aminoácidos (Serina 200, ácido glutámico 327 e histidina 440) y son los responsables de la hidrólisis del neurotransmisor. El subsitio periférico aniónico hace parte de la entrada al sitio activo, además es el primer lugar de interacción de un gran número de toxinas e inhibidores, por lo tanto es un blanco apropiado en la búsqueda y diseño de nuevos compuestos inhibidores de la AChE. La importancia de estos dos sitios ha hecho que se realicen propuestas de inhibidores con doble interacción, una en la tríada catalítica y otra con el subsitio periférico aniónico, lo que mejora tanto la selectividad como la inhibición de la actividad del AChEI (Singh et al. 2013).

Se han realizado estudios de *docking* con inhibidores de la AChE como la tacrina (figura 3.1), la cual fue el primer fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de la AD, no obstante, en la actualidad su uso ha sido restringido por sus efectos secundarios. Estos estudios *in silico*, que incluyen trabajos de QSAR (*Quantitative Structure-Analysis Relationship*), han permitido el diseño de nuevos derivados de la tacrina con mayor selectividad hacia la enzima y por lo tanto con menos efectos secundarios (Figura 3.1) (Jung et al. 2007); sin embargo, estos compuestos aún no se encuentran disponibles en el mercado. Otros compuestos como los flavonoides también han sido objeto de estudios *in silico* como inhibidores de AChE, debido a las propiedades neuroprotectoras de éstos y su interacción con varios blancos terapéuticos en la AD (por ej. inhibición de formación de agregaciones  $\beta$ -Amiloides, reducción de radicales oxigenados inducida por peróxidos, entre otros) (Sheng et al. 2009). Así mismo, estudios por *docking* han permitido proponer derivados del medicamento, para el tratamiento de AD (García 2002), galantamina con actividad mejorada (Figura 3.1) (Heinrich et al. 2004). Los derivados propuestos incluyen modificaciones en el nitrógeno de este alcaloide haciendo que se mejore la interacción

con el sitio periférico aniónico y catalítico de la enzima. Estas modificaciones además han mostrado una doble acción como inhibidor y modulador alostérico de los receptores nicotínicos, lo que lo hace bastante útil a la hora de realizar un estudio SAR (*Structure-Activity Relationship*) (Jia et al. 2009). También se han estudiado *in silico* diversos derivados de la huperzina A, que han incluido otros inhibidores de la AChE como la tacrina que han permitido potenciar esta inhibición, pues estos compuestos pueden interactuar tanto con el sitio activo (sitio esterático), y el subsitio periférico aniónico. Un ejemplo de lo anterior es la huprina, mezcla de tacrina y huperzina A (Figura 3.1) (Yan et al. 2009, Hu et al. 2013).



**Figura 3.1** Estructuras de inhibidores de AChE y sus derivados de mayor actividad de inhibición, expresado en constantes de inhibición ( $K_i$ ). a) Galantamina, b) Tacrina, c) Huperzina A, d) derivado de Galantamina, e) Huprina (Híbrido de tacrina y huperzina A)

Con el marco anterior, en esta parte del trabajo nos propusimos realizar un estudio de acoplamiento molecular de los cembranos bioactivos identificados en el capítulo II con el sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa, en búsqueda de una relación estructura-

actividad de este tipo de compuestos, aislados de organismos marinos del Caribe Colombiano. Para corroborar los resultados de este estudio *in silico*, buscamos contrastar estos datos con los experimentales *in vitro* obtenidos en el capítulo 2. Todo lo anterior con el firme propósito de darle un valor agregado a los cembranos aislados u obtenidos por semisíntesis en nuestro grupo de investigación.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Software utilizado para el estudio

El modelado de los compuestos a estudiar en 3 dimensiones fue realizado mediante Gabedit 2.4.5. para obtener el archivo .pdb para cada cembrano, el cual fue utilizado en los estudios de acoplamiento. Las estructuras de los cembranos fueron optimizadas utilizando modelos iterativos en gradiente (método Quasi Newton), en búsqueda de modelos energéticamente más estables.

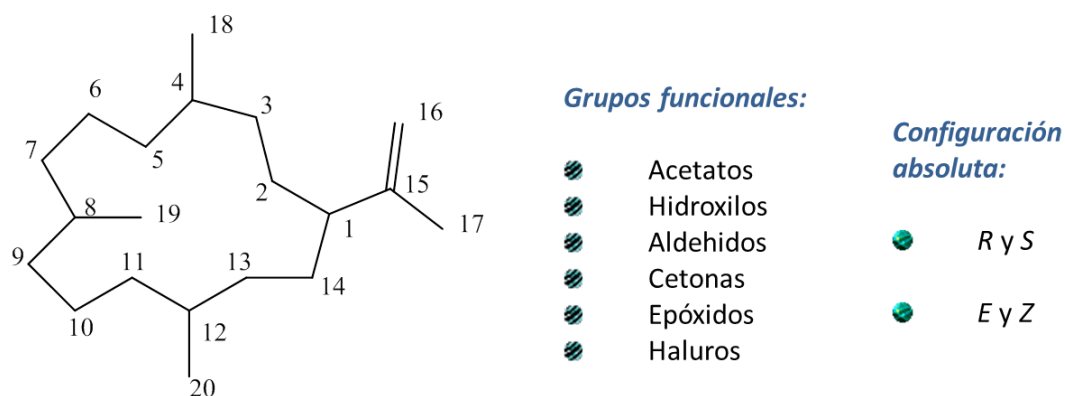
Los estudios por *docking* fueron realizados usando el paquete computacional AutoDock 1.6.5, y AutoDock Vina, obtenidos de <http://mgltools.scripps.edu/downloads>. El análisis de los datos obtenidos se realizó con los programas AutoDock Tools y Pymol (Delano Scientifics; obtenido de <http://sourceforge.net/projects/pymol/>).

Los estudios de acoplamiento molecular fueron realizados en el grupo de investigación en Físicoquímica teórica y experimental (GIFTEX) de la Universidad Industrial de Santander (UIS), sede Guatimar, en el laboratorio del Profesor Cristian Blanco.

### 3.2.2 Compuestos para estudio de acoplamiento molecular.

Los compuestos utilizados para el estudio por *docking* fueron sesenta y cinco (**1-63**), de los cuáles quince fueron de origen natural (**1a**, **4-17**, y **55**), aislados de los octocorales *Pseudoplexaura* sp (**1a**), *Eunicea knighti* (**4**, **6**, **7**, **9**, **16**, **17**), y *Pseudoplexaura flagellosa* (**10-15**); cuarenta y tres semisintéticos (**2**, **2a**, **2b**, **6**, **18-54**, **56** y **57**) y siete diseñados por modelamiento molecular (**1b**, **58-63**). Las estructuras presentan diferencias en cuanto

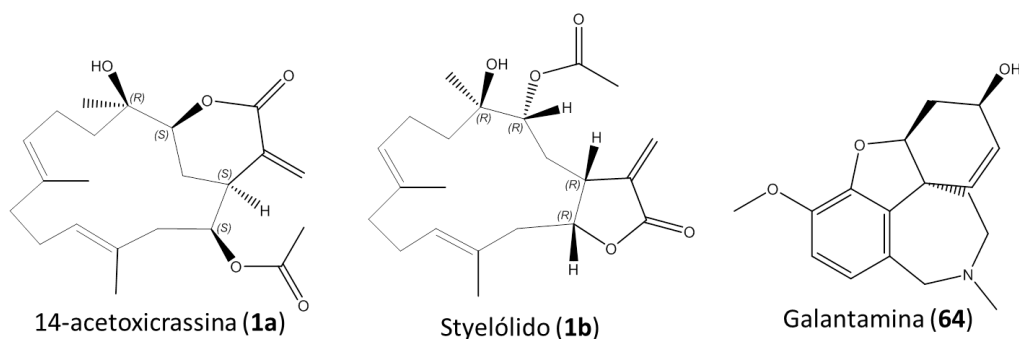
a los grupos funcionales en el esqueleto del cembrano, donde se tienen derivados acetilados, hidroxilados, halogenados, entre otros (Figura 3.2). En la figura A.21, se encuentran las estructuras de los compuestos evaluados. Como complemento a esta parte se evaluaron dos compuestos tipo diterpeno denominados dolabelanos, aislados del octocoral *Eunicea laciniata*, (las estructuras y los datos correspondientes a energías se ven en la figura A.22).



**Figura 3.2** Estructura base del cembrano, junto con los grupos se encuentran en los distintos compuestos estudiados.

### 3.2.3 Estudios de *docking* preliminares

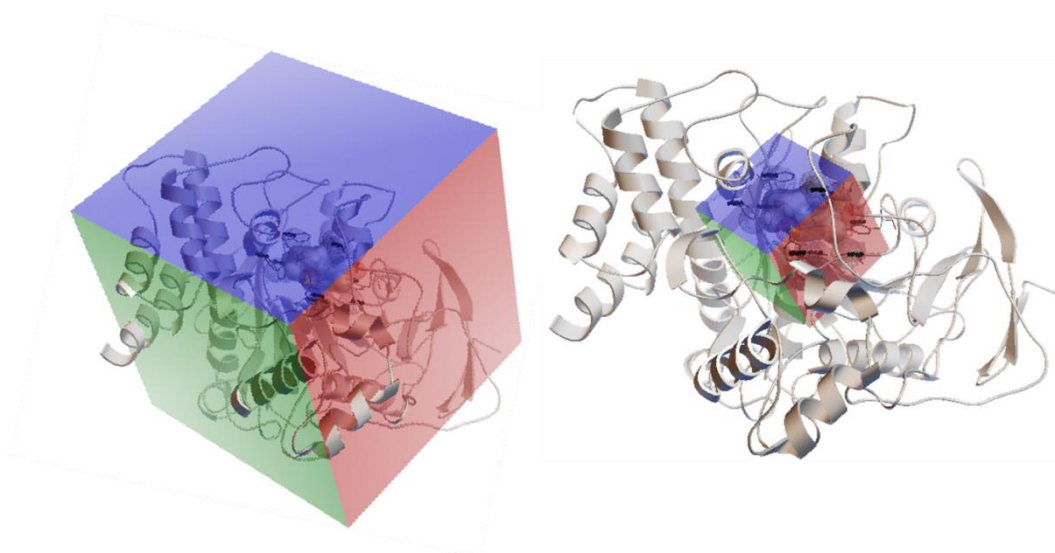
Los estudios preliminares de *docking* fueron realizados con los programas nombrados anteriormente, usando la galantamina (**64**), por ser el control positivo utilizado en los ensayos de inhibición (capítulo 2), y los cembranos de referencia (**1a** y **1b**), que fue aislado de manera bioguiada a partir del extracto de *Pseudoplexaura* sp (Capítulo 2).



**Figura 3.3** Estructuras de los compuestos para realizar los estudios preliminares.

El modelo 3D empleado de la enzima AChE fue el archivo 1DX6.pdb descargado de a base de datos RCSB *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1DX6>). Este modelo pdb fue obtenido por difracción de rayos X de la enzima cristalizada junto con galantamina, cuya enzima fue aislada del pez eléctrico *Torpedo californica* (Greenblatt et al. 1999). Para el trabajo en *docking*, el modelo de la enzima fue adecuado mediante la eliminación de moléculas de agua presentes en el archivo pdb original, así como la aplicación de cargas Gasteiger para equilibrar la ausencia de cargas o hidrógenos en el modelo enzimático.

Con las estructuras **1a**, **1b** y **64** modeladas y optimizadas se realizó un estudio de acoplamiento global mediante AutoDock Vina, usando un Grid (caja que delimita el sitio de estudio en el modelo 3D de la enzima) de 120 x 120 x 120 Angstroms, el cual engloba la mayor parte de la enzima. Este mismo ensayo se hizo con el neurotransmisor acetilcolina, con el fin de comparar los resultados con los obtenidos para las estructuras **1a**, **1b** y **64**. Las coordenadas del centro del sitio activo fueron establecidas de acuerdo a la ubicación del ligando (galantamina) acomplejado en la enzima cristalizada, lo que se obtiene del archivo 1DX6.pdb; este centro tiene como coordenadas 3 en X, 65 en Y y 64 en Z (Figura 3.4).



**Figura 3.4** Uso del grid para determinar el sistema de estudio de acoplamiento, a la izquierda se muestra un grid de 120 x 120 x 120 Å; a la derecha un grid de 40 x 40 x 40 Å

Los parámetros establecidos para el *docking* fueron los predeterminados por el programa AutoDock, tales como las características del ligando (carbonos aromáticos, centros de torsión) características de la enzima (residuos rígidos o flexibles, definición del grid), determinación de los mapas de potencial para el cómputo y escogencia del algoritmo para el cálculo.

#### **3.2.4 Estudios *docking* en sistemas rígidos**

Los ensayos con los 65 cembranos, se hicieron usando un grid de 40 X 40 X 40 Å que incluyó el sitio activo. Para definir las coordenadas de los átomos del ligando y el sitio activo se realizó de manera predeterminada con el programa AutoGrid (presente en el paquete MGLTools, junto con AutoDock), el cual delimita la zona de estudio. Los cembranos se asumieron como flexibles, mientras el sitio activo se asumió rígido.

#### **3.2.5 Estudios de acoplamiento en sistemas flexibles**

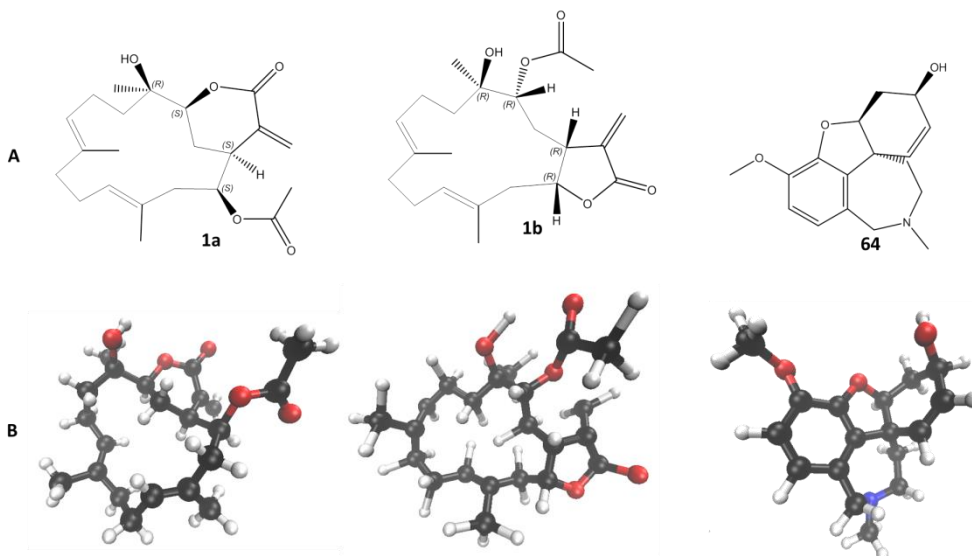
Se tuvo en cuenta la flexibilidad de los residuos de aminoácidos implicados en acoplamiento con el ligando (Asp 72, Trp 84, Asn 85, Gly 117, Gly 118, Gly 119 Tyr 121, Ser 122, Leu 127, Tyr 130, Glu 199, Phe 330, Phe 331, Tyr 334, His 440 y Gly 441), junto con la flexibilidad del compuesto utilizado. Los parámetros utilizados fueron los mismos que se usaron en los ensayos preliminares, complementando con los mapas generados por los grupos flexibles (ligando y residuos del sitio activo).

### **3.3 Resultados y discusión**

Los resultados de bioprospección de inhibidores de acetilcolinesterasa detallados en el capítulo 2 mostraron que los cembranos producidos por los octocorales (o su holobionte) son potentes inhibidores de la AChE. De otro lado, dentro del grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de Productos Naturales y Frutas de Colombia” hemos aislado y obtenido por semisíntesis una gran cantidad de derivados de cembranos (Tello et al. 2011, Tello et al. 2012, Tello et al. 2013). Lo anterior nos permitió plantear un

estudio de acoplamiento molecular de estos compuestos con la AChE, usando el paquete computacional AutoDock.

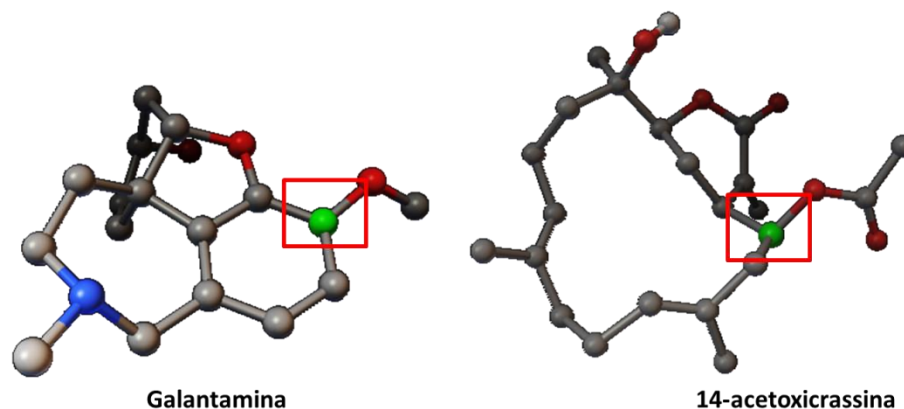
La optimización de las estructuras de los cembranos se llevó a cabo por métodos iterativos en gradiente, denominados métodos Quasi Newton, gracias a que estos métodos buscan los máximos y mínimos de la función o funciones que describen un sistema como tal (una molécula por ejemplo), donde las aproximaciones hacen que problemas con un gran número de variables tenga una solución aproximada, pero muy cercana al real, ahorrando en gran manera tiempo de cálculo. Este tipo de aproximaciones son utilizadas en la búsqueda de estructuras con mínimos de energía, por lo tanto se tienen estructuras energéticamente estables, que serán las utilizadas para los estudios por *docking*. En la figura 3.5 se muestran las estructuras del 14-acetoxicrassina (**1a**), styelólido (**1b**) y la galantamina (**64**) minimizadas por métodos Quasi Newton. Se optó por este método, ya que el estudio de acoplamiento molecular usado implica un cambio conformacional del inhibidor en la cavidad del sitio activo, por lo tanto una optimización completa de la estructura del inhibidor no sería necesaria.



**Figura 3.5** Moléculas en representación plana (A) y su optimización en 3D para realizar el estudio por *docking* (B).

Así, los inhibidores fueron trabajados en un sistema que nos los contempla con sustituyentes rotables, ya que la mayoría de los cembranos poseen enlaces que pueden

rotar dejando fijos los enlaces resaltados en el cuadro rojo de la figura 3.6, los cuales son determinados por el programa AutoDock. En cuanto a la enzima y su sitio activo, se mantuvo como un sistema estático. En esta aproximación estática solamente se evalúan las diferentes conformaciones que puede adquirir el ligando en el sitio activo, y sus interacciones y disposiciones espaciales en la cavidad del sitio activo.



**Figura 3.6** Estructuras de los compuestos modelo para los estudios preliminares, donde el recuadro en rojo corresponde a la posición rígida del compuesto.

### 3.3.1 Estudios preliminares

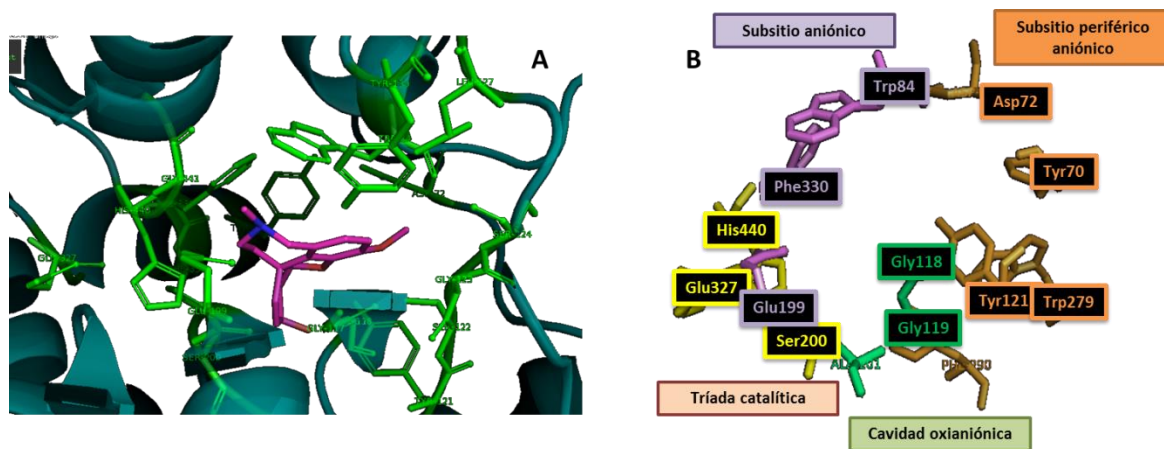
Para la AChE se usó un pdb obtenido con una enzima acomplejada con galantamina principalmente, además de otros acomplejantes como la *N*-Acetil-*D*-Glucosamina y tetraetilenglicol. Este archivo presenta una buena resolución, obtenida del estudio de difracción de rayos X (2,3 Å), lo que permitiría un estudio profundo en cuanto a sus interacciones con los cembranos. Si bien esta enzima fue aislada de un pez eléctrico, conocido como pez torpedo (*Torpedo californica*), sin embargo se sabe que enzimas de otras especies incluyendo a los mamíferos son similares en cuanto a su estructura primaria (Houghton et al. 2006, Khan 2009), por lo tanto es válido realizar un estudio *in silico* con esta enzima y extrapolar sus resultados a humanos por ejemplo. También se ha visto que la similitud entre la enzima presente en los insectos y los vertebrados está alrededor del 60 %, sin embargo en cuanto al sitio activo no hay gran diferencia, por consiguiente la actividad no se ve afectada de manera significativa entre las diferentes especies. Esta es una de las razones por la cual los insecticidas con agentes



anticolinérgicos son nocivos para otro tipo de especies, incluyendo al hombre (Harel et al. 2000).

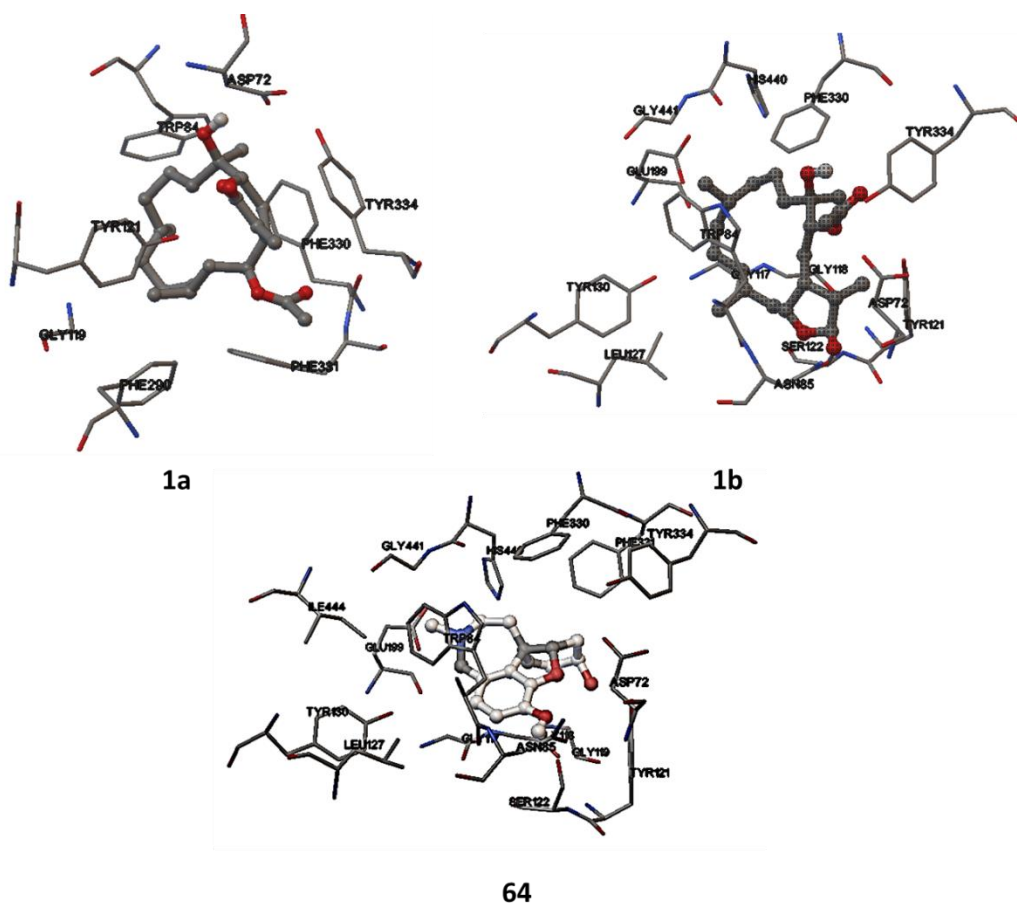
La importancia de la enzima AChE se debe a su participación en la sinapsis; sin embargo, se ha podido establecer que la butirilcolinesterasa (BuChE) también participa en este proceso. En cuanto a su forma y estructura, AChE y BuChE presentan una similitud cercana al 65 % lo que explica su intervención en procesos sinápticos (Çokuğraş. A 2003). Esto puede traer consigo que los compuestos que se trabajan en este estudio puedan presentar interacciones con la AChE y la BuChE, sin embargo la selección de un patrón selectivo a la AChE puede ser un indicio que este patrón de comparación sea apropiado en cuanto a la selectividad de una enzima sobre la otra. No obstante, la selectividad deberá ser probada experimentalmente con una butirilcolinesterasa apropiada.

Una vez seleccionado el modelo de la enzima a trabajar se buscó determinar si los cembranos son capaces de interactuar con el sitio activo de la enzima, y de hacerlo con qué partes lo hace. Para esto se realizaron ensayos *in silico* con los compuestos modelo galantamina (**64**) (control positivo del ensayo), 14-acetoxicrassina (**1a**), styelólido (**1b**) (cebranos de referencia) y acetilcolina (sustrato natural de la enzima) para determinar qué residuos de aminoácidos interactúan con las moléculas a estudiar (los inhibidores). Los ensayos de *docking* con la galantamina mostraron que los aminoácidos que participan del acoplamiento corresponden a los reportado en literatura (Houghton et al. 2006), por lo tanto se pudo establecer que nuestro sistema funcionaba correctamente (Figura 3.7).



**Figura 3.7** A) Acoplamiento de la galantamina (**64**) (morado) en el sitio activo de la enzima, mostrando los residuos de aminoácidos (verde) en la enzima AChE (aguamarina). B) Secciones de la cavidad del sitio activo donde participan los inhibidores.

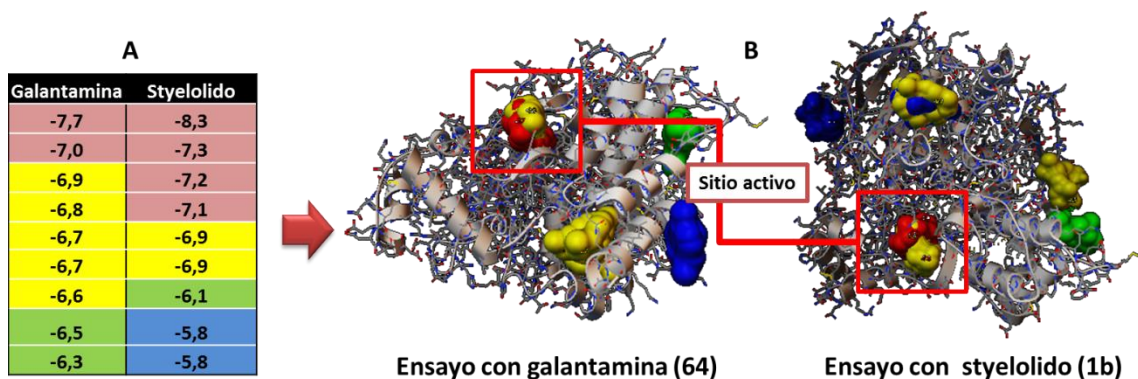
De acuerdo con los ensayos realizados, se pudo determinar que el cembrano **1a** interactúa con los residuos Asp 72, Trp 84, Gly 119, Tyr 121, Phe 290, Phe 330, Phe 331 y Tyr 334; en cuanto al cembrano **1b** interactúa con los residuos Asp 72, Trp 84, Asn 85, Gly 117, Gly 118, Tyr 121, Ser 122, Leu 127, Tyr 130, Glu 199, Phe 330, Tyr 334 e His 440; en el caso de la galantamina (**64**) se estableció que interactúa con la Asp 72, Trp 84, Asn 85, Gly 117, Gly 118, Gly 119 Tyr 121, Ser 122, Leu 127, Tyr 130, Glu 199, Phe 330, Phe 331, Tyr 334, His 440 y Gly 441. De lo anterior, se observa que en general interactúan con los mismos residuos del sitio activo, y también muestran gran afinidad por éste (Figura 3.8), sin embargo a mayor polaridad hace que haya mayor afinidad a los residuos como serina, histidina y tirosina, y a menor polaridad la afinidad es favorecida con residuos de fenilalanina, triptófano y glicina.



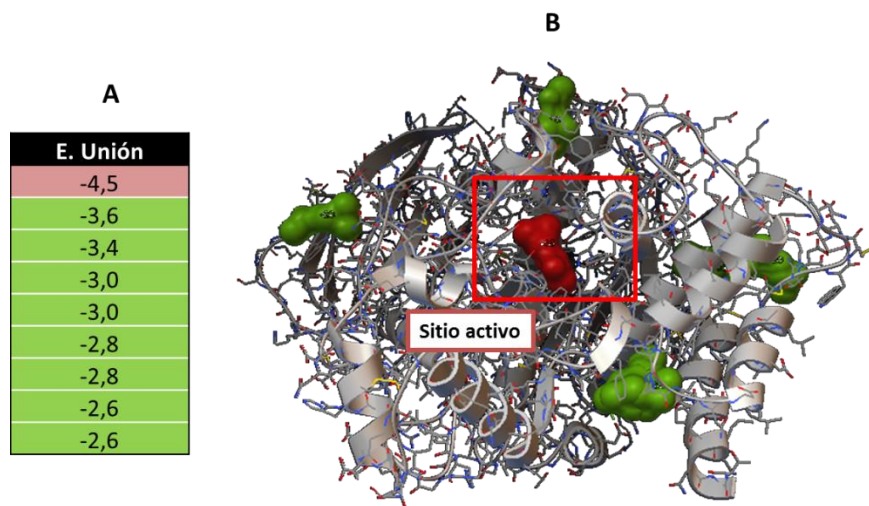
**Figura 3.8** Residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo que interactúan con los cembranos de referencia (**1a** y **1b**) y el control positivo (Galantamina, **64**).

Con lo anterior se pudo establecer que **1a** y **1b** presenta interacciones con el sitio activo de la enzima; sin embargo, se debe establecer si éstos son capaces de llegar al sitio activo. Para esto se realizó un estudio por *docking* de manera global, buscando determinar si estos compuestos son más afines con el sitio activo o con otros lugares de la enzima, es decir se buscaba establecer si estos inhibidores serían capaces de llegar al sitio activo de la enzima, o si se quedaría en otras partes de la macromolécula. Las dimensiones para delimitar el sistema (Grid) fueron de 120 x 120 x 120 Å, las cuales fueron lo suficientemente grandes para abarcar entre el 95 y el 99 % de la totalidad de la enzima (Figura 3.4). El ensayo se realizó con la enzima sin flexibilidad en sus residuos, solamente se calculó energía de unión del compuesto con los posibles sitios de interacción. Los resultados fueron visualizados mediante AutoDock Tools, lo que permitió

graficar con una escala de colores la afinidad de la galantamina (**64**) y el styelólido (**1b**) con los diferentes sitios de la enzima; en el caso del 14-acetoxicrassina (**1a**), los valores de energía de unión fueron por encima de  $-5,7$  kcal/mol, mayores a los presentados por **64** y **1b**, sin embargo es afín al sitio activo de la enzima, como en el caso de **1b**. En rojo se graficaron los valores más bajos de energía de unión (entre  $-8,0$  y  $-7,0$  kcal/mol), en amarillo los valores de energía bajos (entre  $-6,9$  y  $-6,6$  kcal/mol), en verde se graficaron valores de energía de unión intermedios (entre  $-6,5$  y  $-6,0$  Kcal/mol), y en azul los valores de energía de unión más altos (mayores a  $-6,0$ ). Así, se pudo observar que en rojo y amarillo se indican los sitios de la enzima por la cual son más afines los compuestos evaluados, siendo evidente que tanto la galantamina como los cembranos usados como referencia son muy afines al sitio activo de la enzima (Figura 3.9B). Es más, estos inhibidores presentan una interacción más fuerte con el sitio activo que la acetilcolina (Figura 3.10), el neurotransmisor que es hidrolizado por la enzima de manera natural. Es de notar que el neurotransmisor presenta una afinidad con el sitio activo mucho menor que **1a**, **1b** y **64**, sin embargo interactúa con otras zonas de la enzima.



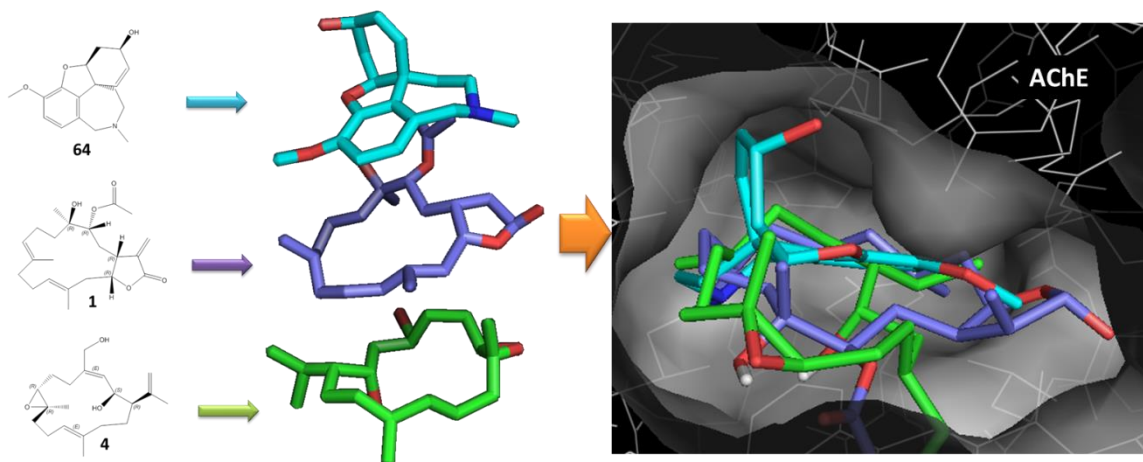
**Figura 3.9** A) Resultados obtenidos del acoplamiento molecular (valores de energía de unión, en kcal/mol) de la galantamina y los cembranos de referencia usando AutoDock Vina, usando un grid de  $120 \times 120 \times 120$  Angstroms. B) Gráfico de afinidad de la galantamina y los cembranos **1a** y **1b** con las diferentes zonas de la AChE.



**Figura 3.10** Valores de energía de unión en kcal/mol de la acetilcolina en la enzima, el recuadro indica el sitio activo. En rojo se ubica el neurotransmisor en el sitio activo, en verde se encuentran las diferentes interacciones del neurotransmisor en la enzima.

El siguiente paso del estudio buscaba determinar si era posible trabajar con un grid que solamente incluyera la zona del sitio activo, o si era necesario usar el grid que involucrara toda la enzima como se hizo antes, buscando ahorrar tiempo y consumo de recursos computacionales. Para esto se realizaron estudios globales (como se explicó anteriormente) y estudios con un grid de 40 x 40 x 40 Å que incluyera toda la cavidad del sitio activo (triada catalítica, cavidad oxianiónica, subsitio aniónico y subsitio periférico aniónico). Este cambio permitía que los tiempos de cálculo fueran del orden de 1 a 2 h por molécula, en contraste con las 2-2,5 horas que requiere el estudio global. Los resultados mostraron que las dos metodologías daban resultados similares por lo que el grid más pequeño fue el usado para los estudios posteriores.

Todos estos estudios preliminares *in silico* mostraron que tanto la galantamina y los cembranos **1a** y **1b** funcionan adecuadamente como inhibidores de AChE, lo que fue corroborado con ensayos experimentales realizados en el capítulo 2. Lo anterior puede ser explicado porque el tamaño del patrón (**64**) y el de los cembranos **1b** y **4** es muy similar, además la disposición que adoptan en el espacio es también muy parecida, por lo que sus interacciones con el sitio activo también son similares (Figura 3.11)



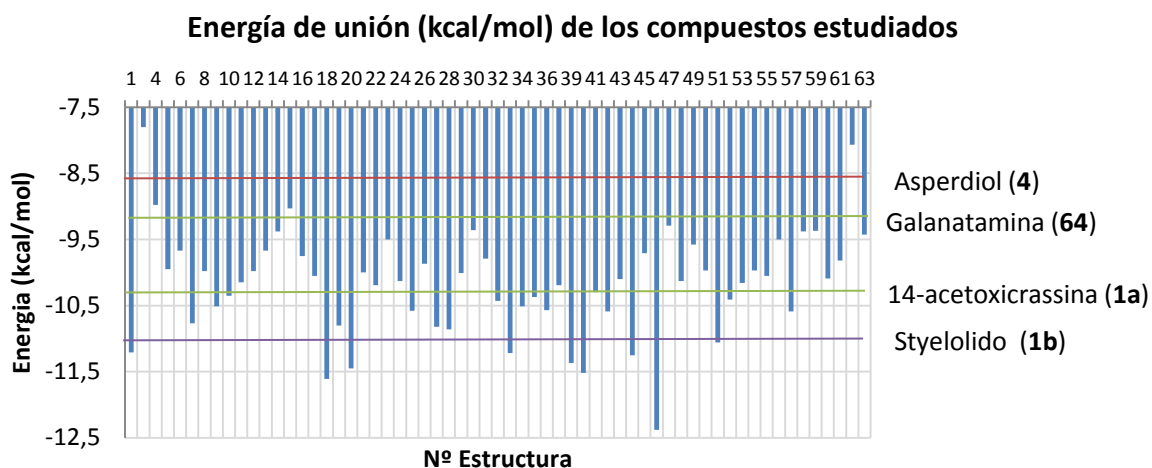
**Figura 3.11** Estructuras en 3D del patrón positivo (**64**), y los cembranos styelólido (**1b**) y asperdiol (**4**), y su conformación en la cavidad del sitio activo. Estos corresponden a compuestos activos en el ensayo de inhibición.

### 3.3.2 *Docking* en sistema rígido

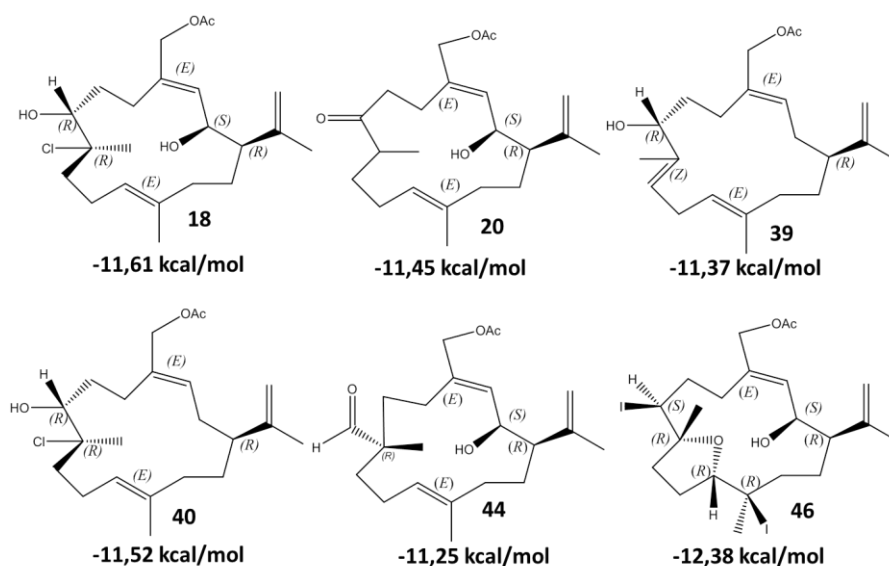
Una vez establecida la metodología del *docking* con las moléculas modelos mostradas anteriormente, se buscó evaluar otros cembranos usando el mismo modelo de sistema rígido, es decir el que emplea un sistema que mantiene fijos (rígidos) los residuos de aminoácidos presentes en el grid, mientras a la molécula a evaluar (cebrano) se le permite adquirir diferentes conformaciones. Por lo tanto al cembrano a evaluar se le permiten cambios conformacionales (torsiones y flexiones) para su acoplamiento con el sitio activo.

La optimización de las estructuras de estos diterpenos se llevó a cabo mediante métodos iterativos en gradiente, el cual es un método que busca optimizar el cálculo de las funciones de estado de la molécula, usando métodos matemáticos como la derivación de funciones para encontrar los mínimos de energía del sistema. Los cálculos no se hicieron a nivel *ab-initio* o DFT, pues durante estos análisis por *docking* se suceden arreglos conformacionales de la molécula estudiada durante su interacción con el sitio, y así el resultado de los análisis por DFT cambiaría, haciéndolo innecesario.

Una vez optimizadas las estructuras se llevaron los análisis por *docking* usando los mismos parámetros que los empleados para los cembranos **1a** y **1b** en el análisis preliminar, y empleando un grid 40 x 40 x 40 Angstrom. Las energías de unión se muestran en la figura 3.12, y los resultados arrojados por el programa para cada molécula se pueden consultar en la tabla A.2 del anexo. Se pudo observar que los valores varían entre -9,5 y -11 kcal/mol, siendo todos mucho menores que los obtenidos para la acetilcolina (-4,5 kcal/mol) lo que indica que son más afines que ésta por el sitio activo. De otro lado se pudo observar que muchos cembranos resultaron tener valores de energía de afinidad más bajo que la galantamina (-9,6 kcal/mol), el control positivo empleado (Figura 3.12), por lo tanto se podría esperar que sean mejores inhibidores que ésta. Así mismo se observó que el asperdiol (**4**) no resultó ser tan afín con el sitio activo (-9,0 Kcal/mol), a pesar de que en los ensayos en placa se había visto que era un potente inhibidor (capítulo II). Finalmente, el styelólido (**1b**) mostró ser uno de los compuestos con menor energía de afinidad (-11,2 kcal/mol), y sólo unos pocos derivados parecen ser más activos que él, a saber: los cembranos (-)-(1*R*,2*S*,7*R*,8*R*,3*E*,11*E*)-8-Cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-2,7-diol (**18**) (-11,61 kcal/mol), (+)-(1*R*,2*S*,3*E*,11*E*)-18-Acetoxicembra-7-ceto-3,11,15(17)-trien-2-ol (**20**) (-11,45 kcal/mol), (-)-(1*S*,7*R*,3*E*,8*Z*,11*E*)-18-Acetoxicembra-3,8,11,15(17)-tetraen-7-ol (**39**) (-11,37 kcal/mol), (+)-(1*S*,7*R*,8*R*,3*E*,11*E*)-8-Cloro-18-acetoxicembra-3,11,15(17)-trien-7-ol (**40**) (-11,52 kcal/mol), (-)-(1*R*,2*S*,3*E*,11*E*)-18-Acetoxicembra-2-hydroxy-3,11,15(17)-trien-8-al (**44**) (-11,25 kcal/mol) y (-)-(1*R*,2*S*,7*S*,8*R*,11*R*,12*R*,3*E*)-18-Acetoxicembra-7,12-diiodo-8,11-oxa-3,15(17)-dien-2-ol (**46**) (-12,38 kcal/mol), sus estructuras se presentan en la Figura 3.13.



**Figura 3.12** Energías de unión (kcal/mol) obtenidas para la interacción de los diterpenos con el sitio activo. Las líneas corresponden al valor obtenido por cada uno de los referentes: galanatina (**64**), 14-acetoxicrassina (**1a**), styelólido (**1b**) y asperdiol (**4**).



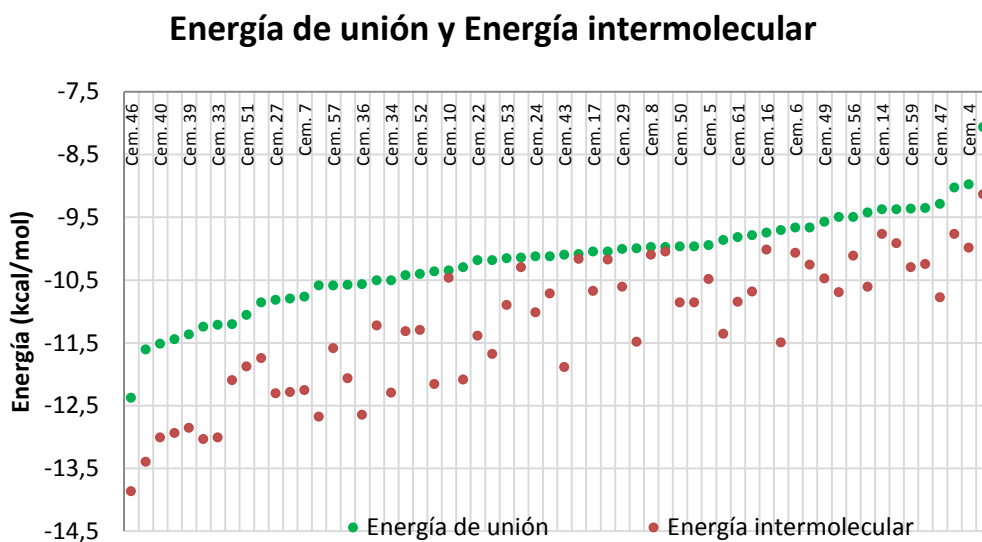
**Figura 3.13** Compuestos que dieron valores de energía de unión al sitio activo de la AChE más bajos que el styelólido (**1b**) (-11,21 kcal/mol) en el estudio por *docking* en sistema rígido.

La energía de unión se entiende como la suma de la energía intermolecular con la energía libre de torsión. La energía intermolecular está mediada principalmente por

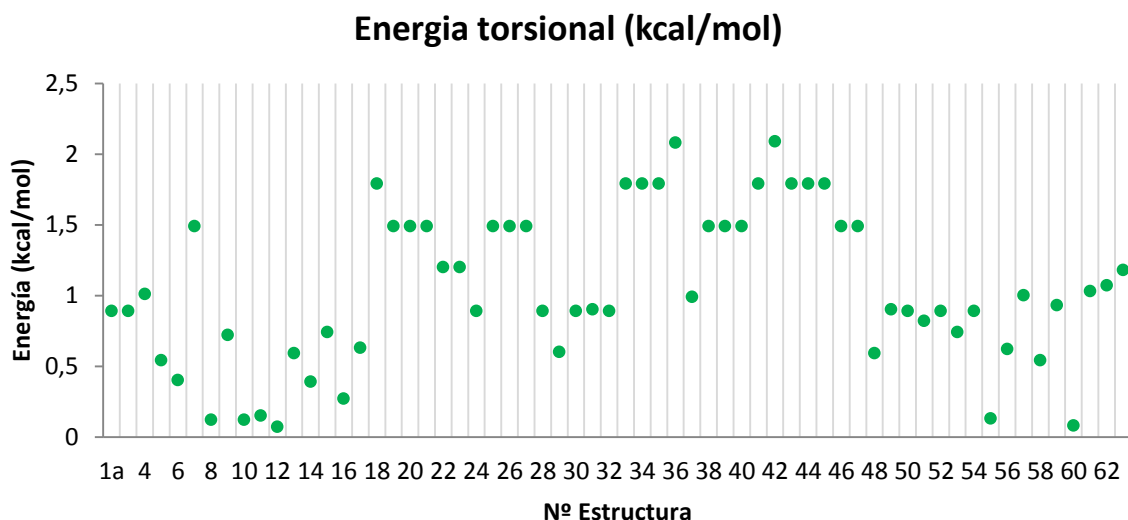


interacciones del tipo puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals; además de las energías de solvatación y electrostáticas. Estas interacciones son muy importantes a la hora de entender la unión entre el compuesto evaluado y el sitio activo. Por su parte, la energía libre de torsión está dada por la rotación o no de uno o más grupos del ligando (en este caso el inhibidor). Lo anterior de acuerdo a las definiciones y parámetros de Autodock.

La diferencia entre la energía de unión y la energía intermolecular corresponde a la energía libre de torsión, y se puede observar que en términos generales ésta se hace más pequeña cuanto menos afín es el compuesto al sitio activo del inhibidor (compuestos graficados a la derecha de la figura 3.14). Estas energías de torsión son positivas y representan la repulsión entre átomos del inhibidor y los de los residuos del sitio activo. Estas repulsiones están relacionadas con los fenómenos de flexión del anillo del cembranoide, y la torsión de los grupos presentes en su estructura, que son debidas a los cambios conformacionales del inhibidor durante el proceso de acoplamiento (Figura 3.15).



**Figura 3.14** Comparación entre energías de unión y energía intermolecular obtenidas a partir de los cálculos de acoplamiento molecular, del más al menos afín (de izquierda a derecha).



**Figura 3.15** Energía libre torsional presentada por los cebranos estudiados.

Las estas estructuras de los cebranos evaluados presentan diferencias en cuanto a los grupos funcionales y la estereoquímica en algunos centros asimétricos, estos parámetros se relacionan con la afinidad de las moléculas con los residuos de la cavidad del sitio activo, determinando su capacidad de inhibir la enzima. La influencia de estas diferencias estructurales sobre la actividad será presentada a continuación.

### 3.3.3 Relación entre la estructura y la interacción con el sitio activo

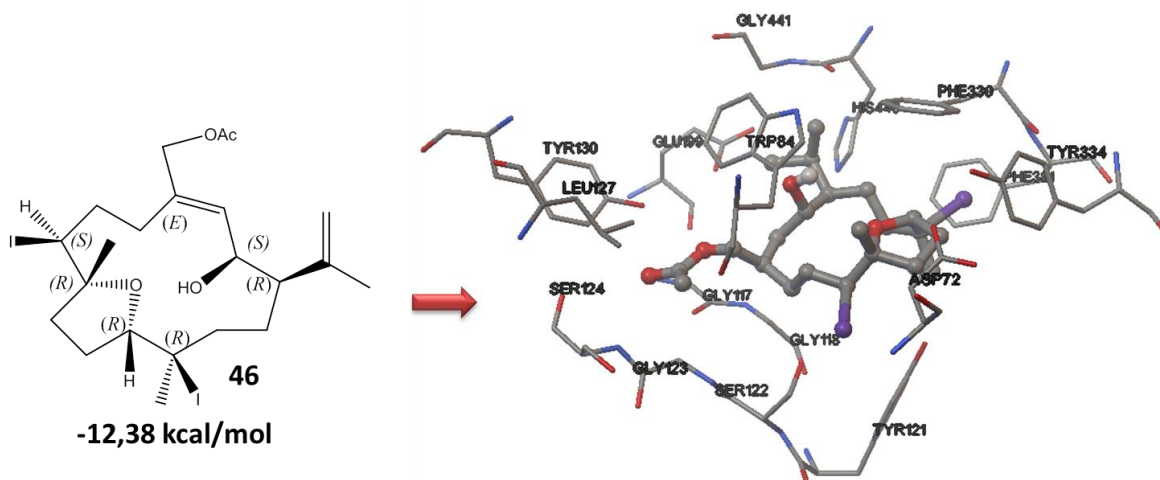
De acuerdo a los datos obtenidos de energía de unión entre el inhibidor y la cavidad del sitio activo, se encuentran en general tres grupos de acuerdo a la afinidad, donde los mas afines se encuentran en valores cercanos a -11,0 kcal/mol, los medianamente afines con valores cercanos a 10, 5 kcal/mol, y los menos afines con valores de energía de unión cercanos a 9,5 kcal/mol.

#### 3.3.3.1 Efecto de grupos funcionales

Los grupos funcionales en la estructura determinan las interacciones de ésta con el sitio activo. Así, al observar las estructuras de los compuestos con menor energía de unión

(Figura 3.15) se evidencia la presencia de grupos acetato en C-18, hidroxilos en C-2, así como la de halógenos; sin embargo, la complejidad de las estructuras dada no solo por estereoquímica, sino también por la flexibilidad del anillo hacen que la relación estructura-actividad sean compleja de interpretar.

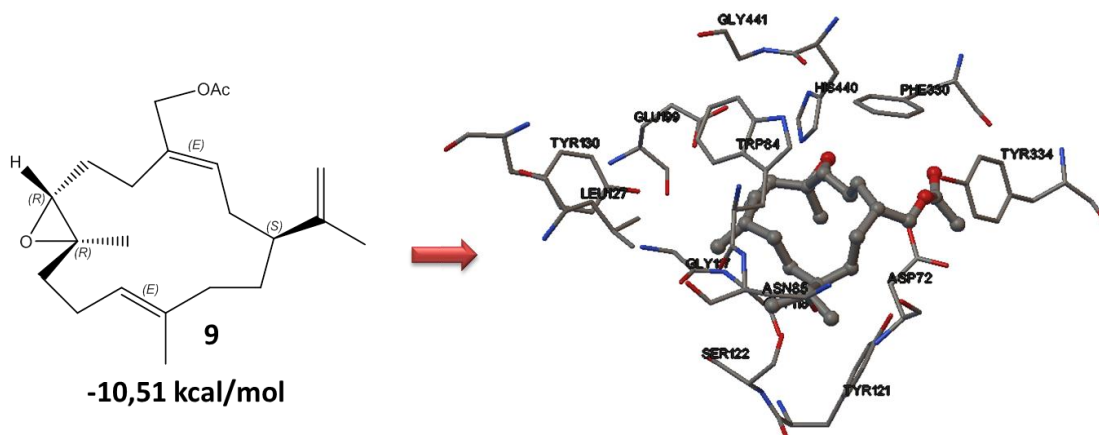
El análisis *docking* para **46** mostró que él es el de menor energía de unión, e hizo evidente que: el acetato sobre C-18 presenta un puente de hidrógeno con el OH de la serina 124; el yodo en C-12 interactúa con el OH de la tirosina 334; además de la interacción mediante fuerzas de Van der Waals entre el esqueleto del cembrano con los residuos de fenilalanina y triptófano presentes en el sitio activo (Figura 3.16).



**Figura 3.16** Acoplamiento del cembrano más activo (**46**) con el sitio activo de la enzima

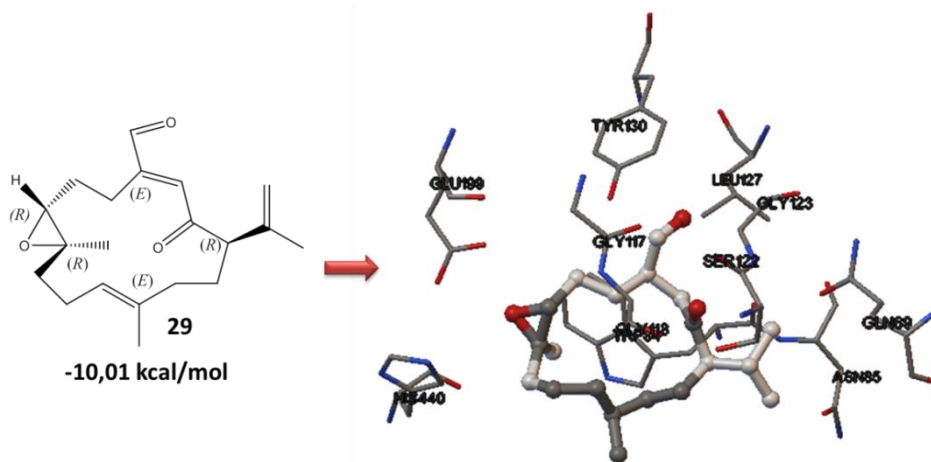
En el caso del styelólido (**1b**) se pueden observar interacciones similares a las presentadas por **46**; sin embargo, la presencia de la lactona en **1b** hace que haya una interacción adicional por puentes de hidrógeno con el OH de la serina 122, sin embargo en **1a** la lactona no interactúa con este residuo, dado por el cambio en la posición de la lactona en la estructura del cembrano; en cuanto a interacciones tipo puente de hidrógeno, el grupo acetato de **1b**, interactúa con el OH del residuo de tirosina 334 tanto como la lactona de **1a** con este mismo residuo. Todas éstas interacciones (puentes de hidrógeno más que todo) llevan a cambios en la orientación del cembrano con respecto a **46** para poder obtener un mejor acoplamiento con los residuos del sitio activo. Así, los





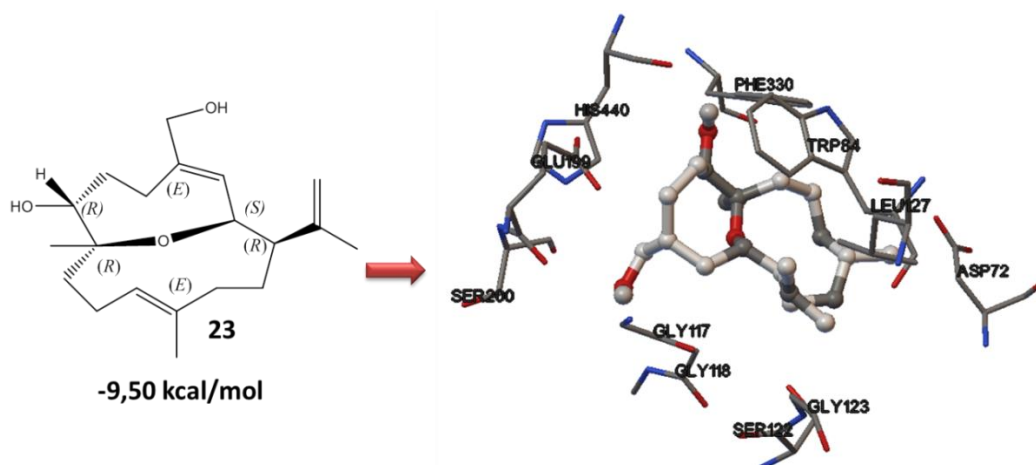
**Figura 3.18** Interacción del cembrano **9** con los residuos del sitio activo de la enzima.

Entre los compuestos con menor afinidad que los anteriores, tercer grupo, se evidencia la ausencia del grupo acetato en C-18, como en el caso del cembrano **29** que en vez de un grupo acetato tiene un aldehído en este carbono. En este caso el carbaldehído en C-18 interactúa con la tirosina 130, y no con los residuos de serina, como sí lo hacen los compuestos que tienen acetatos sobre C-18. Así mismo, el carbonilo en C-2 de **29** interactúa con el residuo de serina 122, mientras que el epóxido en C-7 y C-8 interactúa con los residuos de histidina 440 y ácido glutámico 199. Los residuos de fenilalanina y triptófano siguen siendo importantes en cuanto a las interacciones con la parte hidrocarbonada del cembrano. (Figura 3.19) No obstante las interacciones antes descritas, sus afinidades son menores que la observada para los cembrano de los grupos uno y dos antes descritos.



**Figura 3.19** Acoplamiento del cembrano **29** con el sitio activo de la enzima AChE.

Finalmente, la presencia de grupos hidroxilados en la estructura del cembrano **23** ((-)-*(1R,2S,7R,8R,3E,11E)*-2,8-Oxa-cembra-7,18-diol) (en C-2, C-7 y C-11) hace que haya una interacción con la triada catalítica (serina 200, ácido glutámico 199 e histidina 440), que es el sitio activo en sí mismo; sin embargo, no se ven interacciones con los residuos de tirosina, como sí se observa en los cembranos más afines. En cuanto a las interacciones con los residuos aromáticos permanecen permitiendo que la orientación de los cembranos no sufra modificaciones apreciables. (Figura 3.20). Todo esto muestra que los sustituyentes oxigenados representan un gran aporte en cuanto a la actividad inhibitoria de los cembranos estudiados.

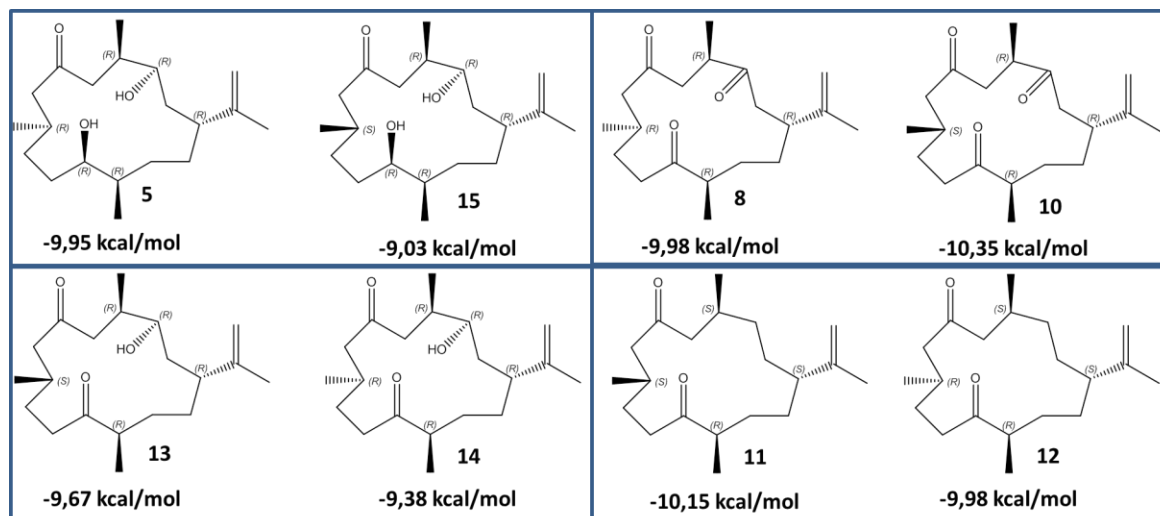


**Figura 3.20** Interacción del compuesto **23** a los residuos de la cavidad del sitio activo.

### 3.3.3.2 Estereoquímica e interacción con el sitio activo

La influencia de sustituyentes como el acetato, los halógenos, el hidroxilo y epóxidos es importante en cuanto a la energía de unión del terpeno y la cavidad del sitio activo de AChE, tal y como se ilustró en los párrafos anteriores. De otro lado, es de esperarse que la estereoquímica de los diferentes sustituyentes también sea importante, tal y como se ha descrito en la literatura para otros compuestos y otras actividades biológicas (Mori 2011). En este estudio se contaba con cuatro parejas de epímeros en el carbono 8. La primer pareja de epímeros corresponden a los compuestos **5** (*8R*-dihidroplexauroлона) (-9,95 kcal/mol, configuración *S*) y **15** (*8S*-dihidroplexauroлона) (-9,03 kcal/mol, configuración *R*), donde el de valor más bajo de energía de unión corresponde al compuesto **5**, de configuración *S* en C-8; en los otros tres casos de parejas de epímeros

(8 y 10; 13 y 14; y 11 y 12) también se encontró que el cembrano más afín es el que tiene estereoquímica S en C-8. (Figura 3.21).



**Figura 3.21** Estructuras de epímeros en C-8 estudiados por *Docking* junto con el resultado de energía de unión del acoplamiento del compuesto con el sitio activo. Se observa que los de estereoquímica S tienen menor energía de interacción.

Como conclusión general de esta parte del estudio se puede decir que los cembranos pueden acoplarse en la cavidad del sitio activo, y que la actividad inhibitoria se relaciona con la presencia de grupos acetato en C-18, epóxidos en C-7 y C-8, hidroxilos en C-2 y C-7, y la presencia de halógenos, además la estereoquímica S en C-8 de la estructura favorecen el acoplamiento entre el cembrano y la cavidad del sitio activo.

### 3.3.4 *Docking* en un sistema flexible

Como se dijo anteriormente, el estudio de acoplamiento en un sistema rígido limita sus resultados solamente a las interacciones entre el inhibidor y el sitio activo; en un sistema flexible, se tiene en cuenta las diferentes conformaciones de los residuos de la cavidad del sitio activo y las diferentes conformaciones del inhibidor estudiado. La posibilidad de que varíen de los resultados obtenidos en un sistema rígido depende de las interacciones y repulsiones que se presentan en un sistema dinámico. En AutoDock se establecen los parámetros para determinar la flexibilidad de los residuos; en cuanto a las condiciones de

estudio se mantienen las dimensiones del Grid y los parámetros predeterminados por AutoDock para estos sistemas flexibles. Los cálculos realizados en sistema flexible, mostró algunas diferencias en cuanto al sistema rígido, donde se obtuvieron valores altos de energía de unión, algunos de ellos bastante altos, por lo tanto no se tuvieron en cuenta la totalidad de las estructuras modeladas, (**2, 5, 12, 14, 21, 23, 24, 26, 27, 31, 32, 36, 37, 38, 42, 43, 45, 53, 54, 59, 62**) lo cual no son adecuados en el estudio de acoplamiento (valores de dos a tres magnitudes mayores al promedio de -4,0 kcal/mol aproximadamente) (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Valores de energía intermolecular (E. I.), energía libre de torsión (E. L. Tors) y energía de unión (E. T) de los diferentes cembranos estudiados por *docking* en sistema flexible, energías dadas en kcal/mol.

Cembrano	E. I.	E. L. Tors	E. T	Cembrano	E. I.	E. L. Tors	E. T
1a	-7,22	0,82	-6,40	30	-5,00	0,82	-4,18
1b	-6,08	0,82	-5,26	33	-7,66	1,65	-6,01
2a	-3,37	1,79	-1,58	34	-2,58	1,65	-0,93
2b	8,61	1,79	10,40	35	-5,36	1,65	-3,71
4	-7,41	1,10	-6,31	39	-2,71	1,37	-1,34
6	8,18	1,65	9,83	40	-1,98	1,37	-0,61
7	-7,27	1,37	-5,90	41	-5,52	1,65	-3,87
8	-7,49	0,27	-7,22	44	-3,09	1,65	-1,44
9	-4,83	1,10	-3,73	46	7,33	1,37	8,70
10	2,93	0,27	3,20	47	-8,75	1,37	-7,38
11	-7,80	0,27	-7,53	48	-5,56	0,55	-5,01
13	-7,07	0,82	-6,25	49	-7,10	0,82	-6,28
15	-6,05	0,82	-5,23	50	-5,10	0,82	-4,28
16	-8,97	0,55	-8,42	51	-7,64	1,92	-5,72
17	-7,24	0,82	-6,42	52	-3,67	1,92	-1,75
18	-3,11	1,65	-1,46	56	-9,61	0,82	-8,79
19	-6,92	1,37	-5,55	57	-3,33	1,37	-1,96
20	-4,35	1,37	-2,98	58	-8,08	1,10	-6,98
22	-5,12	1,10	-4,02	60	-7,90	1,10	-6,80
25	-6,94	1,37	-5,57	61	-1,75	1,37	-0,38
28	-7,82	0,82	-7,00	63	-7,11	1,37	-5,74
29	-8,80	0,55	-8,25	64	-8,76	0,27	-8,49

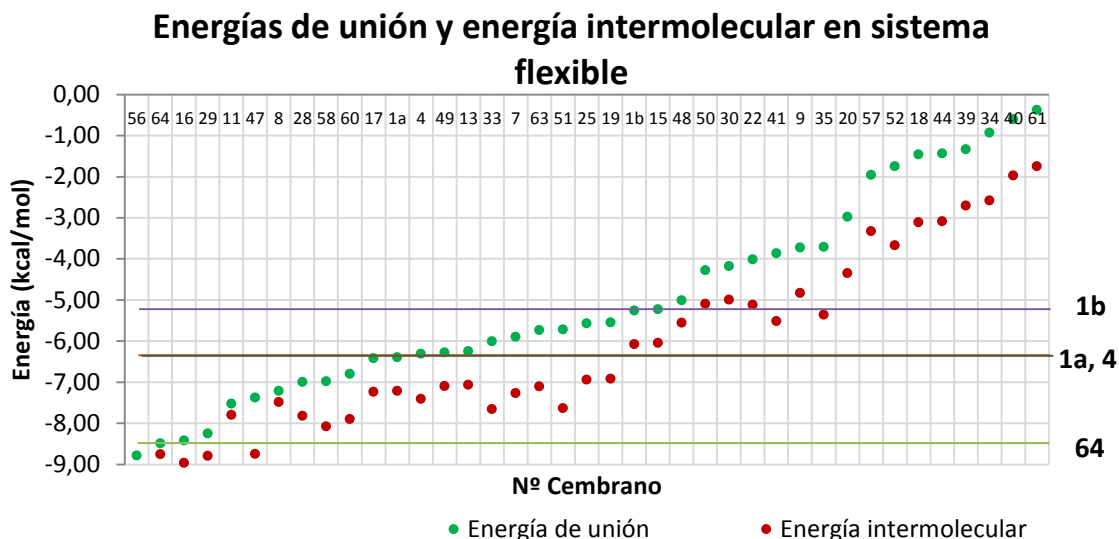


Los datos de energía de unión obtenidos en el sistema flexible son más altos que los obtenidos mediante el sistema rígido, puesto que se consideran los aportes de energía que se obtienen por la dinámica de los residuos presentes en la cavidad del sitio activo. La energía libre de torsión se mantiene un rango no mayor a +2 kcal/mol, similar al presentado en el sistema rígido. Lo anterior es congruente con el hecho de que este tipo de energía está más relacionada con el compuesto como tal, que con el sitio activo, ahora flexible.

En cuanto a los valores de energía intermolecular, la cual comprende las interacciones Van der Waals, puentes de hidrógeno y energías electrostáticas son levemente más bajas que la energía de unión entre el inhibidor y los residuos de la cavidad del sitio activo; en comparación con el comportamiento mostrado cuando se considera rígido el sistema.

Al observar la figura 3.21, donde se grafica la energía de unión y la energía intermolecular de sistema para cada cembrano, los cuales fueron ordenados de más afín a menos afín (con el sitio de unión), se puede observar que estas energías mantienen la misma tendencia, son casi dos líneas paralelas), lo que no se observó al hacer este mismo análisis cuando se consideró rígido el sistema (Figura 3.13). Así mismo, los valores de energía intermolecular y la energía de unión son muy cercanos (aprox 0,5 kcal/mol) para los cembranos más afines al sitio activo (parte izquierda de la gráfica), y la diferencia en el valor se hace mayor (alrededor de 2 kcal/mol) para los cembranos menos afines (parte derecha de la gráfica).

Estas diferencias obedecen a las posibles rotaciones de los enlaces que puedan presentar algunos sustituyentes en el anillo cembranoide, aumentan la energía del sistema, y por lo tanto afectan disminuyendo la afinidad con la cavidad del sitio activo (Figura 3.22).



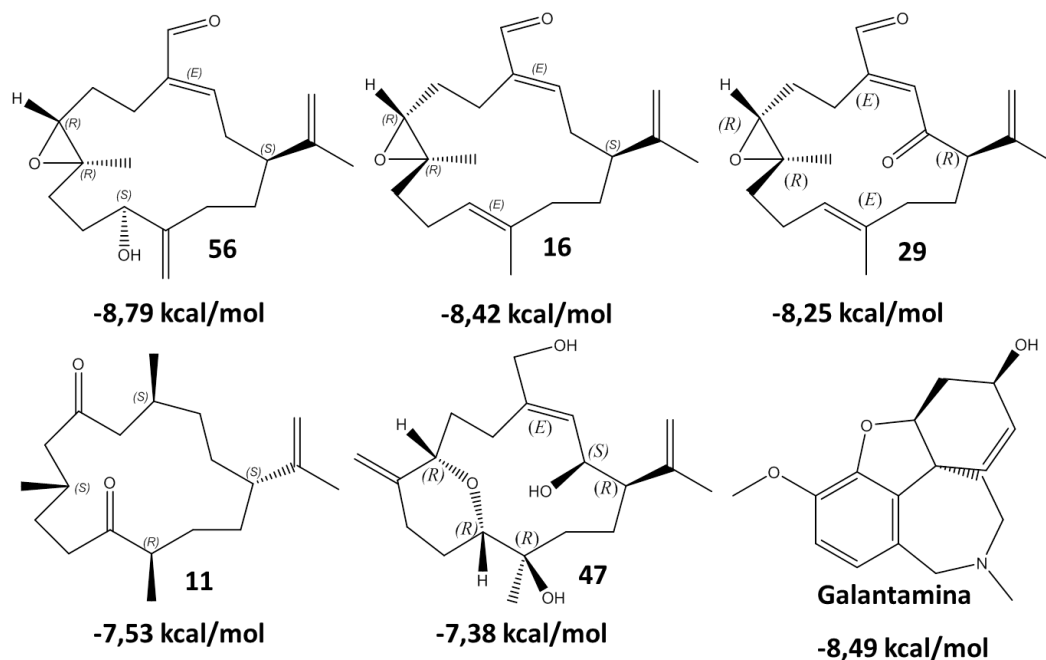
**Figura 3.22** Valores de Energía de unión vs. Energía intermolecular de los cembranos estudiados, obtenidos por Docking en un sistema flexible.

Los valores de afinidad dados para el sistema flexible presentan diferencia respecto al sistema rígido, donde se puede dar que la galantamina (**64**) es mucho más afin a la cavidad del sitio activo, seguido por el 14-acetoxicrassina (**1a**), el asperdiol (**4**) y el styelolido (**1b**); en cuanto a los demás compuestos, se puede ver que varios han sido más afines en sistema flexible que lo visto en el sistema rígido.

De acuerdo con los datos obtenidos de energía de unión, los compuestos que presentan mayor afinidad con el sitio activo de la AChE son los compuestos **56**, **16**, **29**, **11**, **47** y la galantamina (Figura 3.23).

Los compuestos más afines en este sistema presentan algunas similitudes en cuanto a grupos funcionales, tal es el caso de carbonilos en la posición C-18 y epóxido en carbonos 7 y 8. No obstante también se observó que otros compuestos afines a sitio activo tienen grupos hidroxilos y carbonilos en su estructura, pero no se pueden hacer generalizaciones al respecto. En cuanto a la interacción con la cavidad del sitio activo, la mayoría de los cembranos ensayados interactúan con el subsitio periférico aniónico, dado que interactúan con los residuos de Asp 72, Trp 84, Tyr 130 y Trp 279. Este

resultado muestra que la mayoría de los cembranos inhibe la enzima en el subsitio periférico aniónico, algo muy común en inhibidores utilizados como medicamentos contra el AD (Pohanka 2011).



**Figura 3.23** Cembranos más afines, junto con la galantamina, en el estudio por Docking en sistema flexible

En un segundo grupo de compuestos, con un rango de afinidad de entre -7,0 y -4,0 kcal/mol; se observó que la interacción entre el cembrano y el sitio activo se da a través de los grupos oxigenados en C-2, lo mismo que en el C-7. No obstante, algunos compuestos de este grupo muestran la presencia de un epóxido en C-7 y C-8; en el caso de los compuestos **1a** y **1b**, las interacciones se dan con la lactona presente en la estructura del cembrano, siendo más afín el compuesto **1a**. Finalmente, en un tercer grupo de compuestos con energías de unión oscilan entre -4,0 y -0,3 kcal/mol se observa la presencia de como un grupo acetato en C-18. Ejemplos de las interacciones con la cavidad del sitio activo se pueden observar en las figuras 3.24, 3.25 y 3.26.

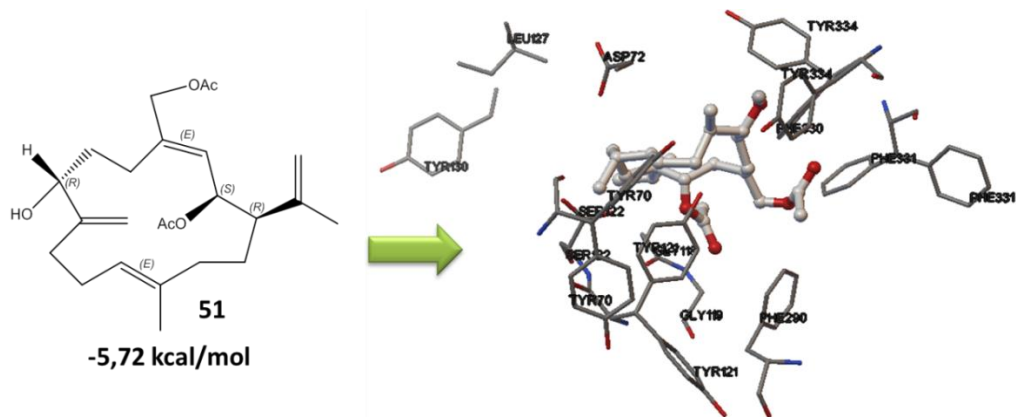


Figura 3.24 Compuesto 51 que presenta valores cercanos a -5 kcal/mol

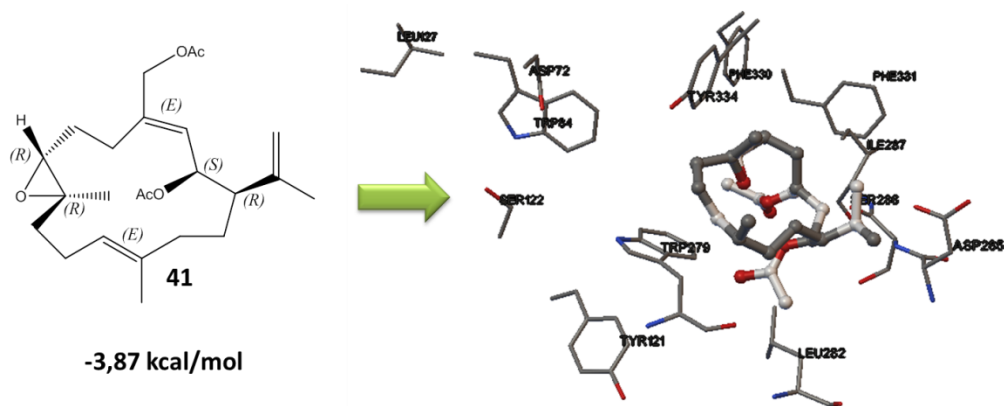
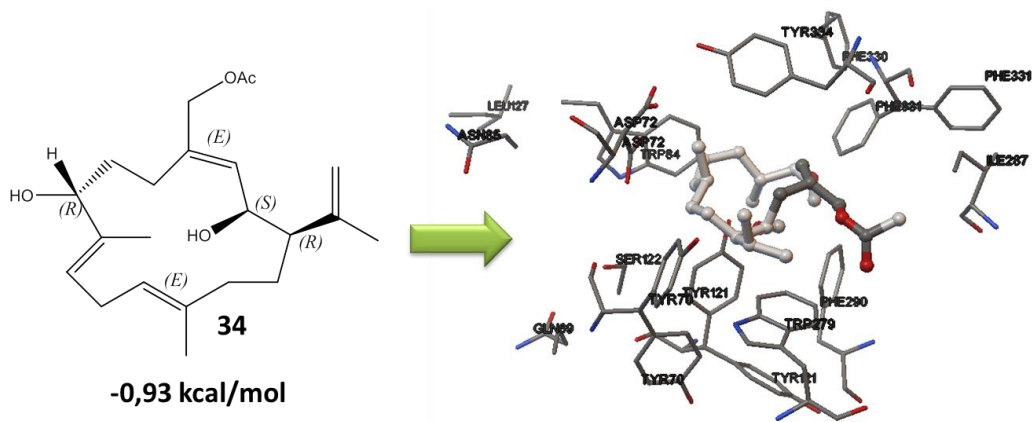
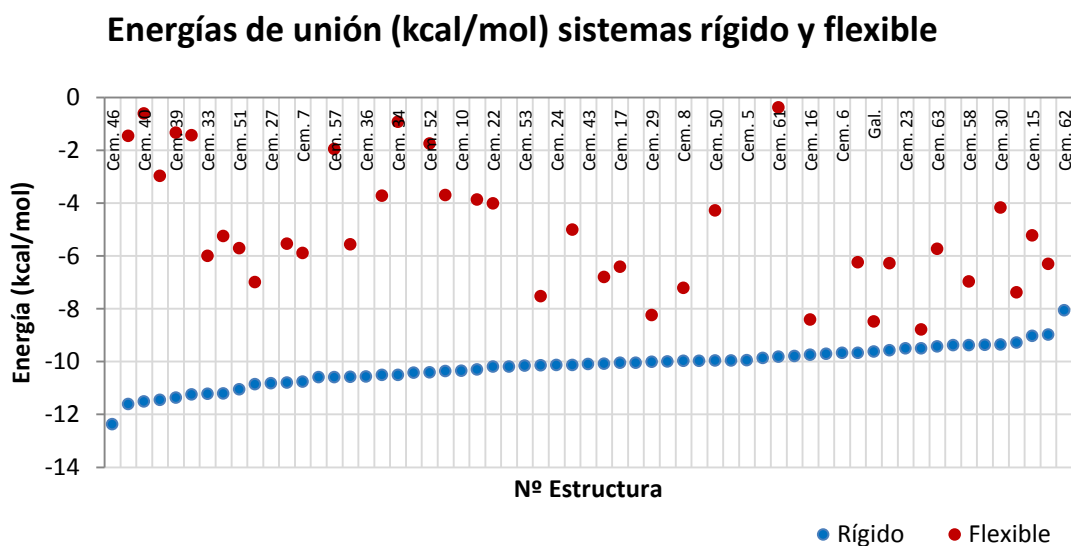


Figura 3.25 Compuestos 41 que presenta energía de unión de -3,87 kcal/mol.



**Figura 3.26** Cembrano 34, que presenta energía de unión alta en comparación con los demás cembranos ensayados, por lo tanto menos afín a la cavidad al sitio activo.

Los valores de energía de unión en sistema flexible muestran una tendencia prácticamente opuesta a la mostrada en los valores del sistema rígido, por lo tanto hay mayor afinidad en compuestos que no eran tan afines en el sistema rígido. El sistema flexible calculó energías de unión mayores (entre 0 y -9 kcal/mol) a las calculadas con en el sistema rígido (entre 0 y -12 kcal/mol), ya que los residuos de aminoácidos de la cavidad del sitio activo presentan repulsiones frente a los componentes de la estructura del cembrano, todo gracias a la flexibilidad dada al sistema del inhibidor-sitio activo.



**Figura 3.27** Energías de unión en sistemas rígido y flexible.

### 3.3.5 Relación de datos teóricos-experimentales

Los resultados experimentales obtenidos en los ensayos de inhibición semicuantitativos realizados *in vitro* (capítulo 2) fueron comparados con los valores calculados *in silico* cuando se usó un sistema rígido y cuando se usó un sistema flexible (Tabla 3.4), encontrando que los datos de laboratorio correlacionan mejor con los valores de afinidad calculados mediante el sistema flexible (energía de unión en kcal/mol). Por lo que la predicción hecha con este sistema debe ser más reproducible en un sistema vivo.

**Tabla 3.4** Correlación de los resultados del ensayo de inhibición de AChE, en el análisis semicuantitativo, con los datos de energía de unión para el sistema rígido y el sistema flexible. Los valores de energía de unión están en kcal/mol.

NºEstructura	50 µg	10 µg	1,0 µg	0,1 µg	E. Unión rígido	E. unión flexible
Gal (64)	+	+	+	+	-9,63	-8,49
1a	+	+	+	+	-10,76	-6,40
4	+	+	+	-	-9,00	-6,31
24	+	+	+	-	-10,13	-
25	+	+	-	-	-10,58	-5,57
28	+	+	-	-	-10,86	-7,00
30	+	+	-	-	-9,36	-4,18
20	+	-	-	-	-11,45	-2,98
26	+	-	-	-	-9,87	-
29	-	-	-	-	-10,01	-8,25

### 3.4 Conclusiones

Se estudiaron 65 estructuras de cembranos mediante acoplamiento molecular usando dos sistemas, uno rígido y otro flexible, encontrando que los cembranos con afinidad por el sitio activo, e interactúan de manera similar a como lo hace la galantamina con el mismo. En cuanto a los cembranos de referencia (**1a** y **1b**), presentaron buena afinidad con el sitio activo, donde el de origen natural (**1a**) muestra un resultado acorde a los ensayos de inhibición de la AChE

Mediante el sistema rígido se encontró que los compuestos **1b** (-11,21 kcal/mol), **18** (-11,61 kcal/mol), **20** (-11,52 kcal/mol), **39** (-11,37 kcal/mol), **40** (-11,52 kcal/mol), **44** (-11,25 kcal/mol) y **46** (-12,38 kcal/mol) son los más afines a la cavidad del sitio activo de la enzima, debido a la presencia de grupos acetato en C-18, y halógenos en C-7, C-8 y C12. En cuanto a la estereoquímica, se vio que los epímeros en C-8 estudiados mostraron ser más afines a la cavidad del sitio activo cuando se tiene un carbono con configuración S.

Los estudios de acoplamiento molecular en sistema flexible mostró que los compuestos **16** (-8,42 kcal/mol), **29** (-8,25 kcal/mol) y **56** (-8,79 kcal/mol), presentaron mejor afinidad con el sitio activo de la enzima, cuyas estructuras presentaban principalmente grupos epóxido en C-7 y C-8 y un carbonilo en C-18, además se pudo determinar que con este modelo flexible se calculan energías de unión menores que las calculadas usando un sistema dinámico.

Los resultados experimentales *in vitro* y los datos de acoplamiento molecular con el sistema flexible correlacionan bien con los resultados del ensayo de inhibición semicuantitativo, por lo tanto la aproximación a un sistema dinámico como lo son las condiciones experimentales es válido, aunque es adecuado un mayor número de compuestos a ensayar y un método cuantitativo para validar los resultados de acoplamiento molecular realizados.

### 3.5 Bibliografía

Bachwani, M. and R. Kumar (2011). "Molecular Docking: A Review." IJRAP **2**(6): 5.

Çokuğraş, A, N. (2003). "Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance." Turk J Biochem **28**(2): 54-61.

Copeland, R. A. (2002). Chemical Mechanisms in Enzyme Catalysis. Enzymes, John Wiley & Sons, Inc.: 146-187.

Fischer, E. (1894). "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme." Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **27**(3): 2985-2993.

García, G. (2002). Galantamina para la enfermedad de Alzheimer: Historia, Farmacocinética y Farmacodinámica. Fronteras en la enfermedad de Alzheimer. Madrid, Farmaindustria; en colaboración con el Instituto y Fundación Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid: 10.

Greenblatt, H. M., G. Kryger, T. Lewis, I. Silman and J. L. Sussman (1999). "Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution." FEBS Lett **463**(3): 321-326.

Harel, M., G. Kryger, T. L. Rosenberry, W. D. Mallender, T. Lewis, R. J. Fletcher, J. M. Guss, I. Silman and J. L. Sussman (2000). "Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors." Protein Sci **9**(6): 1063-1072.

Heinrich, M. and H. Lee Teoh (2004). "Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge." Journal of Ethnopharmacology **92**(2–3): 147-162.

Houghton, P. J., Y. Ren and M.-J. Howes (2006). "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi." Natural Product Reports **23**(2): 181-199.

Hu, Y., J. Zhang, O. Chandrashankra, F. C. F. Ip and N. Y. Ip (2013). "Design, synthesis and evaluation of novel heterodimers of donepezil and huperzine fragments as acetylcholinesterase inhibitors." Bioorganic & Medicinal Chemistry **21**(3): 676-683.

Jia, P., R. Sheng, J. Zhang, L. Fang, Q. He, B. Yang and Y. Hu (2009). "Design, synthesis and evaluation of galanthamine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors." Eur J Med Chem **44**(2): 772-784.

Jung, M., J. Tak, Y. Lee and Y. Jung (2007). "Quantitative structure-activity relationship (QSAR) of tacrine derivatives against acetylcholinesterase (AChE) activity using variable selections." Bioorg Med Chem Lett **17**(4): 1082-1090.

Khan, M. T. (2009). "Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using in silico methods: current status and future prospects." N Biotechnol **25**(5): 331-346.

Koshland, D. E., Jr. (1963). "CORRELATION OF STRUCTURE AND FUNCTION IN ENZYME ACTION." Science **142**(3599): 1533-1541.



Meng, X. Y., H. X. Zhang, M. Mezei and M. Cui (2011). "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery." Curr Comput Aided Drug Des **7**(2): 146-157.

Mori, K. (2011). "Bioactive natural products and chirality." Chirality **23**(6): 449-462.

Pohanka, M. (2011). "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(3): 219-229.

Sheng, R., X. Lin, J. Zhang, K. S. Chol, W. Huang, B. Yang, Q. He and Y. Hu (2009). "Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors." Bioorg Med Chem **17**(18): 6692-6698.

Singh, M., M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari and D. Singh (2013). "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection." European Journal of Medicinal Chemistry **70**(0): 165-188.

Tello, E., L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro and C. Duque (2012). "Disruption in quorum-sensing systems and bacterial biofilm inhibition by cembranoid diterpenes isolated from the octocoral *Eunicea knighti*." J Nat Prod **75**(9): 1637-1642.

Tello, E., L. Castellanos, C. Arevalo-Ferro, J. Rodríguez, C. Jiménez and C. Duque (2011). "Absolute stereochemistry of antifouling cembranoid epimers at C-8 from the Caribbean octocoral *Pseudoplexaura flagellosa*. Revised structures of plexaurolones." Tetrahedron **67**(47): 9112-9121.

Tello, E., L. Castellanos and C. Duque (2013). "Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors." Bioorganic & Medicinal Chemistry **21**(1): 242-256.

Yan, J., L. Sun, G. Wu, P. Yi, F. Yang, L. Zhou, X. Zhang, Z. Li, X. Yang, H. Luo and M. Qiu (2009). "Rational design and synthesis of highly potent anti-acetylcholinesterase activity huperzine A derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**(19): 6937-6941.

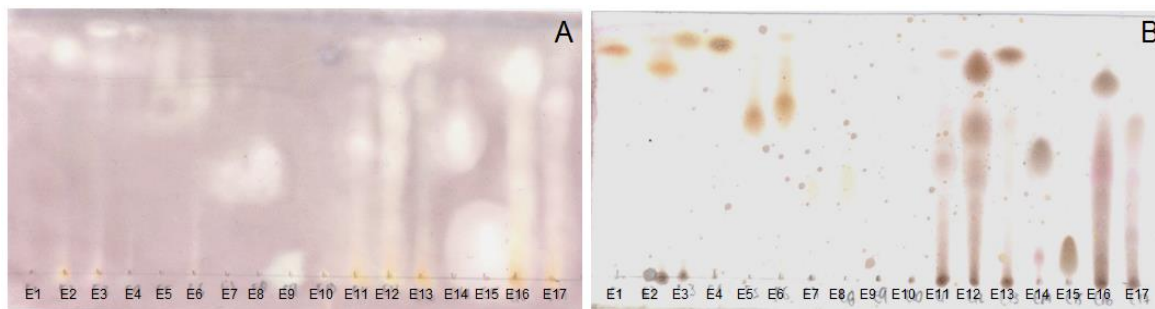
## Anexos

**Tabla A.1** Extractos de organismos evaluados mediante el ensayo de inhibición de AChE; las cruces corresponden al resultado cualitativo del ensayo tomando como referencia el resultado obtenido con la galantamina (El control positivo, al cual corresponde a ++++ en esta escala). (-) corresponde a actividad nula o no ensayado.

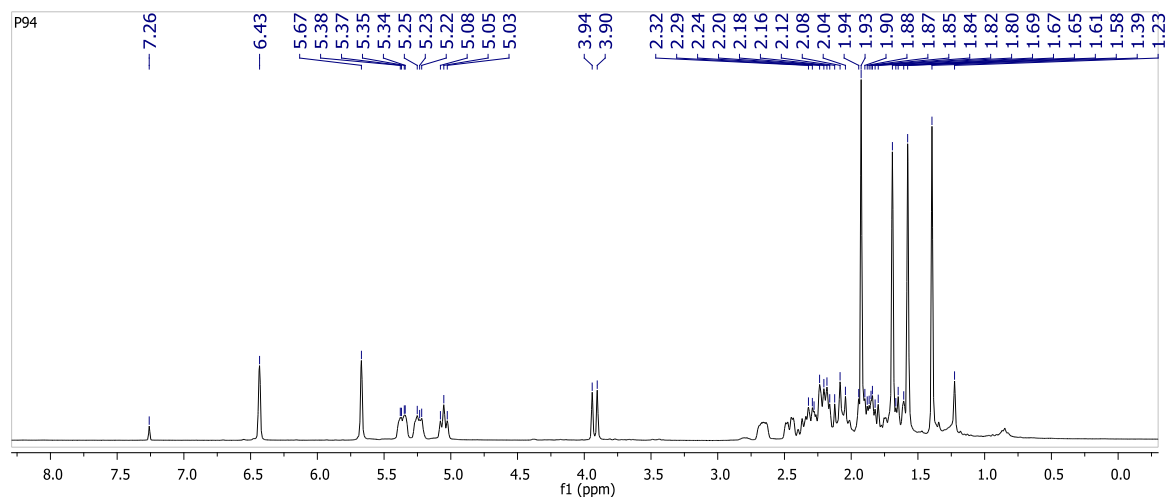
Grupo	Nombre	Nº Colección	Procedencia	Resultado
Octocorales	Muestra NN Morro	-	El Morro, Santa Marta (Col)	++
	Muestra Nº 13	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+
	Muestra Nº 49	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
	Muestra Nº 83	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
	Muestra Nº 84-9	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
	Muestra Nº 10-85	-	Punta Venado, Santa Marta (Col)	-
	Muestra Nº 11-86	-	Punta Venado, Santa Marta (Col)	-
	Muestra Nº 89	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
	Muestra Nº 90	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
	Muestra Nº 94	-	Bahía Taganga, Santa Marta (Col)	+++
	<i>Eunicea flexuosa</i>	-	Isla arena, Santa Marta (Col)	-
	<i>Eunicea knighti</i>	ICN-MHN-CO 0106	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> (San Andrés)	INV-CNI 1615-1616	Providencia y San Andrés (Col)	++
	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> (Providencia)	INV-CNI 1612-1614	Providencia y San Andrés (Col)	++
	<i>Pseudoplexaura flagellosa</i>	ICN-MHN-PO 0257	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+
	<i>Plexaura homomalla</i>	ICN-MHN-PO 0256	San Andrés (Col)	++
	<i>Muriceopsis</i> sp.(STA 4)	ICN-MHN-PO 0254	El Morro, Santa Marta (Col)	-
	<i>Eunicea fusca</i>	ICN-MHN-PO 0252	Santa Marta (Col)	+
	<i>Eunicea laciniata</i> (STA 7)	ICN-MHN-CR-106	Santa Marta (Col)	++
	<i>Eunicea</i> 43	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	+
<i>Eunicea</i> 44	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	-	
<i>Eunicea</i> 45	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	-	
<i>Eunicea</i> 46	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	+	
<i>Eunicea</i> 47	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	-	

<i>Eunicea</i> 48	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	-
<i>Eunicea</i> 49	-	Punta de Betín, Santa Marta (Col)	-
<i>Eunicea</i> 50	-	El Morro, Santa Marta (Col)	+
<i>Eunicea</i> 51	-	El Morro, Santa Marta (Col)	+
<i>Eunicea</i> 52	-	El Morro, Santa Marta (Col)	+
<i>Eunicea</i> 53	-	El Morro, Santa Marta (Col)	+
<i>Eunicea</i> 54	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
<i>Eunicea</i> 55	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
<i>Eunicea</i> 56	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
<i>Eunicea</i> 57	-	El Morro, Santa Marta (Col)	-
<i>Eunicea</i> 58	-	-	-
<i>Eunicea</i> 59	-	-	-
<i>Eunicea</i> 60	-	-	-
<i>Eunicea</i> 61	-	-	-
<i>Eunicea</i> 62	-	-	-
<i>Eunicea</i> 63	-	-	-
<i>Eunicea</i> 64	-	-	-
<i>Eunicea</i> sp. (65, 66, 67)	-	Punta las minas, Santa Marta (Col)	+++
<i>Eunicea</i> 68	-	-	-
<i>Eunicea</i> sp. Muestra N° 1	-	Providencia (Col)	+++
<i>Eunicea succinea</i> Muestra N° 2	ICN-MHN-PO 0251	Providencia (Col)	++
<i>Plexaura</i> sp. Muestra N° 3	-	Providencia (Col)	+
<i>Eunicea fusca</i> Muestra N° 4	ICN-MHN-PO 0252	Providencia (Col)	+++
<i>Plexaura</i> sp. Muestra N° 5	-	Convento, Providencia (Col)	-
<i>Eunicea gris</i> Muestra N° 6	-	Providencia (Col)	-
<i>Eunicea flexuosa</i> Muestra N° 7	-	Providencia (Col)	+++
NN Muestra N° 8	-	Providencia (Col)	-
<i>Pseudoplexaura</i> sp. Muestra N° 9	-	Providencia (Col)	+
<i>Pseudopterogorgia</i> sp. Muestra N° 10	-	Convento, Providencia (Col)	++
<i>Eunicea gricesita</i> Muestra N° 11	-	Providencia (Col)	+++
<i>Plexaura</i> sp. Muestra N° 12	-	Providencia (Col)	+
<i>Eunicea fusca</i> Muestra N°13	-	Providencia (Col)	+
<i>P. rugosa</i> Muestra N° 14	-	Catalina Reef. Providencia (Col)	-
<i>Plexaura</i> -- Muestra N° 15	-	Providencia (Col)	-
<i>Pseudopterogorgia</i> sp. Muestra N° 16	-	Catalina Reef. Providencia (Col)	-
NN Muestra N° 17	-	Convento, Providencia (Col)	-
<i>Eunicea</i> sp. Muestra N° 18	-	Convento, Providencia (Col)	+++
<i>Eunicea</i> sp. Muestra N° 19	-	Providencia (Col)	-

	<i>Pseudoplexaura</i> sp. Muestra N° 20	-	Convento, Providencia (Col)	-
	<i>Eunicea bipinnata</i> Muestra N° 21	-	Convento, Providencia (Col)	++
	NN Muestra N° 22	-	Providencia (Col)	-
	NN Muestra N° 23	-	Convento, Providencia (Col)	-
	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> Muestra N°24	-	Providencia (Col)	-
	<i>Eunicea fusca</i> Muestra N° 25	-	Providencia (Col)	+
	<i>Eunicea gris</i> Muestra N° 26	-	Providencia (Col)	-
	<i>Eunicea fusca</i> Muestra N° 27	-	Providencia (Col)	-
	<i>Eunicea fusca</i> Muestra N° 28	-	Providencia (Col)	+
	<i>Eunicea</i> sp. Muestra N° 29	-	Providencia (Col)	-
	<i>Eunicea</i> sp. Muestra N° 31	-	Providencia (Col)	-
	<i>Plexaura</i> sp. Muestra NN	-	Convento, Providencia (Col)	-
Eponjas	<i>Cliona tenuis</i>	INV-POR-669	Islas del Rosario (Col)	-
	<i>Cliona caribbaea</i>	INV-POR 0406	-	-
	<i>Cliona varians</i>	INV-POR-339	Santa Marta (Col)	-
	<i>Dragmacidon reticulata</i>	INV-POR 881	El Morro, Santa Marta (Col)	-
	<i>Niphates digitalis</i>	-	-	-
	<i>Niphates erecta</i>	-	-	-
	<i>Discodermia dissoluta</i>	ICN-MHN-PO 0158	Santa Marta (Col)	-
	<i>Oceanapia paltata</i>	-	-	-
	<i>Xestospongia proxima</i>	ICN-MHN-PO 0239	Islas del Rosario (Col)	+++
	<i>Iotrochota inminuta</i> (tinta)	INV-POR-883	Santa Marta (Col)	++
	<i>Xestospongia muta</i>	ICN-MHN-PO 0247	Islas del Rosario (Col)	-
	<i>Xestospongia carbonaria</i>	ICN-MHN-PO 0244	Islas del Rosario (Col)	++
	<i>Xestospongia rosariensis</i>	ICN-MHN-PO 0245	Islas del Rosario (Col)	-
	<i>Sphaciospongia cuspidifera</i>	-	-	-
	<i>Amphimedon caycedoy</i>	INV-POR 223	Islas del Rosario (Col)	-
	<i>Spirostrella coccínea</i>	-	-	-
<i>Petrosia pallasaria</i>	ICN-MHN-PO 0240	Islas del Rosario (Col)	-	
Cianobacterias	Muestras No: 1, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27, 28. Incluye géneros <i>Lyngbya</i> , <i>Symploca</i> , <i>Formidium</i> , y <i>Oscillatoria</i>	-	Providencia y San Andrés (Col). Septiembre 2009-	-
	Extractos de muestras: 29, 32, 36,40,43 Incluye géneros <i>Lyngbya</i> , <i>Symploca</i> , <i>Formidium</i> , y <i>Oscillatoria</i>	-	Providencia y San Andrés (Col) Julio de 2010	-



**Figura A.1** Fotografía del ensayo de inhibición de AChE para los compuestos puros usando como revelador FBS a) el ensayo de inhibición y b) sulfato cérico amónico; y como fase móvil Hexano/Acetato de etilo 8:2. (E1: 8S-dehidroplexaurolona, E2: 8R-dehidroplexaurolona, E3: 8S-dehidroxiplexaurolona, E4: 8S-dehidroxiplexaurolona, E5: 8S-plexaurolona, E6: 8R-plexaurolona, E7: 8S-dihidroplexaurolona, E8: 8R-dihidroplexaurolona, E9: galantamina, E11: knightol, E12: knightol acetilado, E13: knigthal, E14: acetato de asperdiol, E15: asperdiol, E16: asperdiol diacetilado)



**Figura A.2** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **1a**, tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

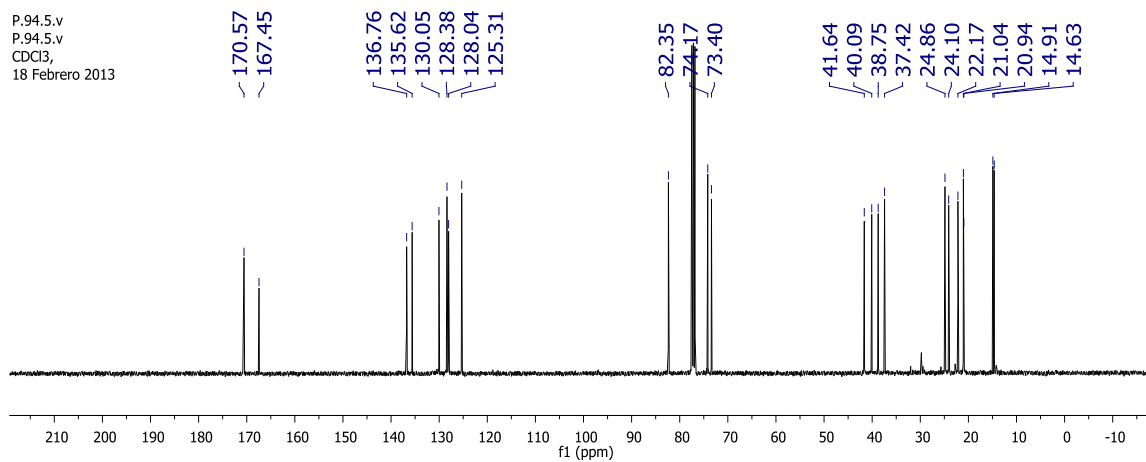


Figura A.3 Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **1a**, tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

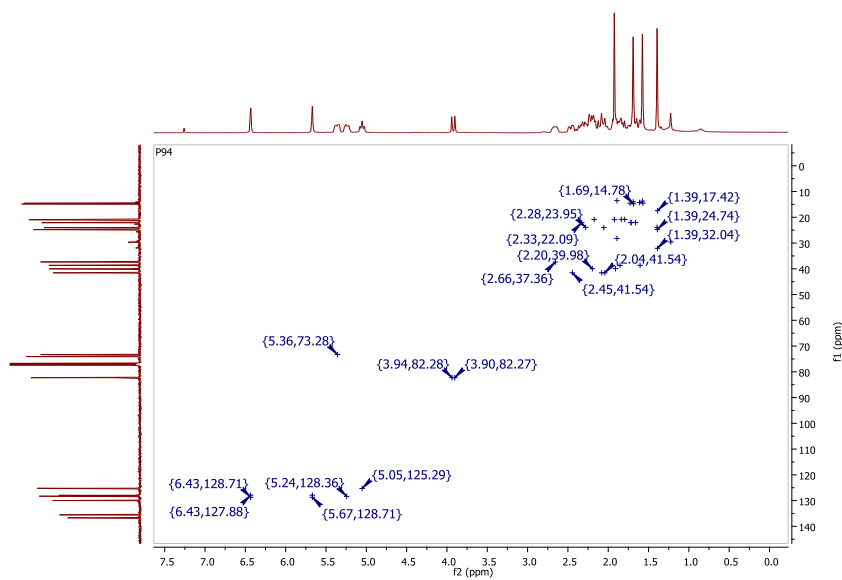


Figura A.4 Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC del compuesto **1a**.

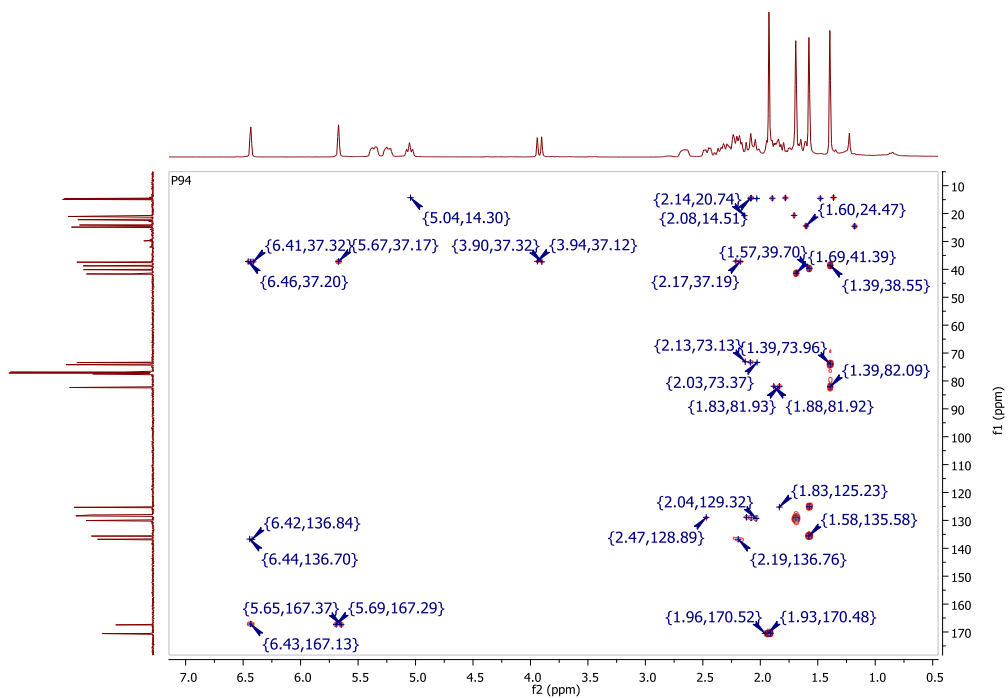


Figura A.5. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC del compuesto **1a**.

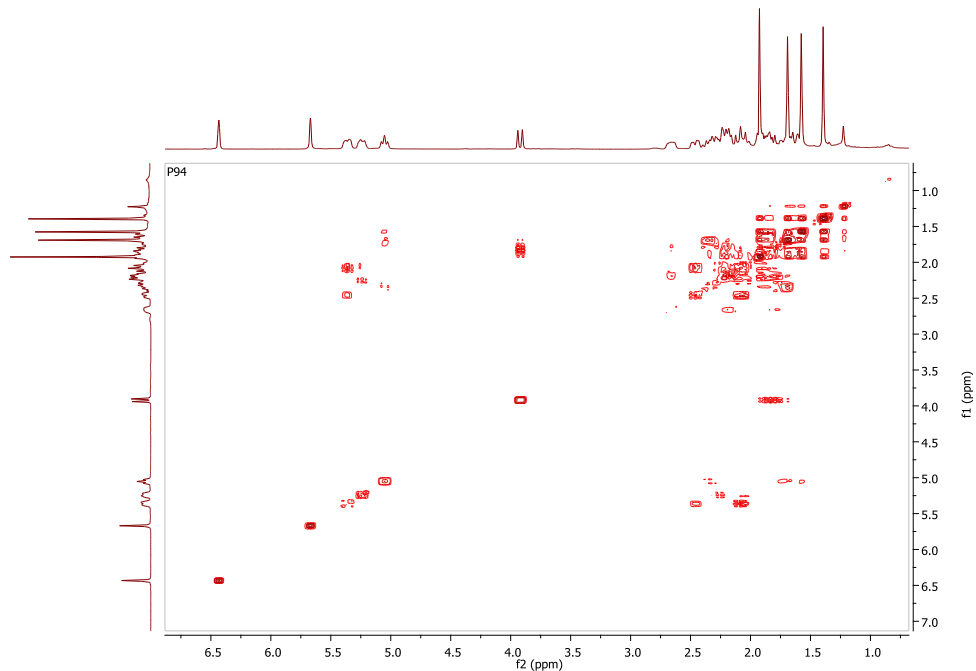
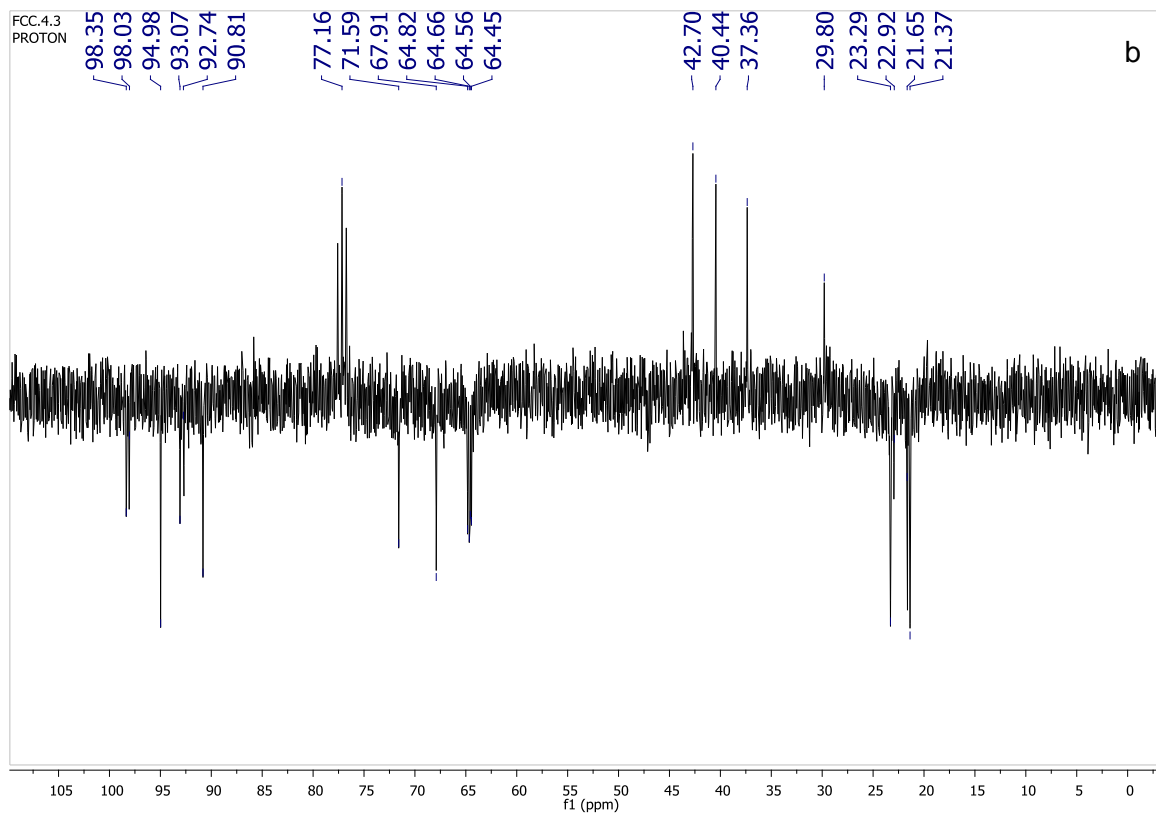
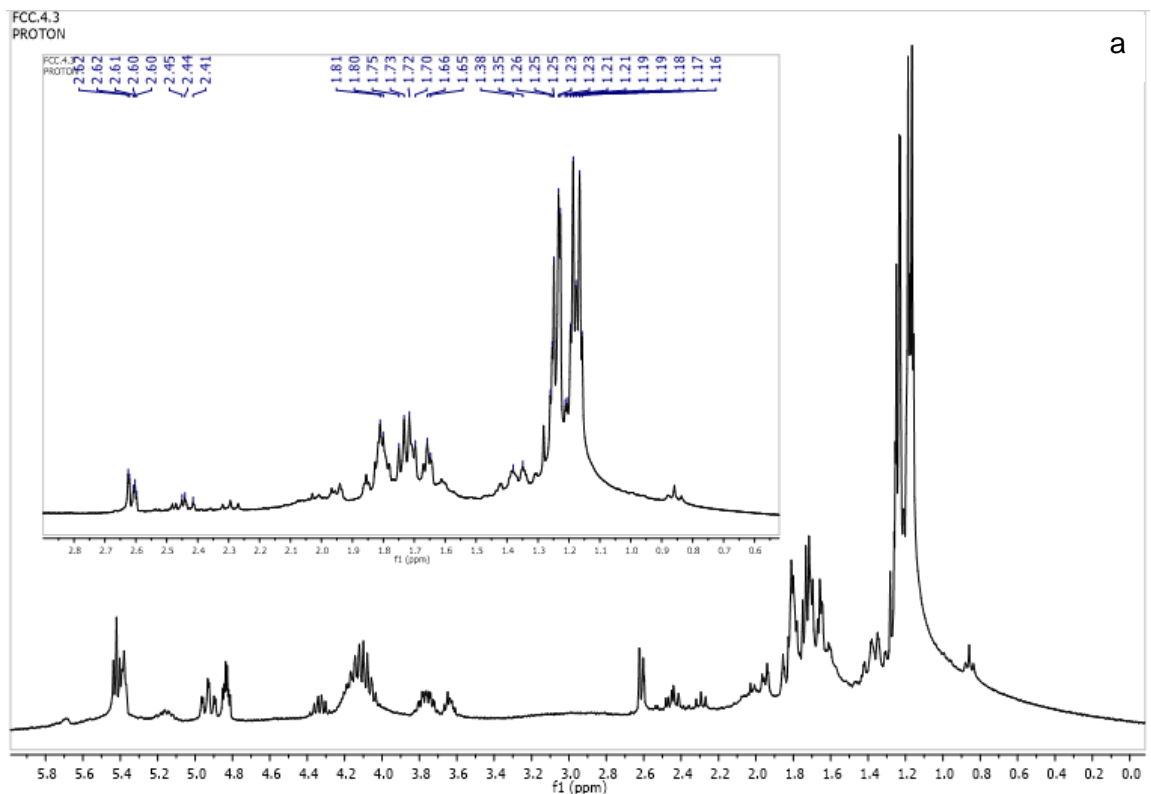
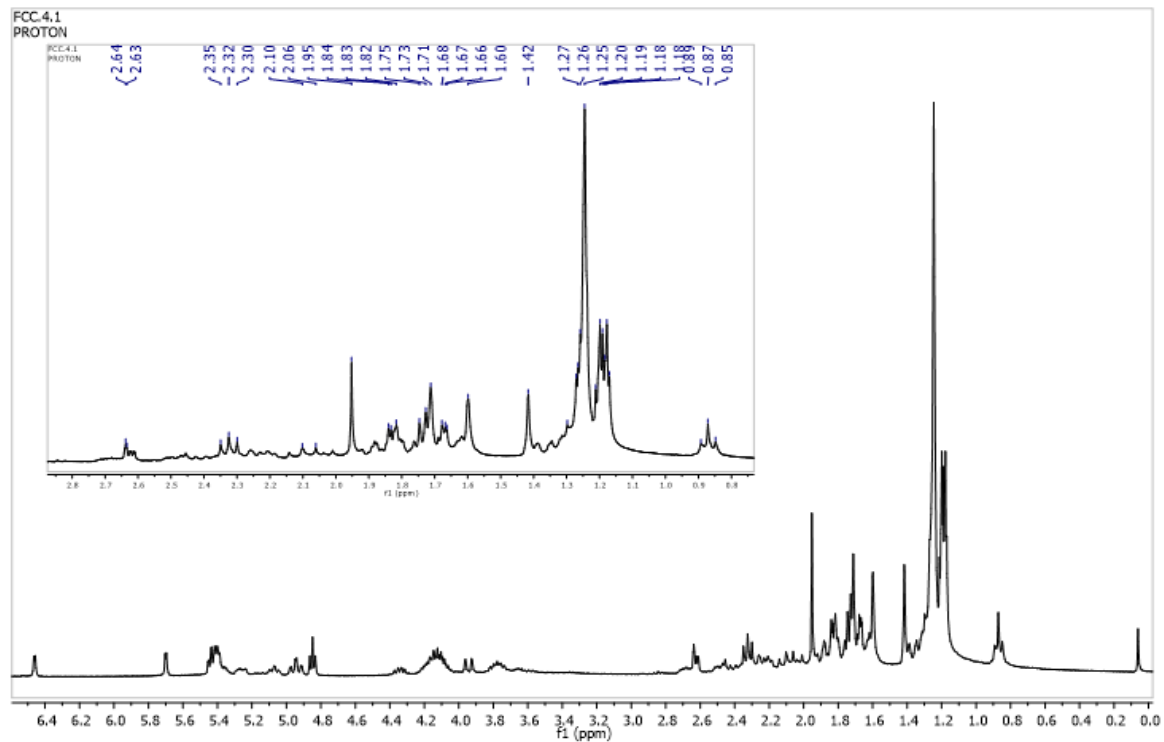


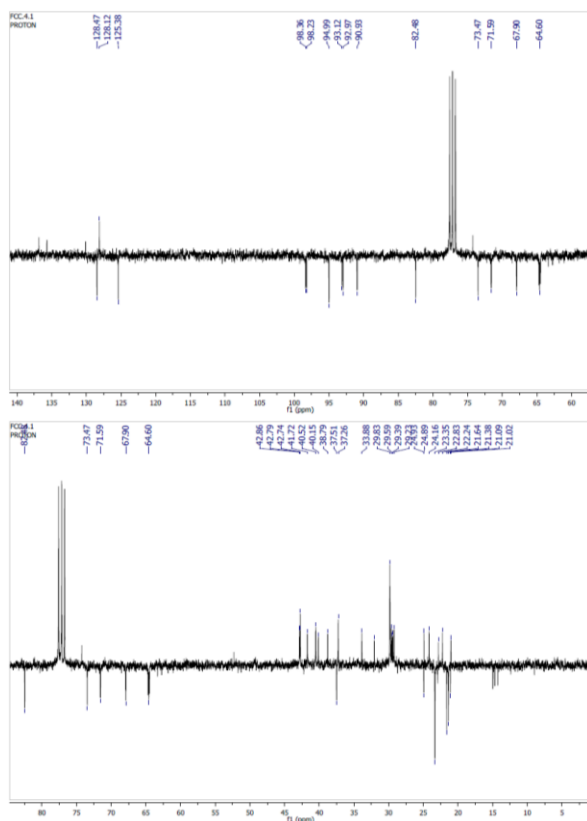
Figura A.6 Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto **1a**.



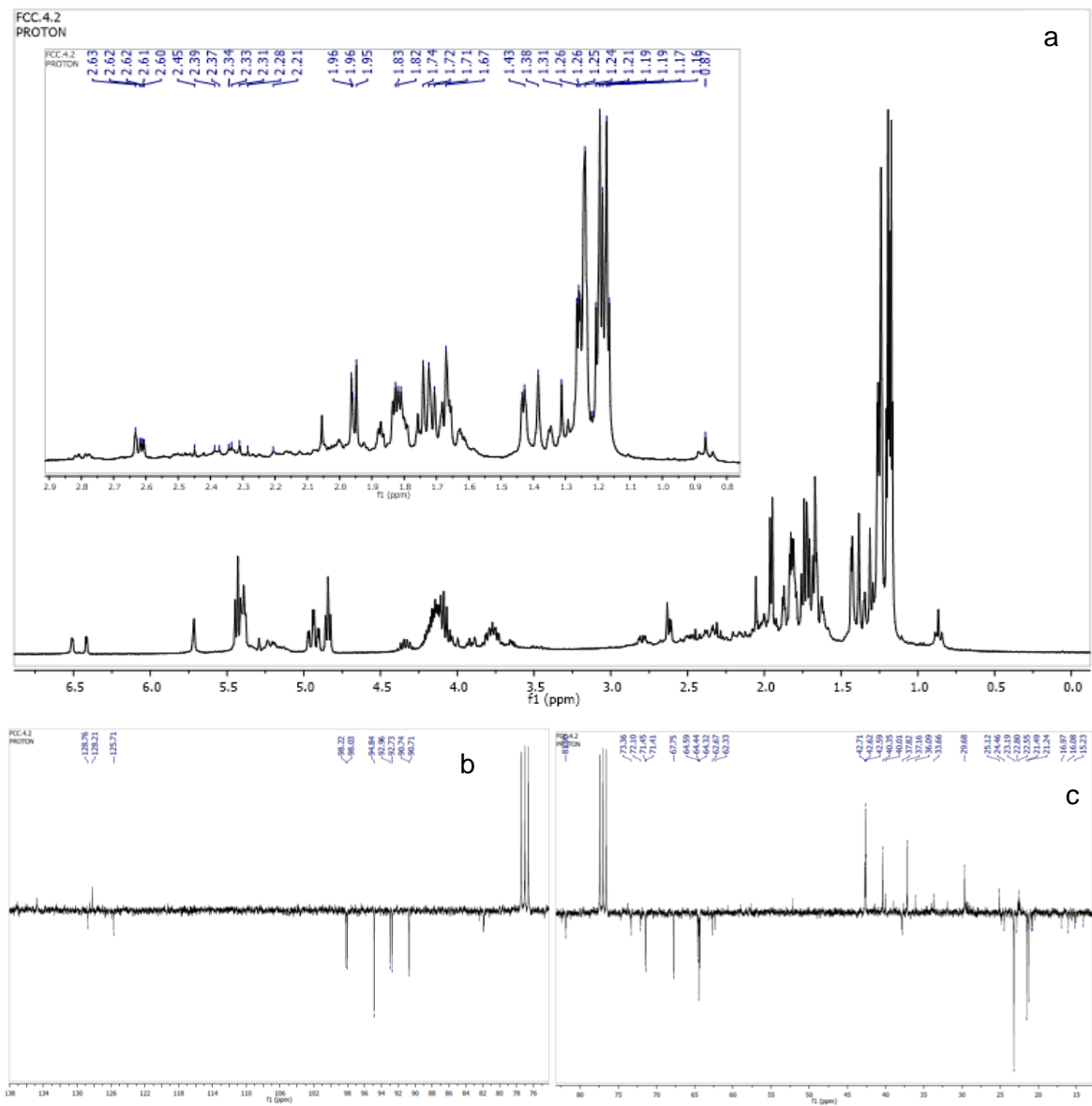


**Figura A.7** Espectros de a)  $^1\text{H}$ -RMN y b)  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **3g**, tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz y 100 MHz respectivamente

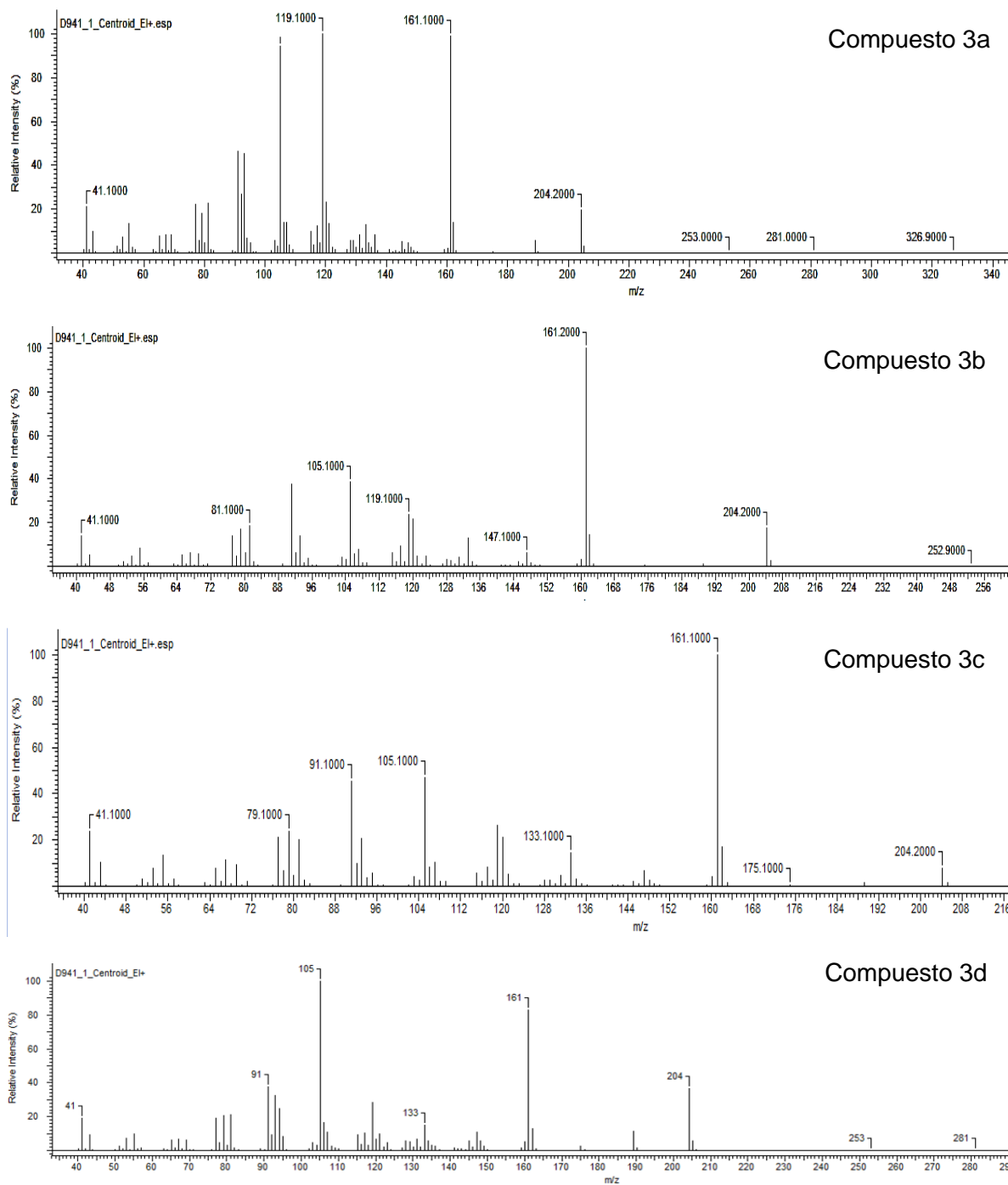




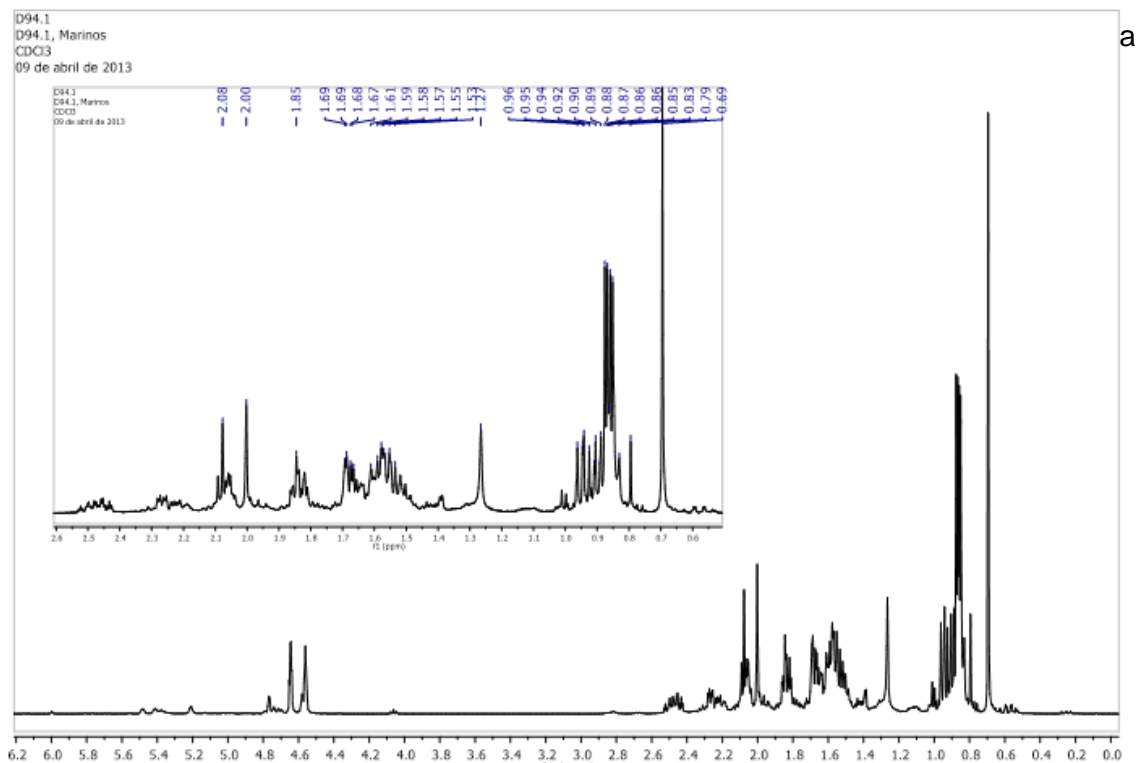
**Figura A.8** Espectros de a)  $^1\text{H}$ -RMN, b) ampliación 1 de  $^{13}\text{C}$ -APT y b) ampliación 2 de  $^{13}\text{C}$ -APT del compuesto **3e**, tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz y 100 MHz



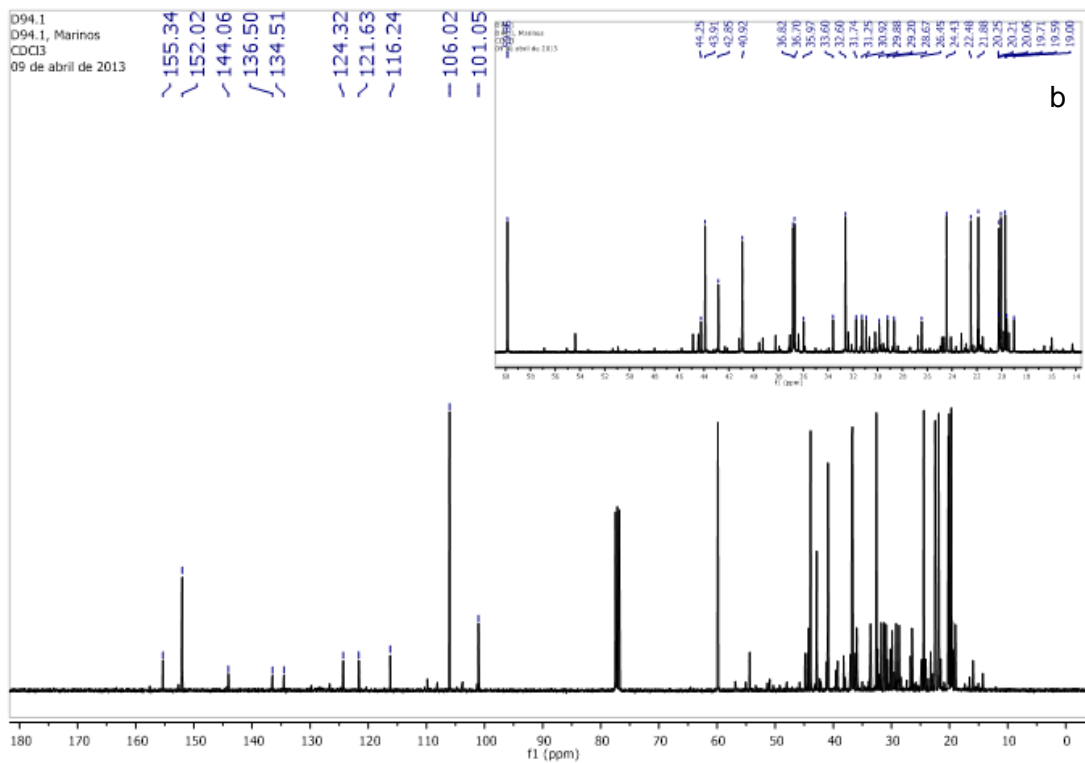
**Figura A.9** Espectros de a) <sup>1</sup>H-RMN, b) ampliación 1 de <sup>13</sup>C-APT y b) ampliación 2 de <sup>13</sup>C-APT del compuesto **3f**, tomado en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz y 100 MHz



**Figura A.10** Espectro de masas de los compuestos 3a, 3b, 3c y 3d (de arriba hacia abajo).

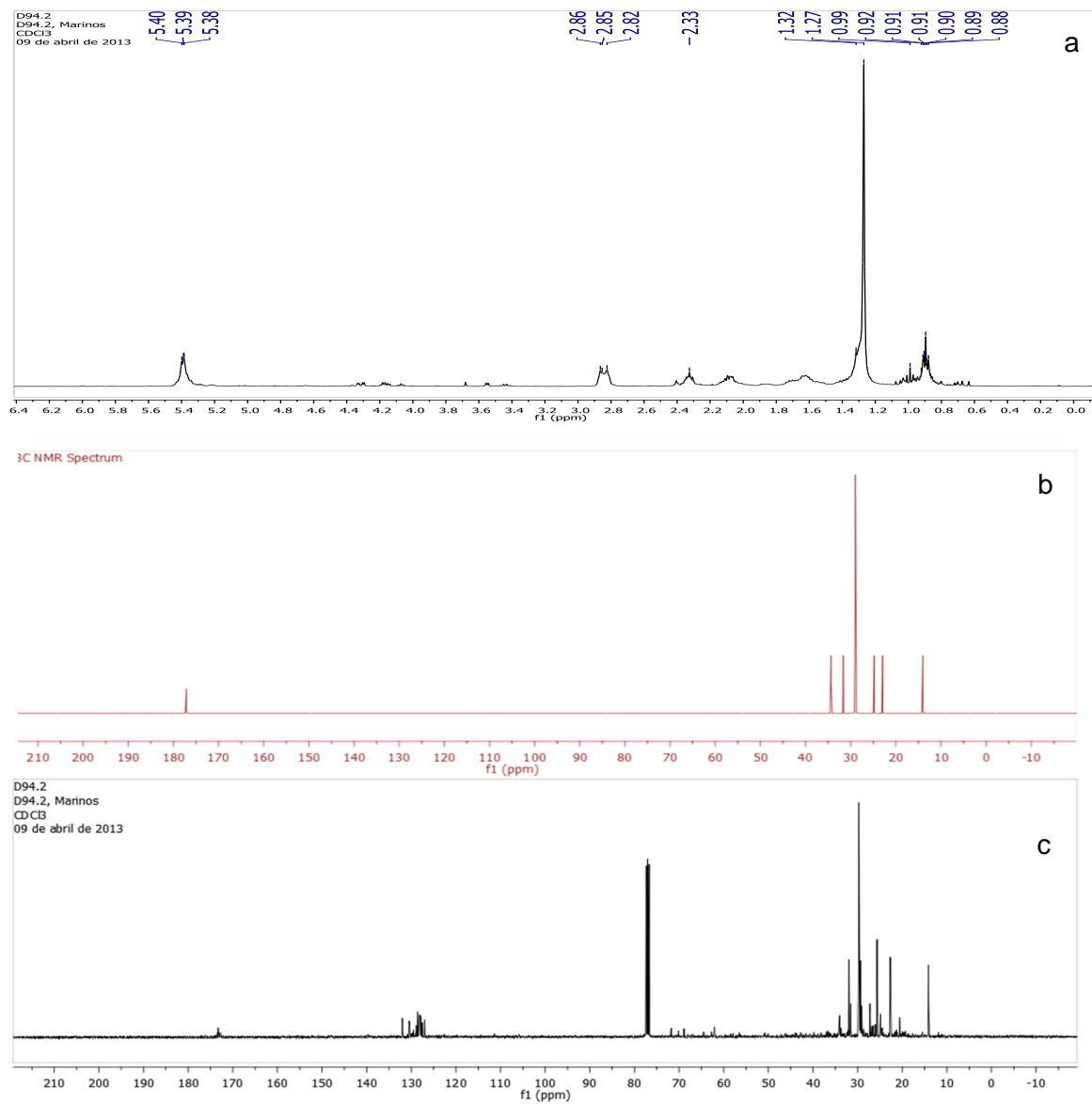


a



b

**Figura A.11** Espectros de a)  $^1\text{H}$ -RMN y b)  $^{13}\text{C}$ -RMN de la mezcla de compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3d**, tomados en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz y 100 MHz respectivamente.



**Figura A.12** Espectros de a)  $^1\text{H}$ -RMN, b)  $^{13}\text{C}$ -RMN de un ácido graso saturado –espectro modelado- y c)  $^{13}\text{C}$ -RMN fracción F2 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz y 100 MHz respectivamente.

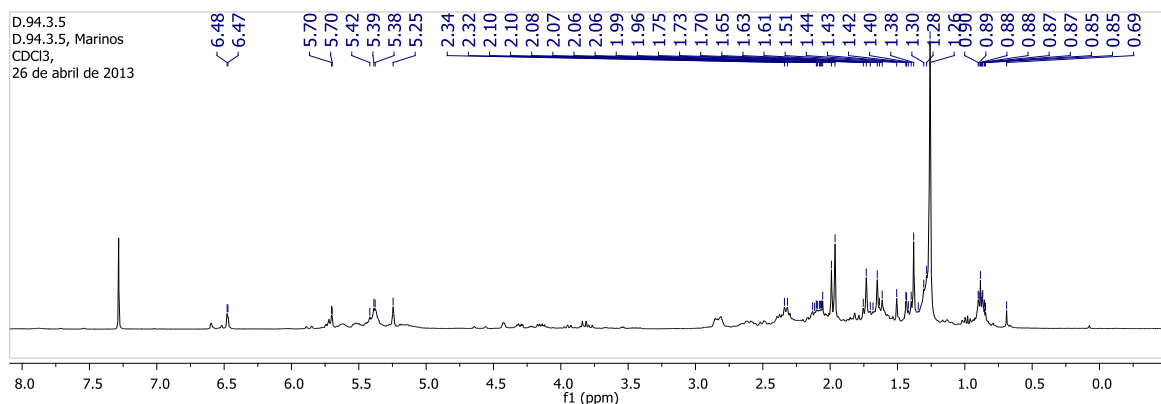


Figura A.13 Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la fracción F3 tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

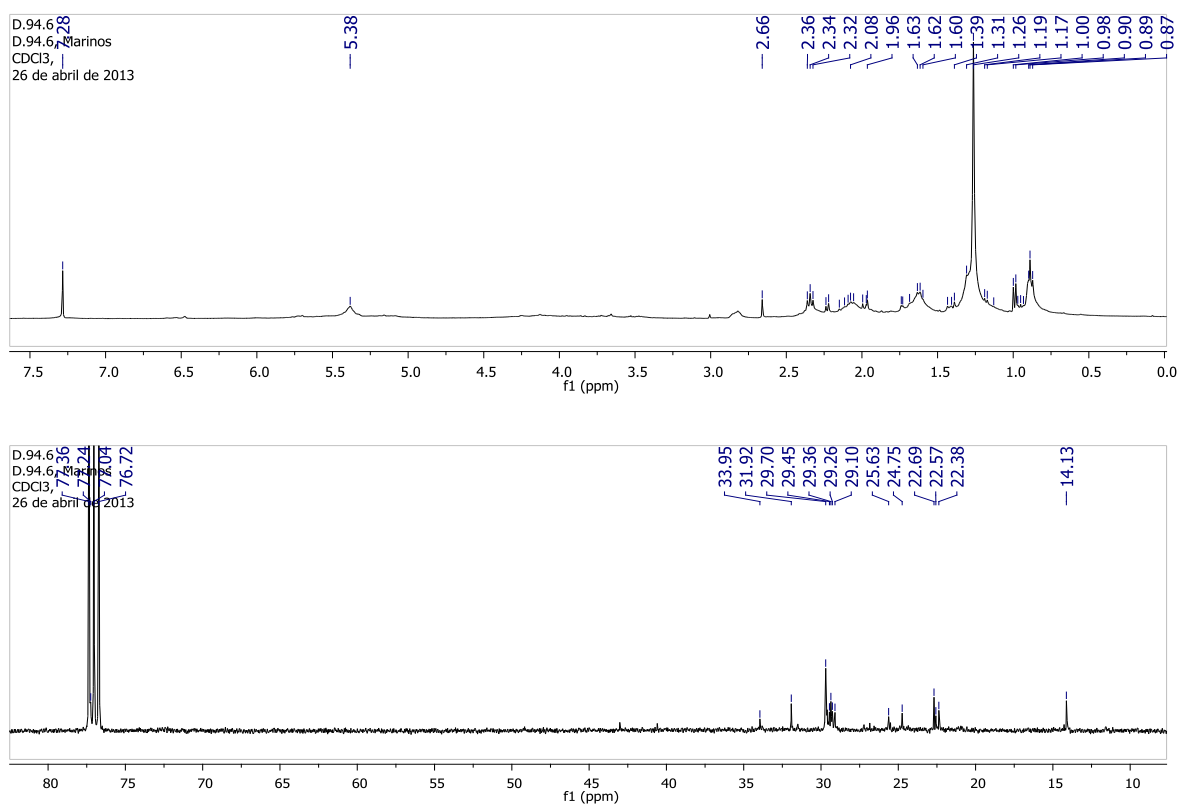


Figura A.14 Espectros de a)  $^1\text{H}$ -RMN y b)  $^{13}\text{C}$ -RMN de la fracción F6 tomados en  $\text{CDCl}_3$  a 400MHz y 100 MHz respectivamente, la fracción F5 presentó un perfil similar, por lo tanto es omitido.

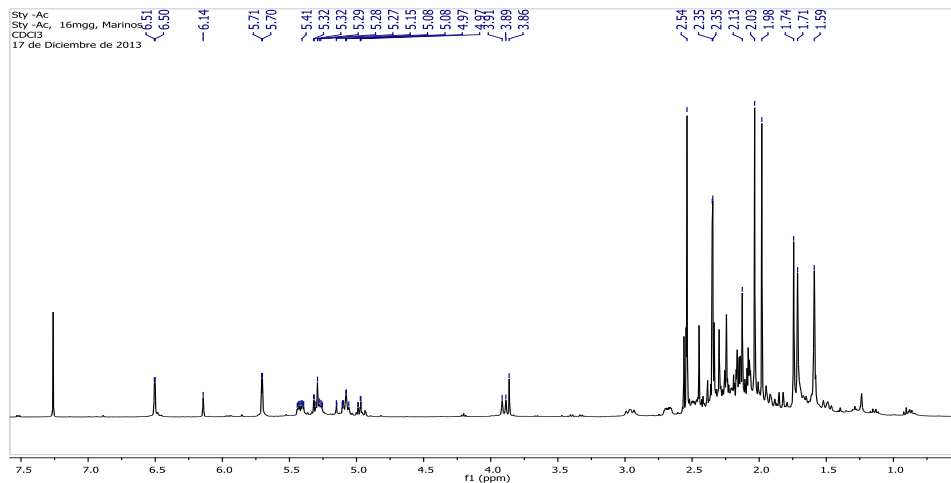


Figura A.15 Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **2**, tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

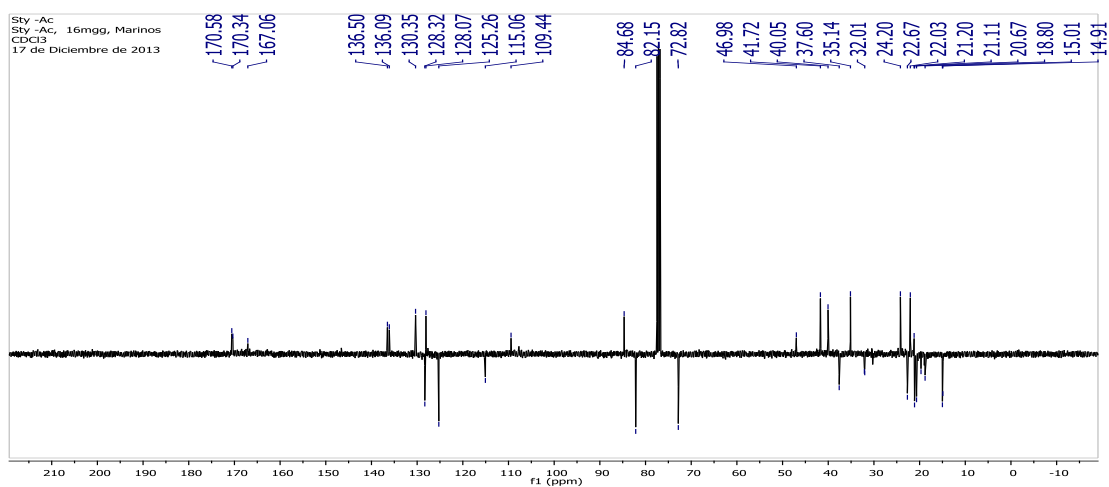


Figura A.16 Espectro de  $^{13}\text{C}$ -APT del compuesto **2**, tomado en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz

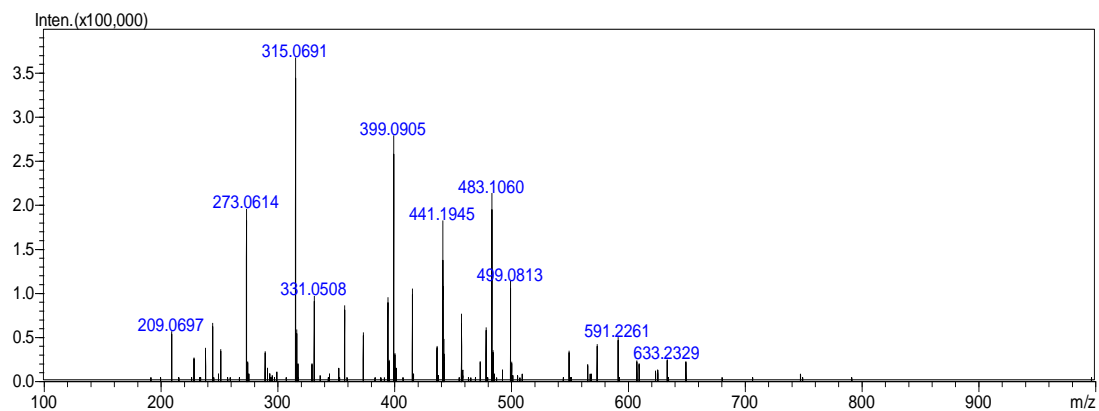
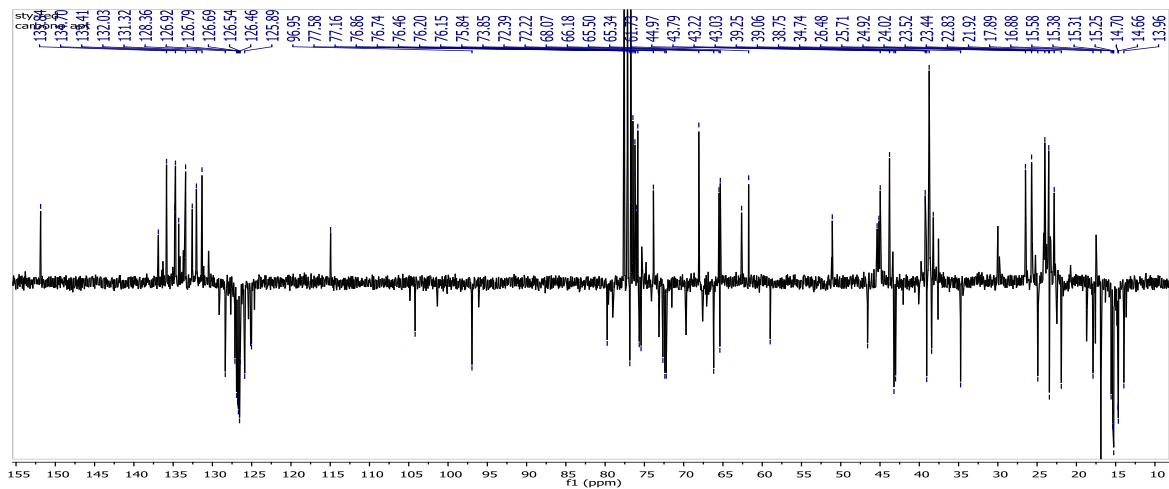
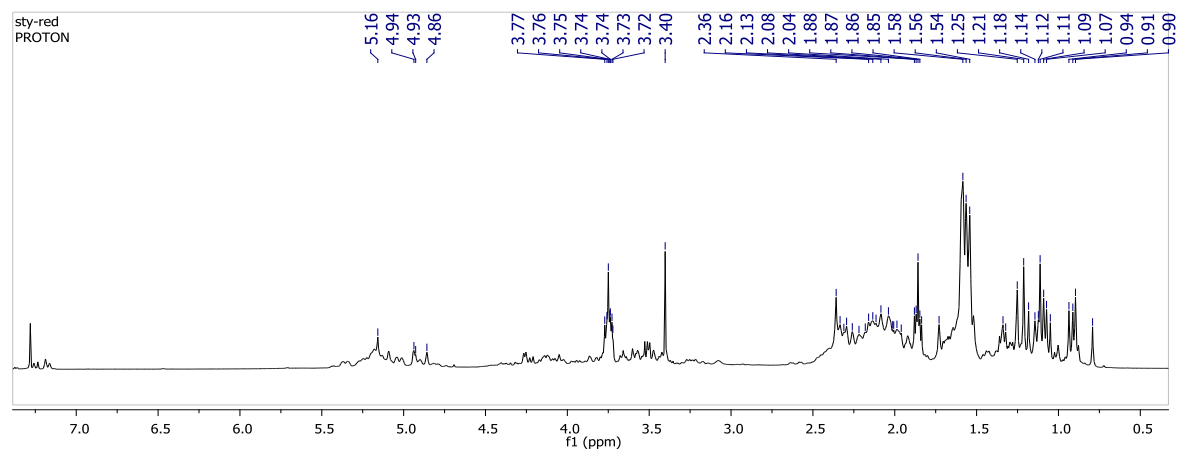


Figura A.17 Espectro de masas del compuesto **2**, en modo positivo.

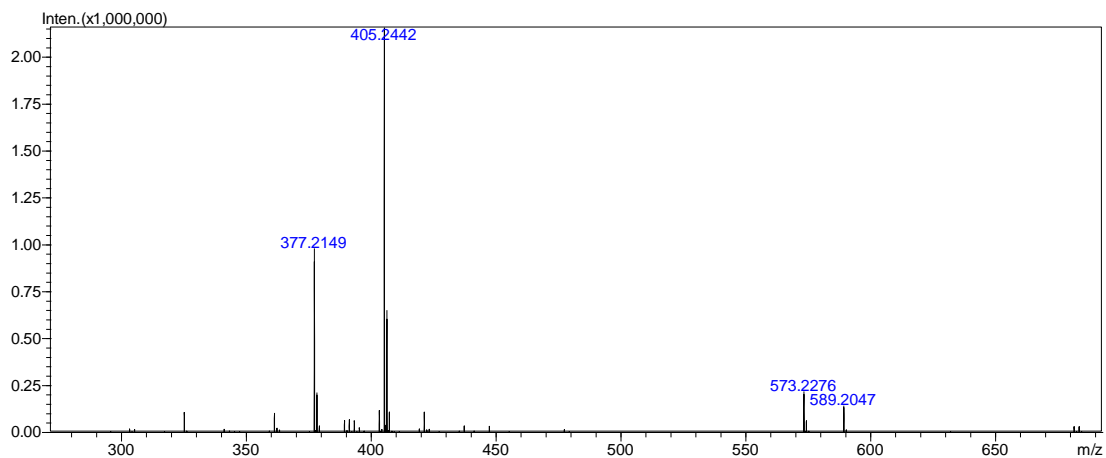




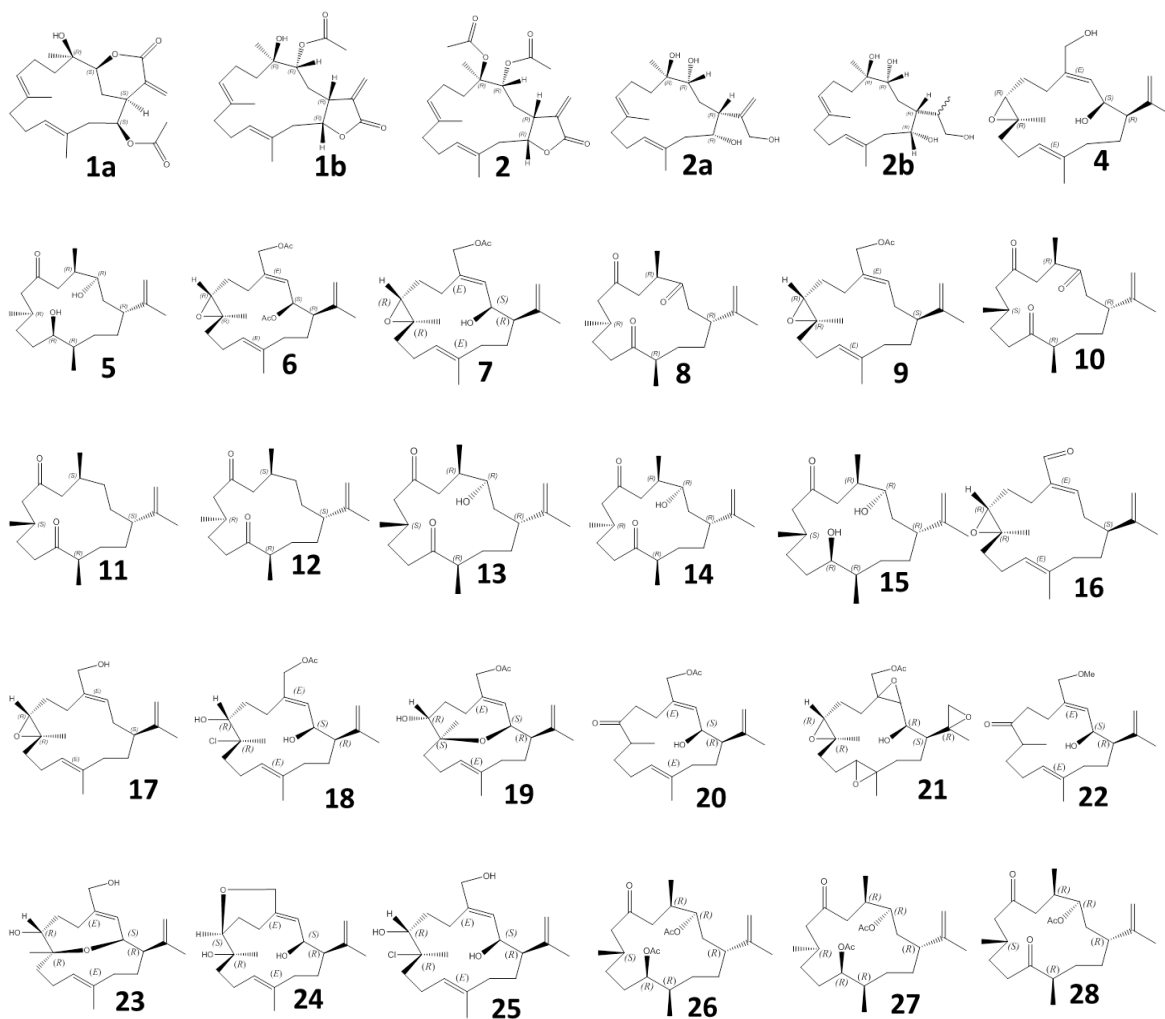
**Figura A.18** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del producto de reducción con LiAlH<sub>4</sub> del compuesto **1** tomado en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz

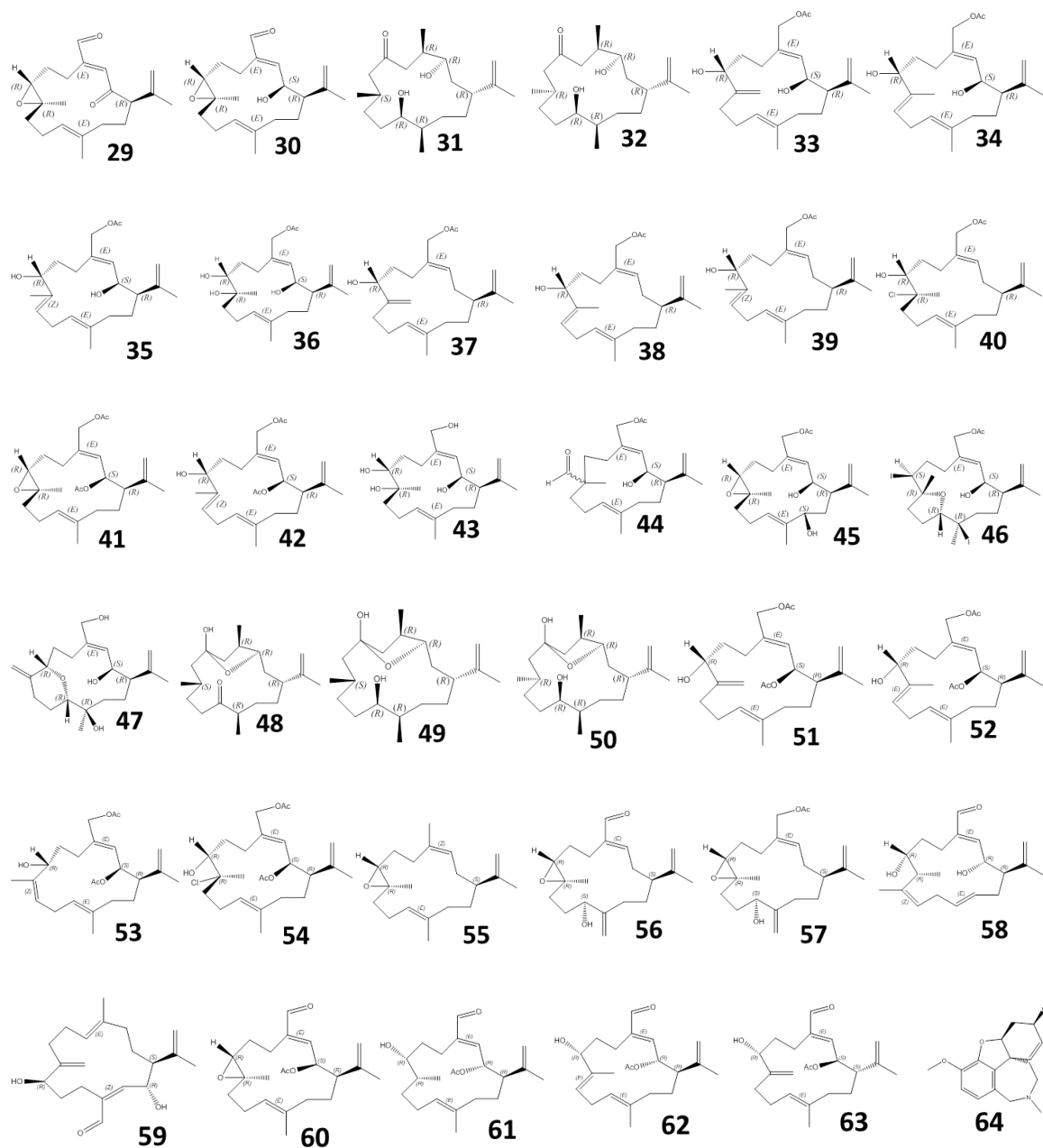


**Figura A.19** Espectro de <sup>13</sup>C-APT del producto de reducción con LiAlH<sub>4</sub> del compuesto **1**, tomado en CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz



**Figura A.20** Espectro de masas del producto de reducción con  $\text{LiAlH}_4$  del compuesto **1**, en modo positivo.

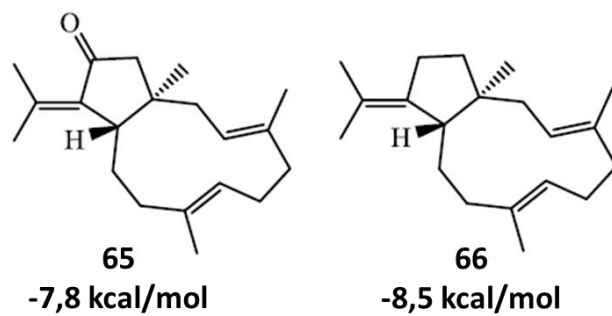




**Figura A.21** Estructuras de los compuestos cembranoides que se utilizaron para el estudio por Docking.

**Tabla A.2** Valores obtenidos del estudio de acoplamiento en sistema rígido, N° est: Número de estructura; ET: Energía total, energía de unión ligando-receptor; E. Inter: Energía intermolecular; E. Libre. Tors: Energía libre de torsión. Las energías obtenidas están en kcal/mol.

N° est.	ET	E. Inter.	E. Libre. Tors	N° est.	ET	E. Inter.	E. Libre. Tors
1a	-10,76	-1,66	0,89	33	-11,22	-13,01	1,79
1b	-11,21	-12,10	0,89	34	-10,51	-12,30	1,79
2a	-9,53	-11,32	1,79	35	-10,37	-12,16	1,79
2b	-9,61	-11,40	1,79	36	-10,57	-12,65	2,08
4	-8,98	-9,99	1,01	37	33,60	32,61	0,99
5	-9,95	-10,49	0,54	38	-10,19	-11,68	1,49
6	-9,67	-10,07	0,40	39	-11,37	-12,86	1,49
7	-10,77	-12,26	1,49	40	-11,52	-13,01	1,49
8	-9,98	-10,10	0,12	41	-10,30	-12,09	1,79
9	-10,51	-11,23	0,72	42	-10,59	-12,68	2,09
10	-10,35	-10,47	0,12	43	-10,10	-11,89	1,79
11	-10,15	-10,30	0,15	44	-11,25	-13,04	1,79
12	-9,98	-10,05	0,07	45	-9,71	-11,50	1,79
13	-9,67	-10,26	0,59	46	-12,38	-13,87	1,49
14	-9,38	-9,77	0,39	47	-9,29	-10,78	1,49
15	-9,03	-9,77	0,74	48	-10,13	-10,72	0,59
16	-9,75	-10,02	0,27	49	-9,58	-10,48	0,90
17	-10,05	-10,68	0,63	50	-9,97	-10,86	0,89
18	-11,61	-13,40	1,79	51	-11,06	-11,88	0,82
19	-10,80	-12,29	1,49	52	-10,41	-11,30	0,89
20	-11,45	-12,94	1,49	53	-10,16	-10,90	0,74
21	-10,00	-11,49	1,49	54	-9,97	-10,86	0,89
22	-10,19	-11,39	1,20	55	-10,05	-10,18	0,13
23	-9,50	-10,70	1,20	56	-9,50	-10,12	0,62
24	-10,13	-11,02	0,89	57	-10,59	-11,59	1,00
25	-10,58	-12,07	1,49	58	-9,38	-9,92	0,54
26	-9,87	-11,36	1,49	59	-9,37	-10,30	0,93
27	-10,82	-12,31	1,49	60	-10,09	-10,17	0,08
28	-10,86	-11,75	0,89	61	-9,82	-10,85	1,03
29	-10,01	-10,61	0,60	62	-8,07	-9,14	1,07
30	-9,36	-10,25	0,89	63	-9,43	-10,61	1,18
31	-9,79	-10,69	0,90	64	-9,63	-9,93	0,30
32	-10,43	-11,32	0,89				



**Figura A.22** Estructuras y energías de unión para los dolabelanos **65** y **66**.