



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **BIOPROSPECCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES MARINOS DE ORGANISMOS BENTÓNICOS del litoral brasileño y Caribe colombiano- Fase I tribu Dictyoteae**

**Alonso Pardo Vargas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2013



# **BIOPROSPECCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES MARINOS DE ORGANISMOS BENTÓNICOS del litoral brasileño y Caribe colombiano- Fase I tribu Dictyoteae**

**Alonso Pardo Vargas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias-Química**

Director:

Ph. D. Leonardo Castellanos Hernández

Coodirectora

Valéria Laneuville Teixeira

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

2013



*A mis padres y mis hermanos*



# Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por la formación académica y personal, por ser una grandiosa institución académica y, más que eso, un muy buen hogar.

A las instituciones que colaboraron con la financiación de este proyecto, COLCIENCIAS y el CNPq.

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 mi carrera.

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.

A Valeria, Diana, Ana Luisa, Anibal y Fredy Ortiz por su apoyo, disposición para enseñarme y amistad durante mi pasantía.

A mi familia, por apoyarme todo este tiempo. Gracias especialmente a mi mamá quien durante todos estos años ha apoyado amorosamente mis decisiones, a mi papá por siempre estar pendiente de mí, gracias por ser tan buenos padres y guiarme en mi crecimiento personal y profesional. Gracias Juan Pablo por la compañía, por compartir siempre conmigo y ayudarme cuando lo he necesitado. A Ruffo, quien siempre me acompañó, y quien hasta su último momento estuvo al pie del cañón con su fidelidad, lealtad y amor latentes. Gracias infinitas a todos por creer siempre en mí.

A Ana Maria, (Pata feroz) por apoyarme siempre y en cada momento, gracias muchas gracias.

A mis amigos, Laurita Cortés, Marco Muñoz, Camilo Vargas, Fráncis Sánchez, Fabio Castellanos, César Reyes, Jenny Forero, Carlos Amaya, Sandra, Diana Martínez, Geison y Lina Bayona; gracias por compartir conmigo a lo largo de estos años tantas experiencias, por apoyarme, por hacerme pasar tan buenos e inolvidables momentos, por correr conmigo en mis afanes, como por ejemplo éste, por tantas risas y, sobretodo, por brindarme siempre una amistad valiosa y sincera.





## Resumen

Se analizaron mediante CG-EM los extractos en acetato de etilo de 37 especímenes de algas de la tribu Dictyoteae, recolectados en Santa Marta (Magdalena, Colombia) y en las costas Brasileñas en los estados Río de Janeiro y Río Grande do Norte. De estos extractos, se identificaron veinte compuestos (**1-20**) tipo ácidos grasos y éster metílico (**1-3**); dolastano y secodolastano (**4-13**); guayano prenilado (**14-16**); esterol (**17**), dolabellano (**18-20**) y Con esta información se construyó la base de datos [diterpenos.msl](#) que permitirá futuros estudios de dereplicación con algas de esta tribu. En este estudio se cuantificaron los diterpenos (**4-16, 18-20**) por tener valor quimiotaxonomico para algas de esta tribu. Los perfiles cromatográficos permitieron agrupar los 37 especímenes en cinco clados diferentes (**A-E**). En el primer clado (**A**) no se identificaron diterpenos como compuestos abundantes. En los clados **B** y **C** se identificaron diterpenos de tipo guayano prenilado como compuestos principales. En el clado **D** se encontraron diterpenos de tipo dolastanos y secodolastanos. Para el último clado (**E**) se identificaron diterpenos tipo dolabellano. El perfil químico y el análisis morfológico sugiere que los especímenes del clado **D** pertenecen a la especie *Canistrocarpus cervicornis*, mientras que los del clado **E** pertenece a la especie *Dictyota pfaffii*. Adicionalmente, se pudo establecer que el diterpeno mayoritario (**5**) de *C. cervicornis* recolectada en Colombia es diferente al diterpeno mayoritario de los especímenes recolectados en el Brasil, por lo que estos diterpenos también pueden ser considerados como marcadores biogeográficos. Finalmente, se realizó el estudio químico de un alga colombiana del clado **A**, de la cual se aisló el diterpeno **21**, que corresponde a un nuevo guayano prenilado denominado dictyol K.

Para profundizar en los estudios químicos se decidió estudiar los diterpenos minoritarios del alga parda *Dictyota pfaffii*, que había mostrado ser una rica fuente de compuestos tipo dolabellano con potente actividad antiviral frente al virus VIH-1. El estudio químico del extracto orgánico de esta alga recolectada en Brasil permitió identificar la presencia

de 4 dolabellanos no antes descritos para esta alga (**20,24, 25** y **26**), 3 de los cuales son nuevos:  $(1R^*,2E,4R^*,7R^*,10S^*,11S^*,12R^*)$ 10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno (**24**),  $(1R^*,2E,4R^*,7S^*,10S^*,11S^*,12R^*)$ 10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno (**25**), y  $(1R^*,2E,4R^*,8E,10S^*,11S^*,12R^*)$ 10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8-dolabelladieno (**26**); además de los dos dolabellanos mayoritarios previamente reportados para esta alga 10,18-diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (**18**) y 10-acetoxi-8,18-dihidroxi-2,6-dolabelladieno (**19**). Los dolabellanos evaluados como antivirales (**24** y **25**) presentaron mayor actividad antiviral que **20** (también evaluado en estudios anteriores), por lo cual estos compuestos resultan promisorios como agentes anti-VIH-1.

Finalmente, y con el ánimo de obtener otros dolabellanos con actividad antiviral se decidió usar como cabezas de serie los dolabellanos mayoritarios  $(1R, 3E, 7E, 11S)$ 13-ceto-dolabela-3,7,12(18)-trieno (**28**) y  $\beta$ -Araneosene (**29**) de *Eunicea laciniata*, los cuales poseen una baja actividad antiviral frente al virus del VIH-1, y una baja citotoxicidad frente a la línea celular MT-2. Así, en este trabajo, aprovechando que **28** se puede aislar a nivel de multigramos se realizaron modificaciones estructurales, como reducciones al carbonilo (compuesto **30** y **31**); epoxidaciones (compuesto **32**), apertura de epóxidos (compuesto **33**), y oxidaciones alílicas (compuesto **34**) buscando mejorar la actividad antiviral, dado que los dolabellanos oxigenados, como los aislados de algas del género *Dictyota*, han mostrado una fuerte actividad anti-VIH-1. Estas modificaciones estructurales lograron aumentar significativamente la actividad antiviral del precursor, hasta en 100 veces, siendo los compuestos **32** y **34** los más activos frente al VIH-1 ( $EC_{90} < 2.9\mu M$ ). La alta actividad antiviral y la baja toxicidad frente a células MT-2 de los compuestos **32** y **34**, indica que éstas son promisorias para el desarrollo de medicamentos antivirales.

**Palabras claves:** algas pardas, *Dictyota*, dolabellanos, actividad antiviral

## Abstract

Thirty seven specimens of brown algae (Dictyoteae tribe) were collected at Santa Marta (Colombia), Rio de Janeiro and Rio Grande do Norte (Brazilian Coast). Raw extracts were analyzed by GC-MS and twenty compounds were identified (**1-20**), including fatty acids and methyl esters (**1-3**); dolastane and secodolastane (**4-13**); prenylated guayanes (**14-16**); sterol (**17**) and dolabellane (**18-20**). This information provides us the tools to create our own diterpenes database for future dereplication analysis. This database provides information about fragmentation pattern and Kovatz index for every compound. It is known that diterpenes (**4-16**, **18-20**) have chemotaxonomic value for this tribe. Five clades were created according to its chromatographic profiles based on their diterpenes content (**A-E**). First clade (**A**) shows no terpenes as abundant components. Clades **B** and **C** showed prenylated guayanes as major compounds. Clade **D** is characterized by the presence of dolastane and secodolastane diterpenes. Finally, clade **E** shows dolabellane diterpenes as main components. Chemical profile and morphologic analysis suggest that clade **D** specimens belong to *Canistrocarpus cervicornis* specie, while clade **E** specimen belongs to *Dictyota pfaffii* specie. Additionally, the major diterpene for *C. cervicornis* collected at Colombia (compound **5**) is different from those specimens of *C. cervicornis* collected at Brazil; this result implies that dolastane diterpenes are also useful as biogeographic markers for this specie. Finally, the chemical study of Colombian algae (clade **A**) allowed us to identify one new diterpene from dictyol series, the dictyol K as minor compound of organic extract.

In order to analyze the minor diterpene constituents and look for new antiviral compounds, brown alga *Dictyota pfaffii* collected at Brazil was studied. This study allowed identifying four non described dolabellanes for this specie (**20**, **24**, **25** and **26**), three of them are new ( $1R^*, 2E, 4R^*, 7R^*, 10S^*, 11S^*, 12R^*$ )10,18-diacetoxy-7-hidroxy-2,8(17)-

dolabelladiene (**24**), (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,7*S*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-diacetoxy-7-hidroxy-2,8(17)-dolabelladiene (**25**), y (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,8*E*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-diacetoxy-7-hidroxy-2,8-dolabelladiene (**26**); besides of the major compounds 10,18-diacetoxy-8-hidroxy-2,6-dolabelladiene (**18**) y 10-acetoxy-8,18-dihidroxy-2,6-dolabelladiene (**19**). The compounds **24** and **25** were evaluated in the antiviral test, and showed to be more active than dolabellanetriol **20**, indicating that they are promissory as antiviral against VIH-1.

Caribbean octocoral *Eunicea laciniata* is a known producer of dolabellane type diterpenes, like 13-ceto-1(*R*),11(*S*)-dolabela-3(*E*),7(*E*)12(18)-triene (**28**) and β-Araneosene (**29**). In earlier studies, dolabellane diterpenes isolated from brown algae shown strong anti-HSV-1 activity *in vitro* but only, the dolabelladienetriol, inhibited the reverse transcriptase enzyme of HIV-1. Compounds **28** and **29** were isolated and tested against HIV-1 virus, showing low antiviral activity and low toxicity to MT-2 cell line. Reactions over major compound **28**, like carbonyl reductions (compound **30** y **31**), epoxidation (compound **32**), epoxide opening (compound **33**) and allylic oxidations (compound **34**), were made trying to improve the antiviral activity, since it was shown that oxygenated dolabellanes have better activity against HIV-1. These structural modifications significantly improve the anti-HIV-1 activity up to 100 times, being compound **32** and **34** the most active ones. Their high antiviral activity along with their low toxicity to MT-2 cells makes them promissory antiviral compounds.

**Key words:** Brown algae, *Dictyota*, dolabellanes, antiviral activity.

# Contenido

	<b>Pág.</b>
Resumen y abstract	IX
Lista de Figuras	XV
Lista de Tablas	XVII
Lista de Símbolos y Figuras	XIX
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Productos Naturales de macroalgas marinas y antivirales: Estado del arte</b>	<b>5</b>
1.1. Algas Rojas	6
1.2. Algas Verdes	7
1.3. Algas Pardas	8
1.3.1. Diterpenos aislados de algas pardas de la tribu Dictyoteae: Actividad biológica y función ecológica	9
1.3.2. Utilidad taxonómica de los terpenos presentes en algas de la tribu Dictyoteae	10
1.4. Estudios de algas en Colombia	11
1.5. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	13
1.5.1. Generalidades del VIH	13
1.5.2. Estructura del virus VIH	14
1.5.3. Variantes del virus VIH-1 y VIH-2	16
1.5.4. Tratamientos antirretrovirales ARV	18
1.6. Productos Naturales Marinos con actividad antiviral	19
1.7. Terpenos de algas con actividad antiviral	20
Bibliografía	22
<b>2. Estudio Metabólico de algas de la tribu Dictyoteae</b>	<b>27</b>
Resumen	27
2.1. INTRODUCCIÓN	28
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.2.1. Material vegetal	31
2.2.2. Extracción y limpieza	32
2.2.3. Análisis por CGAR-EM	33
2.2.4. Metodología de análisis de los extractos de algas	36
2.2.5. Estudio químico de un alga parda colectada en la bahía Santa Marta	37
2.3. Resultados y discusión de resultados	38

Determinación de la estabilidad térmica de los diterpenos	39
Identificación de diterpenos	41
Agrupación quimiotaxonómica de las algas de la tribu Dictyoteae de acuerdo a su perfil cromatográfico	44
Estudio químico del alga <i>Dictyota</i> sp. colectada en la bahía de Santa Marta	51
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57

### 3. DOLABELLANOS MINORITARIOS DEL ALGA PARDA *Dictyota pfaffi*.

Resumen	61
3.1. INTRODUCCIÓN	62
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.2.1. Material vegetal	64
3.2.2. Extracción, purificación y elucidación estructural	64
3.2.3 Ensayos de actividad antiviral	68
Células y virus	68
Determinación de la viabilidad celular	69
Ensayo antiviral, determinación de la actividad antiviral	69
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
BIBLIOGRAFÍA	83

### 4. Semisíntesis de dolabellanos oxigenados con actividad anti VIH-1 in vitro mejorada

Resumen	95
4.1. INTRODUCCIÓN	96
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	98
4.2.1. OBTENCIÓN DE DOLABELLANOS MAYORITARIOS DE <i>Eunicea laciniata</i> COMO COMPUESTOS DE PARTIDA PARA LAS SEMISÍNTESIS	98
4.2.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL	
Células y virus	99
Determinación de la viabilidad celular	99
Ensayo antiviral, determinación de la actividad antiviral	100
4.2.3. OBTENCIÓN DE DERIVADOS SEMISINTÉTICOS	100
4.2.3.1 Obtención de <b>30</b> y <b>31</b> por reducción del carbonilo del compuesto <b>28</b>	101
4.2.3.2 Obtención de <b>32</b> por epoxidación del compuesto <b>28</b>	101
4.2.3.3 Obtención de <b>33</b> por apertura del epóxido <b>32</b>	102
4.2.3.4 Obtención de <b>34</b> por oxidación alílica del compuesto <b>28</b>	103
4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	104
Bibliografía	

# Lista de Figuras

	Pág.
<b>CAPITULO 1 PRODUCTOS NATURALES DE MACROALGAS MARINAS Y ANTIVIRALES: ESTADO DEL ARTE</b>	
<b>Figura 1.1</b> Estructura de algunos compuestos activos de algas	7
<b>Figura 1.2.</b> Estructura de algunos compuestos activos de algas verdes	8
<b>Figura 1.3</b> Diterpenos bioactivos aislados de algas de la tribu Dyctioteae	10
<b>Figura 1.4</b> Ruta biogenética propuesta por Teixeira, grupos de terpenos (I-III) de acuerdo con la primera ciclación de su precursor común el geranil-geraniol	11
<b>Figura 1.5</b> Estructura básica del VIH	14
<b>Figura 1.6</b> Ciclo de vida del VIH	16
<b>Figura 1.7</b> Incidencia mundial del virus del VIH en 2009. Datos ONU/SIDA 2009	18
<b>Figura 1.8</b> Compuestos con actividad antiviral de origen marino	20
<b>Figura 1.9</b> Terpenos aislados de algas con actividad antiviral	21
<b>CAPITULO 2. ESTUDIO METABOLÓMICO DE ALGAS DE LA TRIBU DICTYOTEAEE RECOLECTADAS EN EL CARIBE COLOMBIANO</b>	
<b>Figura 2.1</b> Ruta biogenética propuesta por Teixeira <i>et al</i> 1988, grupos de terpenos (I-III) de acuerdo con la primera ciclación de su precursor común el geranil-geraniol.	29
<b>Figura 2.2</b> Cromatograma del extracto del alga EF1, donde se destacan los picos con fragmentación típica de diterpeno.	40
<b>Figura 2.3</b> Área de pico normalizada para los 13 picos al variar la temperatura del inyector entre 260 y 290°C, con $\pm$ se indica la variación estándar a) Picos que no presentan variación significativa b) Picos que aumentan su área al aumentar la temperatura c) Picos que disminuyen su área al aumentar la temperatura.	41
<b>Figura 2.4</b> Cromatograma de la fracción F13 del individuo EF1 constituida por 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno ( <b>5</b> ) y 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno ( <b>7</b> ).	42
<b>Figura 2.5</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ de la fracción F13 de del individuo EF1 constituida por los diterpenos 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno ( <b>5</b> ) y y 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno ( <b>7</b> ).	43
<b>Figura 2.6</b> Compuestos identificados por CG-EM en las algas trabajadas: <b>1-3</b> Ácidos grasos, <b>4-13</b> diterpenos tipo dolastano y secodolastano (grupo IIB), <b>14-16</b> diterpenos tipo guayano prenilado (grupo I), <b>17-19</b> diterpenos tipo dolabellano (grupo IIA) y fucosterol ( <b>20</b> ).	44
<b>Figura 2.7</b> Perfiles cromatográficos para cada uno de los cinco clados identificados (A-D). a) Cromatograma del espécimen DR1, clado <b>A</b> . b) Cromatograma del espécimen DR6, clado <b>B</b> . c) Cromatograma del espécimen DR2, clado <b>C</b> . d) Cromatograma del espécimen DT'3, clado <b>D</b> . e) Cromatograma del espécimen ADR1, clado <b>E</b> (Adicionalmente se observan líneas verticales que dividen el	45

cromatograma en las 3 zonas de estudio)

<b>Figura 2.8</b> Canistrocarpus cervicornis a) Vista general del espécimen DN5- Clado <b>D</b>	48
b) Vista superficial de un tallo de alga DN5 con esporangios c) Corte transversal de un esporangio rodeado por una corona de células corticales (Foto: Fredy Ortiz).	
<b>Figura 2.9</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la fracción F2.7	52
<b>Figura 2.10</b> Espectro de RMN DEPT135 de la fracción F2.7	52
<b>Figura 2.11</b> a) Estructura propuesta para el compuesto <b>21</b> . b) y c) Compuestos <b>22</b> y <b>23</b> tipo guayano prenilado aislados del alga <i>Dictyota volubilis</i>	54

### 3. DOLABELLANOS MINORITARIOS DEL ALGA PARDA *Dictyota pfaaffii* CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

<b>Figura 3.1</b> Esquema del fraccionamiento del alga <i>D. pfaaffii</i>	65
<b>Figura 3.2</b> Dolabellanos <b>18-20</b> aislados de <i>Dictyota pfaaffii</i>	73
<b>Figura 3.3</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ para el compuesto <b>24</b> .	74
<b>Figura 3.4</b> Espectro de RMN APT para el compuesto <b>24</b>	75
<b>Figura 3.5</b> a) Sistemas de spin determinados por COSY y HSQC para <b>24</b> b) Principales correlaciones HMBC observadas para el compuesto <b>24</b> c) Estructura tridimensional de <b>24</b> y d) Estructura tridimensional propuesta para los compuestos <b>25</b> . En c) y d) se presentan las principales correlaciones NOE observadas.	77
<b>Figura 3.6.</b> Estructura del compuesto nuevo <b>26</b> ( $1R^*$ , $2E$ , $4R^*$ , $8E$ , $10S^*$ , $11S^*$ , $12R^*$ ) 10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8-dolabelladieno. a) Principales correlaciones COSY y HMBC para <b>26</b> b) Correlaciones NOE para <b>26</b> .	81
<b>Figura 3.7</b> Evaluación de la actividad antiviral de los compuestos <b>20</b> , <b>24</b> y <b>25</b> aislados de <i>D. pfaaffii</i> .	82
<b>Figura 3.8</b> Evaluación de citotoxicidad de los compuestos 20, 24 y 25 aislados de <i>D. pfaaffii</i> .	82

### 4. SEMISÍNTESIS DE DOLABELLANOS OXIGENADOS CON ACTIVIDAD ANTI VIH-1 IN VITRO MEJORADA

<b>Figura 4.1</b> Dolabellanos con actividad antiviral aislados de <i>D. dichotoma</i> (compuesto <b>27</b> ) y <i>D. pfaaffii</i> (Compuestos <b>18-20</b> ).	97
--	----



## Lista de tablas

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Tabla 1.1</b> Distribución geográfica de los subtipos de VIH-1	17
<b>Tabla 1.2</b> Compuesto de origen marino con actividad antiviral en el mercado o en fases clínicas y preclínicas	19
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Tabla 2.1</b> Poblaciones de especies de Dictyota estudiadas en la región tropical atlántica americana	28
<b>Tabla 2.2.</b> Lista de especies de la tribu Dictyoteae reportadas para la región caribe colombiana	46
<b>Tabla 2.3</b> Lugar de recolección, rendimientos de los extractos y agrupación de acuerdo a su perfil cromatográfico de las especies de algas estudiadas	58
<b>Tabla 2.4</b> Desplazamiento de $\delta_C$ y $\delta_H$ para los compuestos tipo guayano prenilado <b>20-22</b> aislados de algas del género <i>Dictyota</i>	63
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Tabla 3.1</b> Desplazamientos de $\delta_C$ y $\delta_H$ para los compuestos <b>24-26</b>	79
<b>Tabla 3.2</b> Valores de actividad antiviral y citotoxicidad de compuestos <b>20, 24 y 25</b> aislados de <i>D. pfaffii</i> y Nevirapina	82
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Tabla 4.1</b> Valores de actividad antiviral y citotoxicidad de compuestos <b>20, 24 y 25</b> aislados de <i>D. pfaffii</i> y Nevirapina	



## Lista de Símbolos y abreviaturas

<i>Símbolo</i>	<i>Término</i>
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido deoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AMD	Alliance for Microbicide Development
ARV	Antirretrovirales
br d	Doblete ancho
br s	Singlete ancho
cADN	ADN complementario
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>
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 5,
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
d	Doblete
dd	Doble doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dt	Doble triplete
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
EM	Espectrometría de masas
eV	Electron Volt
gp	Glicoproteína
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etansulfónico
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IE	Ionización por impacto electrónico
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
IK	Índice de Kovatz
J	Constante de acoplamiento

---

m	multiplete
mARN	ARN mensajero
m-CPBA	Ácido metacloro-perbenzóico
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MCF-7	Células de cáncer de mama de la Michigan Cancer Foundation
MT-2	Linfocitos humanos T leucemia
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de Naciones Unidas
ONUSIDA	Organización de Naciones Unidas contra el SIDA
PHA	Polihidroxiclcanoato
PN	Producto natural
RA	Reactivo analítico
RED-Al	Hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio de sodio
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
<i>rbcl</i>	Gen que codifica para el cloroplasto
s	Singlete
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SFB	Suero Fetal Bovino.
SDS	Dodecilsulfato de sódio
t	Triplete
TARGA	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
t-BuOOH	Tert-butil hidroperóxido
$T_i$	Temperatura inicial
TR	Transcriptasa Reversa
UV/Vis	Ultravioleta visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
VIS	Virus de Inmunodeficiencia en Simios
VHS	Virus de Herpex Simplex
VES	Virus de Estomatitis Vesicular
$\delta$	Desplazamiento (ppm)
$\lambda$	Longitud de onda

---

# Introducción

El estudio de los productos naturales en el desarrollo de medicamentos es una práctica antigua y bien establecida, que ha llevado al descubrimiento y uso de importantes compuestos de interés farmacológico como la morfina, la digitalina, la penicilina y la aspirina, entre otros.[1] El ecosistema marino representa más de la mitad de la diversidad global y se estima que contiene hasta 500 millones de especies distintas, ofreciendo una inmensa fuente de nuevos compuestos con actividades aún desconocidas.[2, 3] Recientemente se ha reportado que el océano contiene 34 de los 36 phyla existentes en el planeta, con cerca de 300.000 especies descritas de plantas y animales, que representan sólo un pequeño porcentaje del total de las especies que se calcula existen en el mar, muchas aún sin describir. Dentro de los phyla marinos, se destacan las macroalgas, organismos fotosintéticos de amplia distribución en el planeta y con una gran importancia económica para el hombre pues han venido siendo utilizadas como alimento y como fuente de gomas (agar agar, ácido algínico, carrageninas etc).

Además de poseer una gran importancia industrial, las macroalgas, se han destacado como fuente de compuestos con promisoria actividad nematocida, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antidiabética, antioxidante, citotóxica y antiviral.[4] Dentro del conjunto de moléculas aisladas de estas fuentes, queremos destacar los terpenos aislados de algas pardas de la tribu Dictyoteae, que han mostrado una muy buena actividad antiviral frente al virus VIH-1. De hecho, algunos de ellos están patentados para este uso.[5]

En contraste con lo anterior, a la fecha no existen trabajos en Colombia sobre la química de las macroalgas del Caribe y del Pacífico; existiendo, estudios sobre su biología, taxonomía, y ecología; así como, aspectos aplicados, e industriales, orientados a su aprovechamiento sustentable: acuicultura, extracción de carrageninas, aprovechamiento de las arribazones,

extracción de agar como gelificante para cultivos microbiológicos, bioacumulación, y fertilización de cultivos agrícolas. [6]

Frente al poco conocimiento químico de algas en el país se desarrolló el proyecto **Bioprospección de algas de la tribu Dictyoteae del Caribe**, en la Universidad Nacional de Colombia, con la colaboración de la Universidad Federal Fluminense (UFF, Brasil), y el Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (Brasil). En este marco se desarrolló la presente tesis de maestría.

Este tesis de maestría se encuentra dividido en 4 capítulos auto-contenidos, para facilidad del lector, los cuales serán transformados en artículos científicos próximamente.

En el **capítulo 1** se hizo una revisión bibliográfica de productos naturales de macroalgas marinas, buscando destacar aquellos con actividad antiviral frente al VIH-1. Así mismo, se presenta el estado del arte en Colombia. En el **capítulo 2** se presentan los resultados del análisis metabólico llevado a cabo para un grupo de algas de la tribu Dictyoteae recolectadas en costas colombianas y brasileñas; adicionalmente se muestra el estudio químico de un alga de la tribu Dictyoteae recolectada en Santa Marta. En el **capítulo 3** se discuten los resultados del estudio químico de *Dictyota pfaffii* (recolectada en Atolón de las Rocas, Brasil), en el que se hizo énfasis en los diterpenos minoritarios del alga logrando aislar nuevos dolabellanos con actividad anti VIH-1. Por último, en el **capítulo 4** se muestran los resultados de los esfuerzos semisintéticos sobre el dolabellano mayoritario del octocoral caribeño *Eunicea laciniata*, con el fin de mejorar la actividad antiviral frente al VIH-1.

## Bibliografía

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **2012**, 75, (3), 311-335.
2. Tziveleka, L. A.; Vagias, C.; Roussis, V., Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Current topics in medicinal chemistry* **2003**, 3, (13), 1512-35.
3. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Nat Prod Rep* **2013**, 30, (2), 237-323.
4. El Gamal, A. A., Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2010**, 18, (1), 1-25.

- 
5. Paixão Frugulhetti, I. Extrato de produtos Naturais Marinhos apresentando ação inibitória contra o virus HIV-1. Patente 020100119, 2010.
  6. Álvarez, L. R.; Pardo, P. C. M.; Trespacios, R. A. A., Evaluación y utilización potencial de las macroalgas marinas del Caribe y el Pacífico de Colombia: estado actual de su conocimiento. *Biosalud* **2007**, 6, 113-129.





# 1. Productos Naturales de macroalgas marinas y antivirales: Estado del arte

Las macroalgas marinas son organismos fotosintéticos que han sido utilizadas ancestralmente como alimentos, especialmente en Asia, por su alto aporte nutricional. Igualmente, se han utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de: enfermedades asociadas a la deficiencia de yodo (Bocio, Enfermedad de Basedow e hipertiroidismo), desórdenes intestinales, la hipoglicemia y la hipercolesterolemia; así como antihelmínticos.[1]

Desde el punto de vista biológico, las macroalgas suelen ser clasificadas en tres grupos de acuerdo a sus pigmentos principales: [2]

- Algas Verdes (Chlorophyta): Contienen clorofila A y B
- Algas rojas (Rodophyta): Contienen ficoeritrina y ficocianina
- Algas Pardas (Phaeophyta): Contienen clorofila C, Xantofila y fucoxantina.

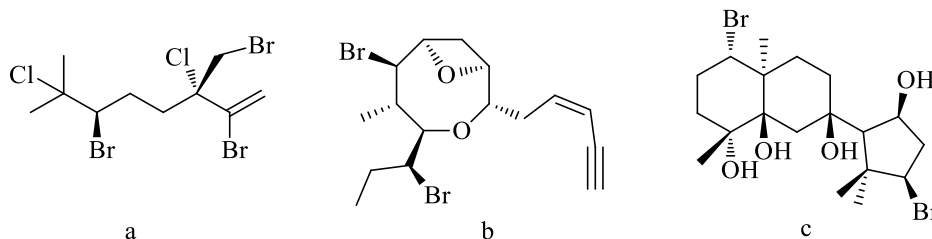
Estos organismos han sido objeto de gran cantidad de estudios químicos y han sido reconocidas como fuente de compuestos con actividad nematocida, antibacterial, antifúngica, antiinflamatoria, antidiabética, antioxidante, citotóxica y antiviral. [3] Entre las algas, las rojas son consideradas como la mayor fuente de metabolitos bioactivos; mientras las verdes son las que tienen menor número de reportes de compuestos nuevos con actividad biológica; así, las algas pardas ocuparían un lugar intermedio. [4-6]

## 1.1. Algas Rojas

El color rojo de estas algas es el resultado del enmascaramiento de la clorofila A y el  $\beta$ -caroteno por parte de la ficoeritrina y la ficocianina.[7] Las paredes celulares están hechas de celulosa, agares y carragenina. Muchas algas rojas son utilizadas como alimento, entre ellas se destaca el alga japonesa conocida como Nori, siendo este el ejemplo de acuicultura más importante en el mundo con un valor cercano a los US\$1000 millones de dólares anuales. Las algas del género *Kappaphycus* y *Betaphycus* son las fuentes más importantes de carragenina, un ingrediente comúnmente utilizado en la industria alimenticia (yogurt, leche achocolatada, pudding, etc). Las algas de los géneros *Gracilaria*, *Gelidium* y *Pterocladia* son comúnmente usadas en la manufactura de agares (medios de cultivo para microorganismos con aplicaciones biotecnológicas). Como ya se mencionó, las algas rojas son consideradas como la fuente más importante de metabolitos secundarios, y se destacan los compuestos con actividades citotóxica, nematocida, antifúngica, antiinflamatoria, alguicida, hepatoprotectora, antiviral, antioxidante, antidiabética, antimalárica, insecticida, neurofisiológica, e inhibidora de la lipoxigenasa, entre otras.[3]

Este tipo de algas es reconocido por la presencia de compuestos halogenados, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos.[3] Los monoterpenos del alga *Portieria hornemaniai* (figura 1.1.) presentan actividad antitumoral y estuvieron en fases preclínicas durante la década de los 90's; actualmente se estudian algunos derivados sintéticos de estos productos, los cuales han presentado actividad similar a la cabeza de serie frente a líneas celulares cancerígenas pero con menor toxicidad. [8]

Sesquiterpenos tipo laurano y laurokamureno de *Laurencia okamurai* (figura 1.1.) presentaron actividad citotóxica frente a líneas celulares de melanoma. Un derivado sintético de estos sesquiterpenos fue patentado para el tratamiento del melanoma, inhibiendo el crecimiento e induciendo la apoptosis celular con  $EC_{50}$  10 $\mu$ M. [9] Así mismo, de *Laurencia yonaguniensis*, colectada en las costas de Yonaguni Japón, se aislaron diterpenos tipo neoirieano (figura 1.1.) con actividad antibacterial frente a *Alcaligenes aquamarinus* y *Escherichia coli*. [10]

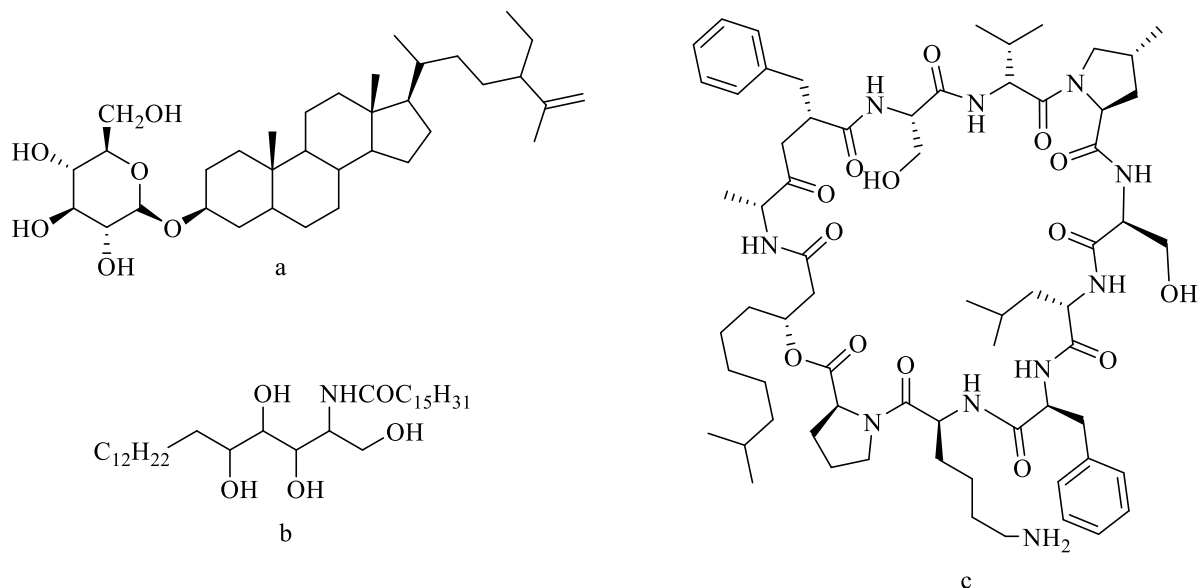


**Figura 1.1** Estructura de algunos compuestos activos de algas rojas a) Monoterpeno halogenado aislado de *Portieria hornemanii* b) Laurano aislado de *Laurencia pinnata* c) Neoirieano aislado de *Laurencia yonaguniensis*

## 1.2. Algas verdes

El color verde característico de estas algas se debe principalmente a la presencia de las clorofilas A y B, que se hallan en la misma proporción que en las plantas superiores.[2] Hay pocos informes de nuevos metabolitos secundarios obtenidos a partir de estas algas verdes –Chlorophyta-. No obstante, se han reportado compuestos con actividad antiinflamatoria, citotóxica, antibacteriana, antiplasmodica, antiviral, antimutagénica, e inhibidora de la enzima humana tirosinofosfatasa B.[3] A continuación, se presentan algunos de los principales productos naturales aislados de algas verdes, así como su actividad biológica (figura 1.2).

Se ha encontrado que los extractos de algas del género *Ulva* contienen glucopiranosidos con actividad antiinflamatoria; esfingosinas con actividad antiviral,[11] a la vez que una gran cantidad de ácidos grasos y esteroides. Mientras, las algas del género *Bryopsis* poseen una serie de depsipéptidos cíclicos con actividad antitumoral.[12] De otro lado, de las algas del género *Caulerpa* han sido aislados sesquiterpenos con capacidad de inhibir la enzima humana tirosinofosfatasa B,[13] también han sido encontrados algunos polisacáridos sulfatados con actividad antiviral.[14]



**Figura 1.2.** Estructura de algunos compuestos activos de algas verdes a) glucopiranosidos aislados de *Ulva laetuea*, b) Esfingosina aislada de *Ulva fasciata* y c) Depsipeptido aislado del alga *Bryopsis* sp.

### 1.3. Algas Pardas

El color pardo de estas algas es el resultado de la presencia de pigmentos como la xantofila y la fucoxantina que enmascaran el color de otros pigmentos presentes en ellas, como la clorofila A-C y el  $\beta$ -caroteno.[2] Las reservas energéticas en estas algas se encuentran en forma de lamirina, de polisacáridos complejos y alcoholes de alto peso molecular. Sus paredes celulares se encuentran hechas de celulosa y ácido algínico.[2] Muchos compuestos aislados de algas pardas han presentado actividad citotóxica, nematocida, antifúngica, antiinflamatoria, alguicida, hepatoprotectora, antiviral, antioxidante y antidiabético y algunos se les ha identificado actividad protectora contra herbívoros, siendo la mayoría de los compuestos aislados del tipo terpenoide, o con un origen terpenoidal.[3]

A partir del alga parda *Fucus vesiculosus* se han obtenido ésteres sulfatados de fucosa con un peso de alrededor de 2000 uma. A partir de estos sulfopolisacáridos se desarrolló el Fucoidan, compuesto que inhibe el efecto de la replicación del ADN en los virus del herpes (VHS-1, y VHS-2), del virus VEV (Virus de Estomatitis Vesicular), del virus Sindbis y del

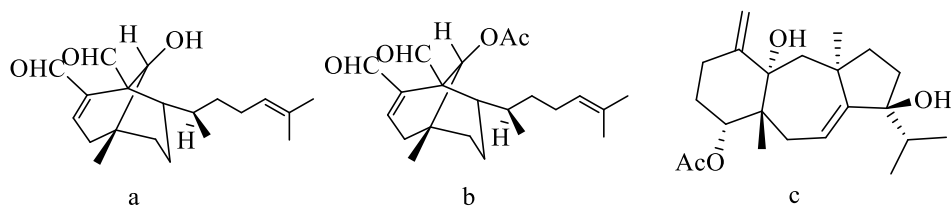
VIH-1.[15] Compuestos como las preniltoluquinonas aisladas de *Cystoseira crinita* mostraron actividad antioxidante frente al DPPH.[16]

Entre las algas pardas, se destacan las pertenecientes a la tribu Dictyoteae, que se caracterizan por producir una gran cantidad de diterpenos, con núcleos tipo dichotomano, xeniano, dolastano y dolabellano, los cuales poseen una destacada actividad citotóxica, antiviral, antibacterial, y leishmanicida.[17-20] A continuación se profundiza en los compuestos aislados de esta tribu de algas pardas, que son el eje de la presente tesis de maestría.

### 1.3.1. Diterpenos aislados de algas pardas de la tribu Dictyoteae: Actividad biológica y función ecológica

Los compuestos aislados a partir de las de género *Dictyota* han mostrado una importante actividad biológica. Así por ejemplo, el 6(R)-6-hidroxidichotoma-3,14-dien-1,17-dial y su derivado acetilado (Figura 1.3), aislados de *D. menstrualis*, han mostrado actividad inhibitoria contra TR-VIH.(Transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana). Los diterpenos tipo xeniano, aislados de *Dictyota* sp.[19], y los diterpenos, del tipo acetato de amijiol, aislados de *D. dichotoma* exhibieron actividad anticancerígena. Este último compuesto ha mostrado tener actividad citotóxica contra la línea celular MCF-7, con una IC<sub>50</sub> igual a 21,2 µg/mL.[17]

El diterpeno tipo dolastano (4R,9S,14S)-4α-acetoxi-9β,14α-dihidroxidolast-1(15),7-dieno aislado del alga *Canistrocarpus cervicornis* (figura 1.3) presentó actividad leishmanicida frente al parásito *Leishmania amazonensis* con una IC<sub>50</sub> de 2.0 µg/mL, 12.0 µg/mL, y 4.0 µg/mL contra la forma promastigote, amastigote axénica y amastigote intracelular, respectivamente. [20] Este diterpeno también fue activo como inhibidor del veneno de la serpiente *Lachesis muta*, evitando la hemólisis de los eritrocitos causada por el veneno de *L. muta* (ensayos *in vitro*), a la vez que previene la hemorragia producida por el veneno (propiedades anticoagulantes) en ratones, por lo cual se perfila como un antiofídico promisorio.[21]

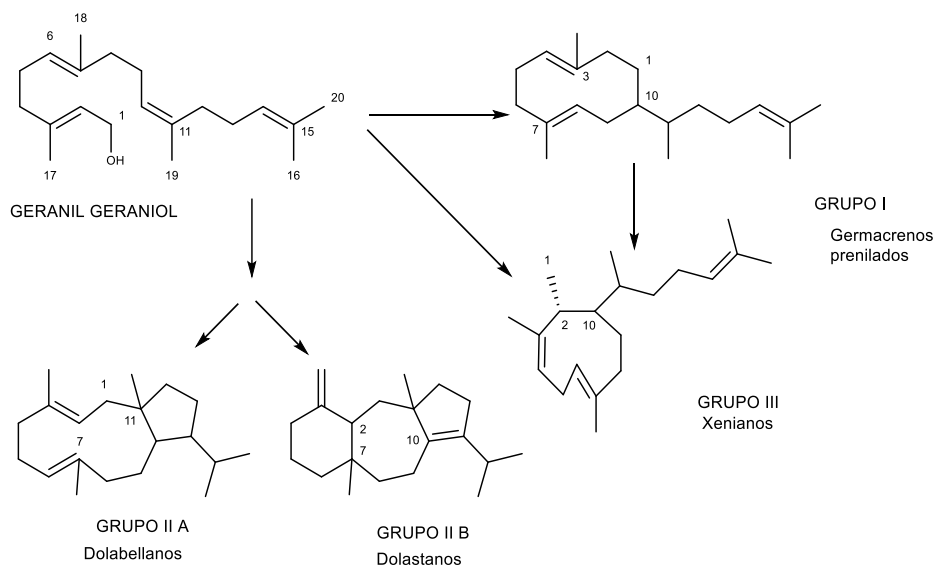


**Figura 1.3** Diterpenos bioactivos aislados de algas de la tribu Dicytoteae a) y b) Diterpenos aislados de *D. menstrualis* con actividad inhibitoria de TR-VIH, y c) Diterpeno tipo dolastano aislado de *C. cervicornis* con actividad Leishmanicida, antiofídica e inhibidora de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa

Adicionalmente, este dolastano (figura 1.3) y el 4,7-diacetoxi-14-hidroxi-dolast-1(15),8-dieno aislados de *C. cervicornis* inhibieron la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa en preparaciones de cerebro e hígado de cerdo de Guinea en un 40% y 80% respectivamente, a concentraciones de 0,5mM, siendo de especial interés que estos compuestos sean capaces de inhibir las dos isoformas de esta enzima, pues estos resultados pueden indicar que estos compuestos son promisorios en el tratamiento del cáncer.[22]

### 1.3.2. Utilidad taxonómica de los terpenos presentes en algas de la tribu Dictyoteae

Los productos naturales no sólo han tenido éxito en la industria farmacéutica y biomédica, sino que también han encontrado aplicación en la delimitación taxonómica entre especies, es decir en la quimiotaxonomía. Dada la clasificación taxonómica particularmente difícil de la tribu Dictyoteae, debida su alta variabilidad morfológica,[23] la aproximación quimiotaxonómica ha emergido como una excelente posibilidad en la resolución del problema de clasificación de estas algas. Estudios de Teixeira y colaboradores han mostrado que los diterpenos presentes en las algas de la tribu Dictyoteae pueden ser considerados como marcadores quimiotaxonómicos, útiles para la delimitación de especies de estos géneros.[24] Así, los diterpenos mayoritarios encontrados en estas algas pueden ser distribuidos en tres grupos (I-III) dependiendo del lugar donde ocurra la primera ciclación de su precursor biogénico común, el geranil-geraniol (Figura 1.4). El grupo I está constituido por germacrenos prenilados; el grupo II, se subdivide en dos subgrupos: el IIA, que incluye los dolabellanos, y IIB, que incluye los dolastanos y secodolastanos. Finalmente, el grupo III incluye diterpenos tipo xeniano y dichotomano.[24] A continuación se presenta un esquema que resume lo anterior.



**Figura 1.4** Ruta biogénica propuesta por Teixeira, [24] grupos de terpenos (I-III) de acuerdo con la primera ciclación de su precursor común el geranil-geraniol.

Así, y de acuerdo con lo anterior, los especímenes de la tribu Dictyoteae se pueden agrupar en diferentes taxas, no sólo en función de sus características morfológicas sino que también según el tipo de diterpenos que contienen (grupos I a III).[25] Esta estrategia quimiotaxonómica ha permitido delimitar algunas especies e incluso identificar otras nuevas, como es el caso de *Dictyota dolabellana*, llamada así por su alto contenido de diterpenos del tipo dolabellano.[26]

#### 1.4. Estudios de algas en Colombia.

Los trabajos en Colombia sobre macroalgas del Caribe y del Pacífico incluyen el estudio de su biología, taxonomía, ecología y análisis proximal, así como esfuerzos que buscan su utilización industrial orientada a un aprovechamiento sustentable. Entre ellos se han hecho estudios de acuicultura, aprovechamiento de las arribazones, extracción de agar como gelificante en cultivos microbiológicos, bioacumulación, fertilización de cultivos agrícolas e ingeniería química.[27] Estos estudios se han efectuado principalmente en la Costa Caribe, ya que allí se encuentran condiciones óptimas de muestreo, así como la presencia de diversos ecosistemas tales como: arrecifes de coral, praderas de fanerogamas, manglares y costas rocosas, que favorecen una amplia diversidad de macroalgas.[28]

Para el año 2003, y tras una amplia y ambiciosa serie de investigaciones taxonómicas y ecológicas, el número de algas conocidas en las costas de Colombia ascendía a 605 especies, en el Caribe 472 (120 verdes, 62 pardas y 290 rojas), y en el Pacífico 133 (27 verdes, 22 pardas y 84 rojas). [28]

En este marco, las universidades colombianas han sido las encargadas de los estudios químicos de estos especímenes. La Universidad Nacional de Colombia propuso profundizar en el aprovechamiento de las algas marinas del Caribe colombiano a través de la evaluación de su composición química, enfatizando en compuestos como el ácido alginico, los minerales,[29] los polisacáridos, agares, agaroides, carrageninas y pigmentos.[30] La Universidad de los Andes evaluó los pastos marinos como fuente comercial de agar y suplemento alimenticio de animales.[31] La Universidad Jorge Tadeo Lozano, con sus proyectos asociados a la Facultad de Biología Marina, evaluó la actividad biológica de extractos crudos de algas marinas,[28] en el ciclo celular de la línea HT29, así como el uso de hidrogeles para mejoramiento del suelos.[32] La Universidad de Antioquia, con el grupo de investigación del Laboratorio de Productos Naturales (Facultad de Ciencias Farmacéuticas) ha trabajado especialmente en algas pardas y rojas, provenientes del Caribe colombiano, evaluando un análisis proximal y determinación de los polisacáridos y esteroides libres; adicionalmente, han evaluado la actividad antimicrobiana y antimetabólica de ciertos extractos metanólicos de algas.[33] En cuanto a las algas del pacífico, estas han sido poco estudiadas, siendo la Universidad del Cauca la más activa en este aspecto, logrando elucidar la estructura de un ácido graso y un derivado del ácido *p*-cumárico presentes en el alga roja *Brosthychia calliptera*, recolectada en la bahía de Buenaventura.[34]

De todo lo anterior es notable, que si bien se han evaluado algunos minerales y metabolitos primarios, no se ha avanzado mucho en el estudio de los metabolitos secundarios, salvo por el último trabajo mencionado. Esto contrasta con los avances que se han logrado en el país en lo referente a la química de invertebrados marinos (por ejemplo esponjas, octocorales o cianobacterias) [35, 36] poniendo de manifiesto la necesidad de avanzar en el estudio de productos naturales marinos de algas. Lo anterior es particularmente cierto para las algas de la tribu Dictyoteae que han demostrado poseer diterpenos sumamente activos como antivirales.[37, 38]



## **1.5. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**

### **1.5.1. Generalidades del VIH**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta algunas células del sistema inmune, los linfocitos T CD4+, generando un deterioro progresivo del mismo. La pérdida de los linfocitos T CD4+ conduce al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).[39] El VIH/sida es la principal causa de mortalidad por enfermedades infecciosas; según un estudio de la OMS a 2009 dicha enfermedad había cobrado más de 27 millones de vidas, y se calcula que cada año mueren por esta causa 2 millones de personas a nivel mundial, mientras que 2,6 millones de personas se infectan.[39] En la actualidad, se calcula que a nivel mundial hay 33.4 millones de personas infectadas con el VIH, mientras para América latina se cuentan 2 millones de personas infectadas por el virus. La infección se concentra en algunos grupos poblacionales, tales como: homosexuales, población transexual, trabajadoras sexuales y usuarios de drogas ilegales no obstante, la infección está avanzado a otros sectores de la población.[39, 40]

Esta enfermedad además de su gran impacto social, también demanda un alto gasto anual para el tratamiento de los pacientes. La Organización de Naciones Unidas contra el SIDA ONUSIDA estima que a nivel mundial se invirtieron más de US\$25.000 millones para los servicios relacionados con el VIH durante el año 2010.[40] La infección por VIH-1 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1) con diagnóstico oportuno, y correcto acceso a tratamiento, usualmente dado con una combinación de 3 o 4 medicamentos antiretrovirales (Terapia Antirretroviral de Gran Actividad, TARGA), reduce las tasas de mortalidad y aumenta expectativa de vida en pacientes infectados con este virus.[41] Sin embargo, el tratamiento actual no erradica el VIH-1 del tejido infectado y la replicación del virus permanece activa,[42] así que el tratamiento sólo controla la enfermedad pero no la cura. De otro lado, el uso de este tipo de tratamiento se está limitado por el aumento de líneas resistentes de HIV-1 y en algunos casos, por trastornos metabólicos. [43]

Por estas razones actualmente se continúa en la búsqueda de nuevos agentes anti-retrovirales, capaces de inhibir los diferentes estadios de vida del VIH-1; y así, encontrar una cura definitiva contra el SIDA.[44]

### 1.5.2. Estructura del virus VIH

El virus de VIH tiene un tamaño de aproximadamente 100nm y se compone de dos hebras de RNA no complementarias (genoma viral), tres enzimas: Transcriptasa reversa, Integrasa y Proteasa envueltas en una cápsula de proteínas llamada Nucleocápside. Adicionalmente, posee una envoltura formada por una doble capa lipídica que cuenta con dos glicoproteínas transmembranales gp120 y gp41 (figura 1.5).[45]

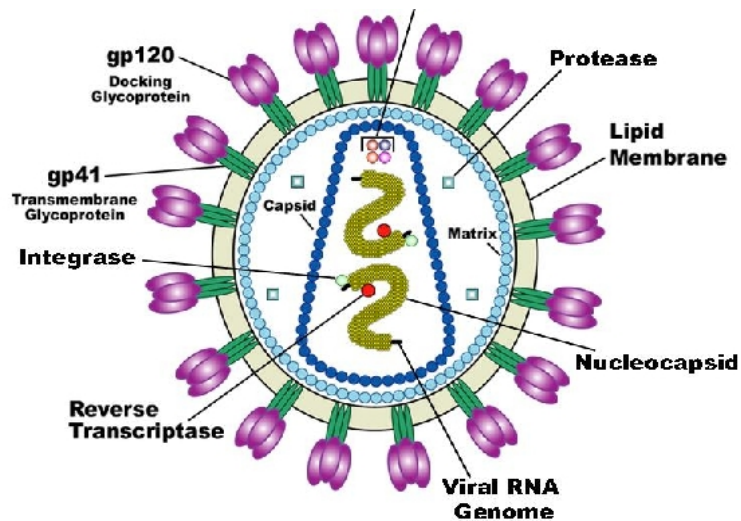


Figura 1.5 Estructura básica del VIH

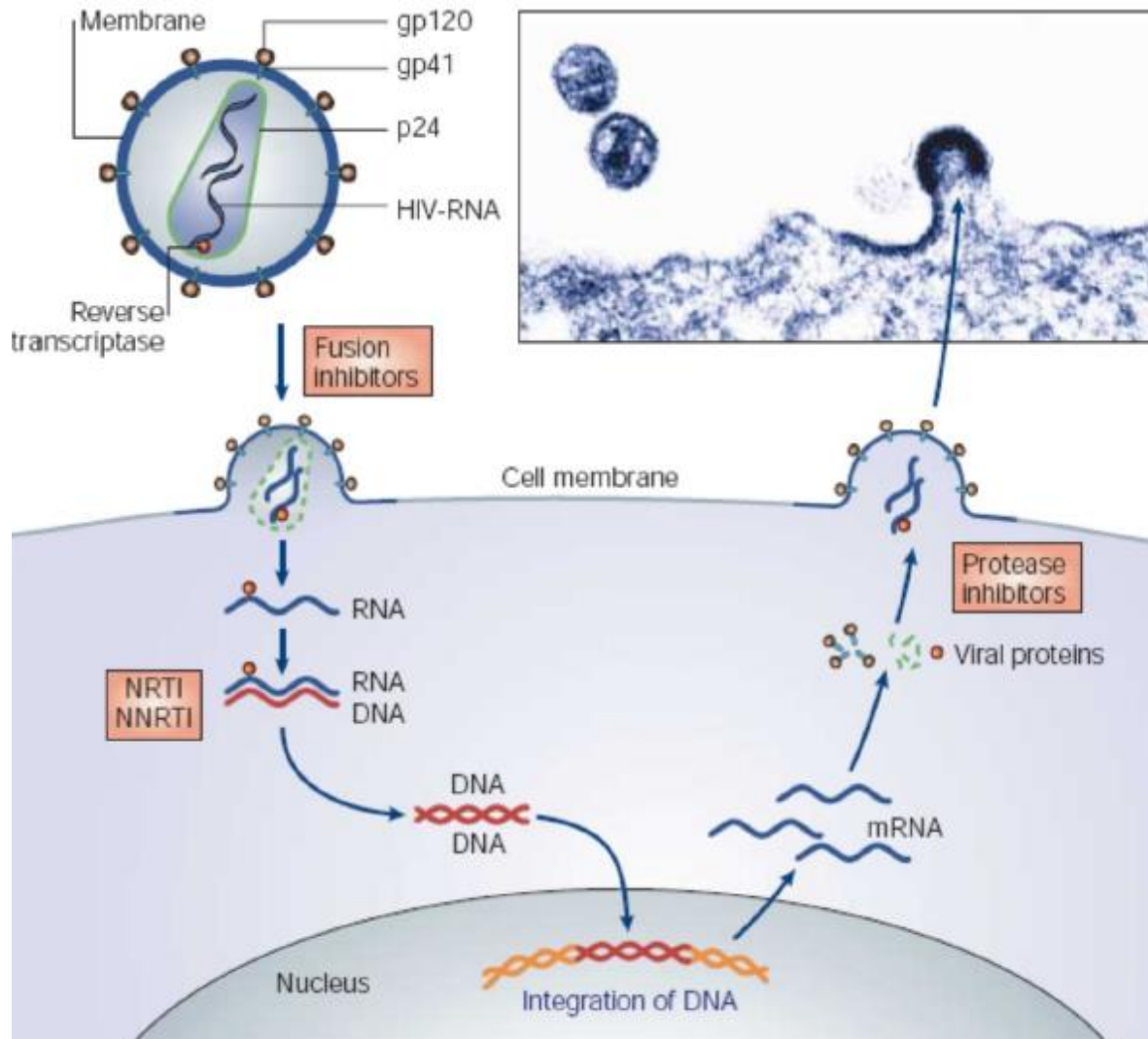
El genoma viral ya ha sido secuenciado, encontrando que posee tres genes principales:[45]

- GEN *gag*: Codifica para la proteína p55, esta se rompe en tres por acción de una proteasa en p24 (antígeno detectable), p15 y p18 (nucleocápside).
- Gen *env*: Codifica para la glicoproteína gp160, esta se rompe en dos por acción de una proteasa en gp120 (glicoproteína que se une a los receptores CD4) y gp41 (glicoproteína transmembranal que media la unión entre el virus y el linfocito).
- Gen *pol*: Codifica para la proteína p100, esta se rompe en tres por acción de una proteasa en p31 (transcriptasa reversa), p51 (integrasa) y p64 (proteasa).

En cuanto al ciclo de vida del virus (figura 1.6), se sabe que la primera etapa del ciclo comprende el reconocimiento y entrada a la célula. El VIH tiene preferencia por las células del sistema linfático con receptores CD4+; en esta etapa, la glicoproteína gp120 de la

envoltura viral se une selectivamente a los antígenos de los linfocitos CD4+; inversamente, los anticuerpos bloquean el sitio de unión del virus, y cuando el VIH se une a la célula huésped, la glicoproteína gp41 queda en contacto con la membrana de la célula huésped, y ésta se fusiona con la membrana viral. Esta fusión celular y entrada del virus requiere de una molécula co-receptora, la CXCR4 (o X4) y/o CKR5 (o R5), que definen afinidad (tropismo) por células del sistema linfático tipo T o afinidad por los macrófagos respectivamente.[45]

Con el material vírico al interior de la célula se procede a la eliminación de las cubiertas proteicas, y a la liberación del ARN vírico en el citoplasma. Cada una de las dos moléculas de ARN llega desde el virión asociado a una molécula de transcriptasa reversa, que se ocupa del proceso, formando un cADN de doble cadena. Cabe destacar que la transcriptasa reversa (TR) no tiene capacidad de realizar “*proof reading*” por lo que tiene una alta tasa de mutación, hasta 105 mutaciones por día en un individuo infectado. Lo que plantea un reto adicional en el control de la enfermedad. El paso siguiente es la integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped. Para ello penetra en el núcleo y se inserta en el ADN celular con ayuda de una integrasa, que procede del virión infectante, para formar así el provirus. La transcripción del ADN vírico a proteínas ocurre por los mecanismos normales de la célula infectada. El resultado de la transcripción es un mRNA (ARN mensajero) que proporciona la información para la traducción, que es realizada a través del aparato molecular correspondiente, los ribosomas, generando las poliproteínas p160, p100 y p55 que aún deben ser cortadas en fragmentos por acción de proteasas específicas del VIH para convertirse en proteínas funcionales. Las proteínas víricas fabricadas se ensamblan, junto con ARN provirales, para formar los componentes internos de la estructura del virión, que constituyen la cápside y su contenido.[45] El último paso es la gemación, cuando los nucleoides víricos se aproximan a la membrana plasmática y se forma una protuberancia que termina por desprenderse, formando un nuevo virión o partícula infectante.[45]



**Figura 1.6** Ciclo de vida del VIH

### 1.5.3. Variantes del virus VIH-1 y VIH-2

Las enzimas y los antígenos de la envoltura del virus del VIH sufren frecuentes mutaciones, y debido a esto se han identificado dos variantes del virus, denominadas VIH-1 y VIH-2. Esta gran variabilidad genética del VIH se debe a que la transcriptasa reversa (TR) no tiene capacidad de realizar “*proof reading*”, por lo que tiene una alta tasa de mutación, hasta 105 mutaciones por día en un individuo infectado. Muchas de estas mutaciones producen partículas víricas no viables; sin embargo, también pueden producirse cepas resistentes a los fármacos actuales, o formas más virulentas. Así, mientras el virus continúe mutando nuevos subtipos del mismo serán encontrados en el futuro.[45]

### Virus de inmuno deficiencia humana 1 -VIH-1

El VIH-1 se caracteriza por su gran variabilidad en el gen *env* y baja variabilidad del gen *gag*. Basado en la secuencia de los genes *env* y *gag* se han determinado dos grupos principales: M (mayor), y O (atípico) (Tabla 1). La variación geográfica del VIH-1 y las formas de contagio al igual que la secuencia del virus, ha permitido identificar varios sub-subtipos del grupo M.[46] Por ejemplo los subtipos C y E, cepas asiáticas y africanas, representan el 47.2% de todas las infecciones[47], y tienen mayor probabilidad de ser transmitidas por vía heterosexual, mientras que el subtipo B (cepa americana) es transmitida principalmente por vía percutánea. Las cepas del subtipo O son las menos comunes y se concentran principalmente en África occidental.

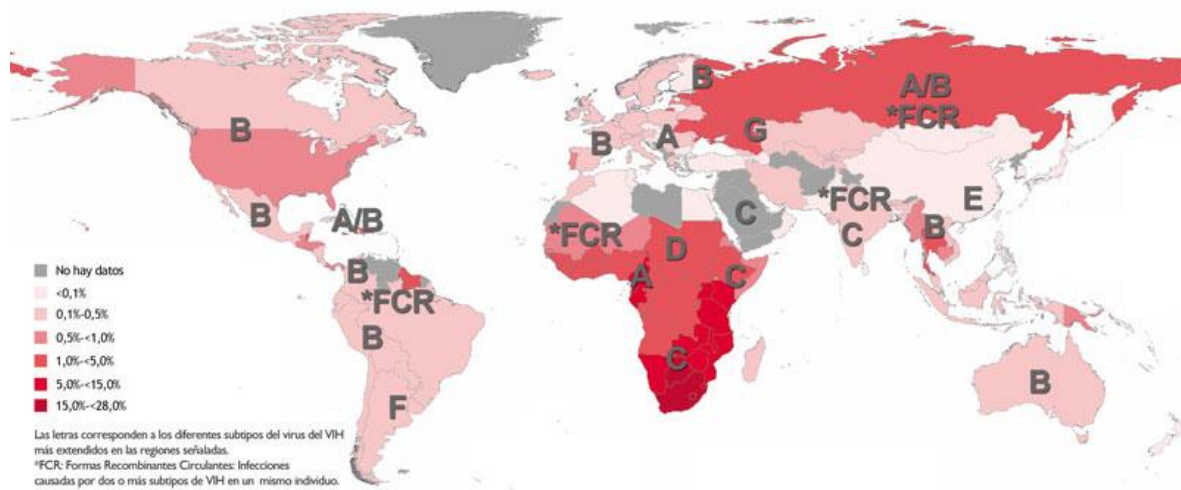
**Tabla 1** Distribución geográfica de los subtipos de VIH-1 [45]

Subtipo	Sub-Subtipos	Distribución geográfica
<b>Grupo M</b>	A	África central, Tailandia
	B	Norte y sur América, Europa occidental, Japón Australia
	C	África central y del sur, India, Brasil
	D	África central
	E	Africa central, Tailandia, Japón, Asia
	F	Sur América, África central, Europa
	G	África central, Rusia, Taiwán
	H	Gabón , Zaire, África central
	I	Chipre
	<b>Grupo O</b>	África occidental, Francia

Es importante resaltar que para un correcto tratamiento del virus es de gran importancia conocer el subtipo del virus, para así determinar el tratamiento antirretroviral más efectivo. Del mismo modo, en la búsqueda de nuevos compuestos antivirales, la elección de las cepas de ensayo entre las cepas de mayor frecuencia de Colombia, subtipo **B**,[45] aseguraría una mayor efectividad de estos compuestos en nuestra población.

## Virus de inmunodeficiencia humana 2-VIH-2

Debido a la homología de entre el 40 y el 50% en los genes *gag* y *pol* se considera como un tipo diferente virus. Tiene una similitud del 75%, en cuanto a los nucleótidos, con el virus de inmunodeficiencia en simios (VIS). Entre las particularidades de este virus se destaca que presenta baja incidencia a nivel mundial, es menos infeccioso, tiene periodos de incubación más largos y tiene una carga viral menor. Este virus se observa principalmente en África occidental y en la India, donde su incidencia es menor que la del VIH-1. Debido a su baja incidencia, el estudio del VIH-2 es considerablemente menor frente al VIH-1.[45]



**Figura 1.7** Incidencia mundial del virus del VIH en 2009. Datos ONU/SIDA 2009

### 1.5.4. Tratamientos antirretrovirales ARV

Los ARV disponibles en la actualidad pertenecen a las siguientes clases, de acuerdo a las etapas del ciclo de vida del VIH en la que intervienen.[45]

- Inhibidores de la fusión y el reconocimiento
- Inhibidores de transcriptasa reversa del tipo análogos de nucleósidos (ITR)
- Inhibidores de transcriptasa reversa no nucleósidos (NNITR)
- Inhibidores de la integrasa
- Los inhibidores de maduración (inhibidores de la proteasa)
- Estimuladores del sistema inmune

La infección por VIH-1 es generalmente tratada con una combinación de 3 o 4 medicamentos antirretrovirales que actúan en las diferentes etapas de la replicación viral (Terapia Antirretroviral de Gran Actividad, TARGA), reduciendo las tasas de mortalidad y aumentando la expectativa de vida en pacientes infectados con VIH-1.[41] Sin embargo, ninguno de los medicamentos disponibles en la actualidad son capaces eliminar por completo al virus del VIH del cuerpo del paciente, por lo que se continúa en la búsqueda de nuevos compuestos anti VIH-1. En este marco los productos naturales emergen como una alternativa interesante como fuente de compuestos antivirales.[44]

### 1.6. Productos Naturales Marinos con actividad antiviral

Desde la década de los 50's los productos naturales marinos han tenido un rol importante en el desarrollo de los primeros medicamentos antivirales (Tabla 1.2). El aislamiento y la caracterización de la esponjosina y la esponjouridina (figura 1.8), aisladas de la esponja *Tethya cripta*, se constituyeron en moléculas cabeza de serie que dieron lugar a nuevos análogos de nucleótidos, dando como resultado el Ara-A (Vidarabina), que ha sido utilizado como fármaco antiviral (Colirio contra el virus herpes simplex-VHS- y varicella zoster),[48] y el Ara-C que se utiliza para tratar diferentes formas de leucemia, así como el VHS.[49]

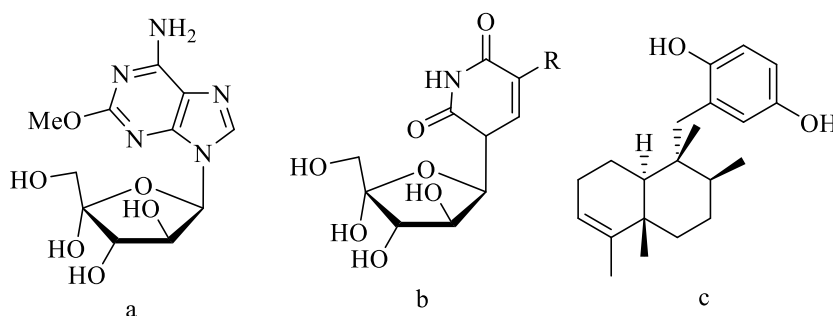
La Azidotimidina (zidovudina- AZT), también derivado sintético de los nucleósidos aislados de *Tethya cripta*, fue el primer antirretroviral aprobado como un medicamento indicado para tratamiento de personas infectadas con el VIH, por su efecto terminador de cadena en la síntesis DNA viral, retardando así la extensión de la infección por el virus.[44, 50]

**Tabla 1.2** Compuestos de origen marino con actividad antiviral en el mercado o en fases clínicas y preclínicas.

Compuesto	Organismo	Uso Antiviral	Estado
Aciclovir Análogo nucleótido	Derivado sintético del nucleósido aislado de <i>Tethya cripta</i>	VHS	En el mercado [51]
Ara-A (Vidarabina ®) Análogo nucleótido	Derivado sintético del nucleósido aislado de <i>Tethya cripta</i>	VHS	En el mercado [48]
Ara-C (Citarabina ®) Análogo nucleótido	Derivado sintético del nucleósido aislado de la esponja <i>Tethya cripta</i>	VHS	En el mercado [48]
Avarol Diterpeno	Esponja <i>Dysidea avara</i>	VIH-1	Análogos en Fase clínica[52]
Azidotimidina (AZT) Análogo nucleótido	Derivado sintético del nucleósido aislado de <i>Tethya cripta</i>	VIH-1 y VHS	En el mercado [50]

Cyanovirina-N Péptido	Cianobacteria <i>Nostoc ellipsosporum</i>	VIH-1 y VIS	Fase Clínica[53]
EP1 Exopolisacáido	Bacteria marina <i>Bacillus licheniformis</i>	VHS-2	Fase preclínica [54]
Esteres sulfatados de Fucosa	Alga parda <i>Fucus vesiculosus</i> .	VHS-1, VHS-2 VSV VIH-1	Fase preclínica [15]
Manzamida A Alcaloide	Esponja <i>Acanthostrongylophora</i>	VIH-1	Fase preclínica [55]
Dehydrofurodendina Terpeno	Esponja <i>Lendenfeldia</i> sp	VIH-1	Fase preclínica [56]
Dolabentriol Terpeno	Alga parda <i>Dictyota paffii</i>	VHS-1, VIH-1	Fase preclínica [18]

Dentro de *small molecules* (productos naturales) con actividad antiviral promisorio se destacan los terpenos, como el avarol (figura 1.8), aislado de la esponja *Dysidea avara*, que presenta una fuerte inhibición de la transcriptasa reversa del VIH-1; análogos semisintéticos de este compuesto han resultado más activos y menos tóxicos al punto que ya se encuentran en fases clínicas.[57]



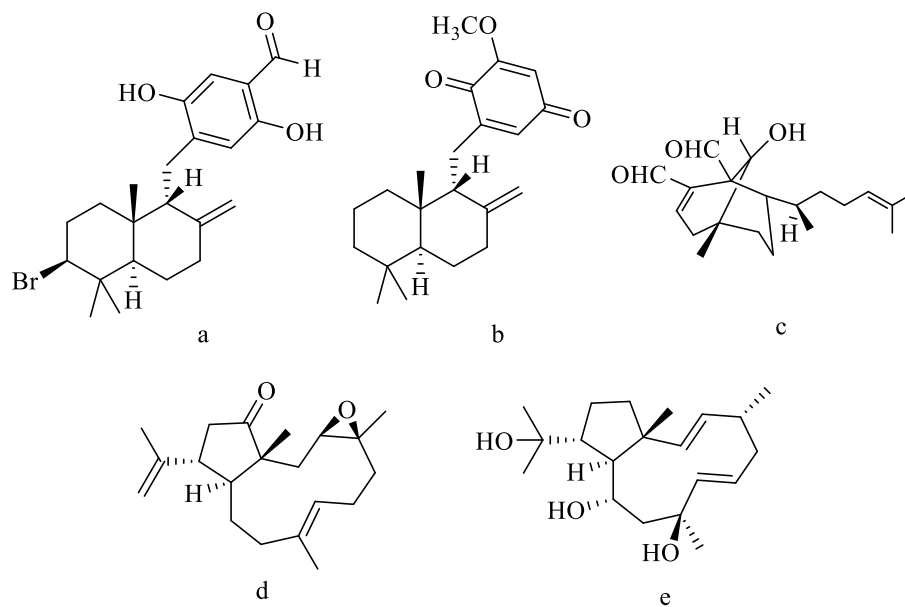
**Figura 1.8** Compuestos con actividad antiviral de origen marino a) Espongosina y b) spongouridina aislada de *Tethya cripta* c) Avarol, terpeno aislado de la esponja *Dysidea avara* con actividad anti-VIH-1.

### 1.7 Terpenos de algas con actividad antiviral

Las algas han sido identificadas con una fuente promisorio de compuestos antivirales.[3, 44] Los sesquiterpenos hidroquinolínicos peyssonol A y B (figura 1.9), de estructura similar al avarol, aislado del alga roja *Peyssonelli* sp. resultaron activos frente a la TR del virus VIH-1 y 2[58] Algunos diterpenos obtenidos de *Dictyota menstrualis*, *D. paffii* y *Styopodium zonale* han mostrado excelentes resultados frente al virus del VIH-1 y al VHS. [37, 38, 59] Así, a partir de *Dictyota menstrualis*, recolectada en Praia Rasa en la costa



norte del Estado de Río de Janeiro, Brasil, se aisló un diterpeno tipo dichotomano (figura 1.9), que inhibe la replicación viral del VIH-1 con un  $EC_{50}$  de 40  $\mu$ M. [38]



**Figura 1.9** Terpenos aislados de algas con actividad antiviral a y b) Sesquiterpenos hidroquinolinicos aislados del alga roja *Peyssonneli* sp. c) Dichotomano aislados del alga parda *D. menstrualis* d) Dolabellano aislado del alga parda *D. dichotoma* e) Dolabellano trihidroxilado aislado del alga parda *D. pfaffii*.

A partir de *Dictyota dichotoma*, recolectada cerca a la isla de Sicilia (Italia), se aisló un diterpeno tipo dolabellano (figura 1.9) que posee una fuerte actividad antiviral frente al virus de la influenza o del sida? en ensayos *in vitro*. [60] El dolabellano trihidroxilado aislado de *D. pfaffii* fue activo frente al virus VHS-1 y VIH-1 [37]. Adicionalmente, inhibe la transcriptasa reversa del VIH-1 y la morfogénesis del virus.[61] En septiembre de 2008 la agencia internacional "Alliance for Microbicide Development" (AMD) presentó a este dolabellano trihidroxilado como un candidato para el desarrollo de ensayos pre-clínicos, apoyado por la organización Fundación Bill & Melinda Gates.[62]

En la última década, (2002-2011) se han aislado 132 compuestos de organismos marinos con actividad anti VIH-1, cifra igual a la reportada para el periodo 1960-2002,[44] lo cual revela el gran progreso en los últimos años en el descubrimiento de agentes antivirales de origen marino. Sin embargo, este número aún es pequeño comparado con los compuestos antivirales aislados de organismos terrestres.[63] ´

Actualmente, hay muchos compuestos que son aislados y no son evaluados frente al VIH, por lo que se debe continuar con el screening de las librerías de productos naturales marinos, con el objetivo de descubrir nuevos agentes antivirales, especialmente hacia los nuevos targets virales (Glicoproteínas de la cápside viral, o receptores R5 y X4).[44]

Finalmente, es importante decir que las algas de la tribu Dictyoteae presentes en aguas Colombianas no han sido químicamente estudiadas, por lo cual se desconoce su composición así como su posible aplicación farmacológica o industrial, a pesar de estar presentes en nuestros mares. Adicionalmente, la delimitación clara entre especies de esta tribu es difícil, lo anterior por su alta variabilidad y complejidad morfológica. Así, el estudio químico de las algas de este género podría contribuir no sólo a su delimitación taxonómica, dada la probada utilidad quimiotaxanómica de los diterpenos que contienen las algas de esta tribu, sino que también podría contribuir al reconocimiento de nuevas moléculas con actividad antiviral o a la identificación de nuevas fuentes (especímenes Colombianos) de moléculas con actividad antiviral. En este trabajo de maestría, continuación del trabajo de pregrado,[64] se plantea iniciar el estudio químico de este tipo de algas para Colombia en el marco de lo anteriormente expuesto.

## Bibliografía

1. Trease, G. E.; Evans, W. C., *Pharmacognosy*. 14 ed.; W.B Saunders Company Ltd: London, 1996; p 18-27.
2. Garson, M. J., Biosynthetic studies on marine natural products. *Natural Product Reports* **1989**, 6, (2), 143-170.
3. El Gamal, A. A., Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2010**, 18, (1), 1-25.
4. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Nat Prod Rep* **2013**, 30, (2), 237-323.
5. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Nat Prod Rep* **2012**, 29, (2), 144-222.
6. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R., Marine natural products. *Nat Prod Rep* **2011**, 28, (2), 196-268.
7. Bold, H. C.; Wynne, M. J., *Introduction to the algae structure and reproduction*. 2 ed.; Prentice-Hall Inc.: Englewood Cliffs, NJ, 1985.
8. Fuller, R. W.; Cardellina, J. H.; Kato, Y.; Brinen, L. S.; Clardy, J.; Snader, K. M.; Boyd, M. R., A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, (16), 3007-3011.
9. Moon-Moo, K.; Sang-Hoon, L.; Se-Kwon, K. Patente 2009048195, 2009.

10. Takahashi, Y.; Daitoh, M.; Suzuki, M.; Abe, T.; Masuda, M., Halogenated metabolites from the new Okinawan red alga *Laurencia yonaguniensis*. *J Nat Prod* **2002**, 65, (3), 395-8.
11. Garg, H. S.; Sharma, M.; Bhakuni, D. S.; Pramanik, B. N.; Bose, A. K., An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva Fasciata*. *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, (12), 1641-1644.
12. Hamann, M. T.; Otto, C. S.; Scheuer, P. J.; Dunbar, D. C., Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis* sp.(1). *J Org Chem* **1996**, 61, (19), 6594-6600.
13. Mao, S. C.; Guo, Y. W.; Shen, X., Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, 16, (11), 2947-50.
14. Wang, H.; Li, Y.-L.; Shen, W.-Z.; Rui, W.; Ma, X.-J.; Cen, Y.-Z., Antiviral activity of a sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) compound isolated from the green alga *Caulerpa racemosa*. In *Botanica Marina*, 2007; Vol. 50, p 185.
15. Beress, A.; Wassermann, O.; Tahhan, S.; Bruhn, T.; Beress, L.; Kraiselburd, E. N.; Gonzalez, L. V.; de Motta, G. E.; Chavez, P. I., A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J Nat Prod* **1993**, 56, (4), 478-88.
16. Fisch, K. M.; Böhm, V.; Wright, A. D.; König, G. M., Antioxidative Meroterpenoids from the Brown Alga *Cystoseira crinita*. *Journal of Natural Products* **2003**, 66, (7), 968-975.
17. Ayyad, S.-E. N.; Makki, M. S.; Al-kayal, N. S.; Basaif, S. A.; El-Foty, K. O.; Asiri, A. M.; Alarif, W. M.; Badria, F. A., Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, (1), 175-182.
18. Cirne-Santos, C. C.; Souza, T. M.; Teixeira, V. L.; Fontes, C. F.; Rebello, M. A.; Castello-Branco, L. R.; Abreu, C. M.; Tanuri, A.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., The dolabellane diterpene Dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. *Antiviral Research* **2008**, 77, (1), 64-71.
19. Paula, J. C. D.; Vallim, M. A.; Teixeira, V. L., What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, 21, 216-228.
20. Santos, A. O. d.; Britta, E. A.; Bianco, E. M.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V., 4-Acetoxydolastane Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* as Antileishmanial Agent. *Marine Drugs* **2011**, 9, (11), 2369-2383.
21. Moura, L. D.; Sanchez, E. F.; Bianco, E. M.; Pereira, R. C.; Teixeira, V. L.; Fuly, A. L., Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. *Biomed Pharmacother* **2010**.
22. Garcia, D. G.; Bianco, E. M.; Santos Mda, C.; Pereira, R. C.; Faria, M. V.; Teixeira, V. L.; Burth, P., Inhibition of mammal Na(+)/K(+)-ATPase by diterpenes extracted from the Brazilian brown alga *Dictyota cervicornis*. *Phytother Res* **2009**, 23, (7), 943-7.
23. De Clerck, O., *The genus Dictyota in the Indian Ocean*. Opera Botanica Belgica, 2003; Vol. 13, p 205.
24. Teixeira, V. L.; Kelecom, A., A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *Science of The Total Environment* **1988**, 75, (2-3), 271-283.
25. Vallim, M. A.; De Paula, J. C.; Pereira, R. C.; Teixeira, V. L., The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, 33, (1), 1-16.

26. De Paula, J.; Bueno, L.; Paixão Frugulhetti, I.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Teixeira, V., *Dictyota dolabellana* sp. nov. (Dictyotaceae, Phaeophyceae) based on morphological and chemical data. *Botanica Marina* **2007**, 50, (5/6), 288-293.
27. Álvarez, L. R.; Pardo, P. C. M.; Trespacios, R. A. A., Evaluación y utilización potencial de las macroalgas marinas del Caribe y el Pacífico de Colombia: estado actual de su conocimiento. *Biosalud* **2007**, 6, 113-129.
28. Diaz, G.; Diaz, M. C., Diversity of benthic marine algae of the Colombia Atlantic *Biota colombiana* **2003**, 4, (2), 203-246.
29. Arango, E.; Mora, J.; Quijano, J. Aislamiento y caracterización del polisacárido soluble en dos especies de algas. Tesis de maestría Universidad Nacional, 1987.
30. Ortiz, J.; García, V. Contribución al estudio de polisacáridos de una especie de algas marinas pertenecientes al litoral Atlántico Colombiano. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1971.
31. Cortes, A. Determinación de la calidad del agar obtenido de las rodófitas recolectadas en la región nordeste de la costa Caribe colombiana. Tesis de Maestría, Universidad de los Andes, 1995.
32. Rozo, T. G.; Rozo, T. C. D.; Escobar, H.; Gonzalez, T. L., Adición de hidrogeles al suelo para germinación y cultivo de *Lactuca sativa* variedad Green Forest. In *Resultados de Investigación* Universidad Jorge Tadeo Lozano: Colombia, 2009; Vol. 2, pp 3-21.
33. Martínez, A. M.; Arias, L. A.; Rueda, J. L. M.; R., D. M. C.; G., B.-M., Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de algunas macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae* **2009**, 9, (2), 49-55.
34. Lenis, L.; Benitez, R.; Peña, E.; Chito, M., Extracción separación y elucidación de dos metabolitos secundarios del alga *Brosthychia calliptera*. *Scientia et technica* **2007**, 33, 97-102.
35. Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C., Cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *Journal of Natural Products* **2009**, 72, (9), 1595-602.
36. Chaves-Fonnegra, A.; Castellanos, L.; Zea, S.; Duque, C.; Rodriguez, J.; Jimenez, C., Clionapyrrolidine A—a metabolite from the encrusting and excavating sponge *Cliona tenuis* that kills coral tissue upon contact. *Journal of chemical ecology* **2008**, 34, (12), 1565-74.
37. Barbosa, J. P.; Pereira, R. C.; Abrantes, J. L.; Cirne dos Santos, C. C.; Rebello, M. A.; Frugulhetti, I. C.; Teixeira, V. L., In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota paffii*. *Planta medica* **2004**, 70, (9), 856-60.
38. Pereira, H. S.; Leão-Ferreira, L. R.; Moussatché, N.; Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; Costa, L. J.; Diaz, R.; Frugulhetti, I. C. P. P., Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* **2004**, 64, (1), 69-76.
39. World-HealthOrganization-WHO Informe sobre la respuesta mundial al VIH/SIDA <http://www.who.int/hiv/es/> (Mayo 23 de 2013),
40. United-Nations-AIDS La epidemia mundial de SIDA- ONUSIDA [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/factsheet/2009/20091124\\_fs\\_global\\_es.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/factsheet/2009/20091124_fs_global_es.pdf) (Febrero 20 de 2013),
41. Snyder, S.; D'Argenio, D. Z.; Weislow, O.; Bilello, J. A.; Drusano, G. L., The Triple Combination Indinavir-Zidovudine-Lamivudine Is Highly Synergistic. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2000**, 44, (4), 1051-1058.
42. Rodríguez, M. A.; Jarrin, I.; del Amo, J.; Iribarren, J. A.; Moreno, S.; Viciano, P. P., A.; Sirvent, J. L.; Vidal, F.; Lacruz, J.; Gutierrez, F.; Oteo, J. A.; Asencio, R.; Castilla, J.; Hoyos, S. P., Delay

- in the Initiation of HAART, Poorer Virological Response, and Higher Mortality among HIV-Infected Injecting Drug Users in Spain. *AIDS Research and Human Retroviruses* **2006**, *22*, (8), 715-723.
43. Zhang, Z.; Walker, M.; Xu, W.; Shim, J. H.; Girardet, J.-L.; Hamatake, R. K.; Hong, Z., Novel Nonnucleoside Inhibitors That Select Nucleoside Inhibitor Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2006**, *50*, (8), 2772-2781.
  44. Zhou, X.; Liu, J.; Yang, B.; Lin, X.; Yang, X. W.; Liu, Y., Marine natural products with anti-HIV activities in the last decade. *Current medicinal chemistry* **2013**, *20*, (7), 953-73.
  45. Kartikeyan, S. R. N.; Bharmal, R. P.; Tiwari, *HIV and AIDS: Basic Elements and Priorities*. Springer: Bisen, 2007; p 41-48.
  46. Ou, C. Y.; Ciesielski, C. A.; Myers, G.; Bandea, C. I.; Luo, C. C.; Korber, B. T.; Mullins, J. I.; Schochetman, G.; Berkelman, R. L.; Economou, A. N.; et al., Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* **1992**, *256*, (5060), 1165-71.
  47. Osmanov, S.; Pattou, C.; Walker, N.; Schwarzländer, B.; Esparza, J.; Isolation, t. W.-U. N. f. H.; Characterization, Estimated Global Distribution and Regional Spread of HIV-1 Genetic Subtypes in the Year 2000. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2002**, *29*, (2), 184-190.
  48. Privatdegarilhe, M.; De Rudder, J., Effect of 2 arabinose nucleosides on the multiplication of herpes virus and vaccine in cell culture. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* **1964**, *259*, 2725-2728.
  49. Baccarani, M.; Santucci, A. M.; Tura, S.; Killmann, S. A., Arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukaemia: evidence for high cytokinetic sensitivity of myeloblasts. *Scandinavian journal of haematology* **1976**, *16*, (5), 335-52.
  50. Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M., Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl)thymine<sub>1,2</sub>. *The Journal of Organic Chemistry* **1964**, *29*, (7), 2076-2078.
  51. Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J., Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, *74*, (12), 5716-20.
  52. Muller, W. E.; Maidhof, A.; Zahn, R. K.; Schroder, H. C.; Gasic, M. J.; Heidemann, D.; Bernd, A.; Kurelec, B.; Eich, E.; Seibert, G., Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogues in vitro and in vivo. *Cancer research* **1985**, *45*, (10), 4822-6.
  53. Boyd, M. R.; Gustafson, K. R.; McMahon, J. B.; Shoemaker, R. H.; O'Keefe, B. R.; Mori, T.; Gulakowski, R. J.; Wu, L.; Rivera, M. I.; Laurencot, C. M.; Currens, M. J.; Cardellina, J. H., 2nd; Buckheit, R. W., Jr.; Nara, P. L.; Pannell, L. K.; Sowder, R. C., 2nd; Henderson, L. E., Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1997**, *41*, (7), 1521-30.
  54. Arena, A.; Maugeri, T. L.; Pavone, B.; Iannello, D.; Gugliandolo, C.; Bisignano, G., Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology* **2006**, *6*, (1), 8-13.
  55. Rao, K. V.; Kasanah, N.; Wahyuono, S.; Tekwani, B. L.; Schinazi, R. F.; Hamann, M. T., Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases. *J Nat Prod* **2004**, *67*, (8), 1314-8.
  56. Chill, L.; Rudi, A.; Aknin, M.; Loya, S.; Hizi, A.; Kashman, Y., New sesterterpenes from Madagascan *Lendenfeldia* sponges. *Tetrahedron* **2004**, *60*, (47), 10619-10626.

57. Qiu, Y.; Wang, X., A New Sesquiterpenoid Hydroquinone from the Marine Sponge *Dysidea arenaria*. *Molecules* **2008**, 13, (6), 1275-1281.
58. Talpir, R.; Rudi, A.; Kashman, Y.; Loya, Y.; Hizi, A., Three new sesquiterpene hydroquinones from marine origin. *Tetrahedron* **1994**, 50, (14), 4179-4184.
59. Soares, A. R.; Robaina, M. C. S.; Mendes, G. S.; Silva, T. S. L.; Gestinari, L. M. S.; Pamplona, O. S.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Kaiser, C. R.; Romanos, M. T. V., Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, 22, 714-723.
60. Tringali, C., *Modern Methods of Plant Analysis, New Series*. Springer-Verlag: Berlín, 1991; Vol. 12, p 253-254.
61. Cirne-Santos, C. C.; Teixeira, V. L.; Castello-Branco, L. R.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota paffii*. *Planta medica* **2006**, 72, (4), 295-9.
62. In the news. *Nature Reviews Microbiology* **2007**, 5, (3), 172-173.
63. Singh, I. P.; Bodiwala, H. S., Recent advances in anti-HIV natural products. *Nat Prod Rep* **2010**, 27, (12), 1781-800.
64. Pardo, A. Estudio quimiotaxonómico de algas de la tribu Dictyoteae recolectadas en la bahía de Santa Marta. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011.

## 2. ESTUDIO METABOLÓMICO DE ALGAS DE LA TRIBU DICTYOTEAEE RECOLECTADAS EN EL CARIBE COLOMBIANO Y EN LAS COSTAS BRASILEÑAS.

### RESUMEN

Se analizaron mediante CG-EM los extractos en acetato de etilo de 37 especímenes de algas de la tribu Dictyoteae, recolectados en Santa Marta (Magdalena, Colombia) y en las costas Brasileñas en los estados Río de Janeiro y Río Grande do Norte. De estos extractos, se identificaron veinte compuestos (**1-20**) tipo ácidos grasos y éster metílico (**1-3**); dolastano y secodolastano (**4-13**); guayano prenilado (**14-16**); esterol (**17**) y dolabellano (**18-20**). Los perfiles cromatográficos permitieron agrupar los 37 especímenes en cinco clados diferentes de acuerdo al contenido de diterpenos (**A-E**). En el primer clado (**A**) no se identificaron diterpenos como compuestos abundantes. En los clados **B** y **C** se identificaron diterpenos de tipo guayano prenilado como compuestos principales. En el clado **D** se encontraron diterpenos de tipo dolastanos y secodolastanos. Para el último clado (**E**) se identificaron diterpenos tipo dolabellano. El perfil químico y el análisis morfológico sugiere que los especímenes del clado **D** pertenecen a la especie *Canistrocarpus cervicornis*, mientras que el espécimen del clado **E** pertenece a la especie *Dictyota paffii*. Adicionalmente, se pudo establecer que el diterpeno mayoritario (**5**) de *C. cervicornis* recolectada en Colombia es diferente al diterpeno mayoritario de los especímenes recolectados en el Brasil, por lo que estos diterpenos también pueden ser considerados como marcadores biogeográficos. Finalmente, se realizó el estudio químico de un alga colombiana del clado **A**, de la cual se aisló el diterpeno **21**, que corresponde a un nuevo guayano prenilado denominado Dictyol K.

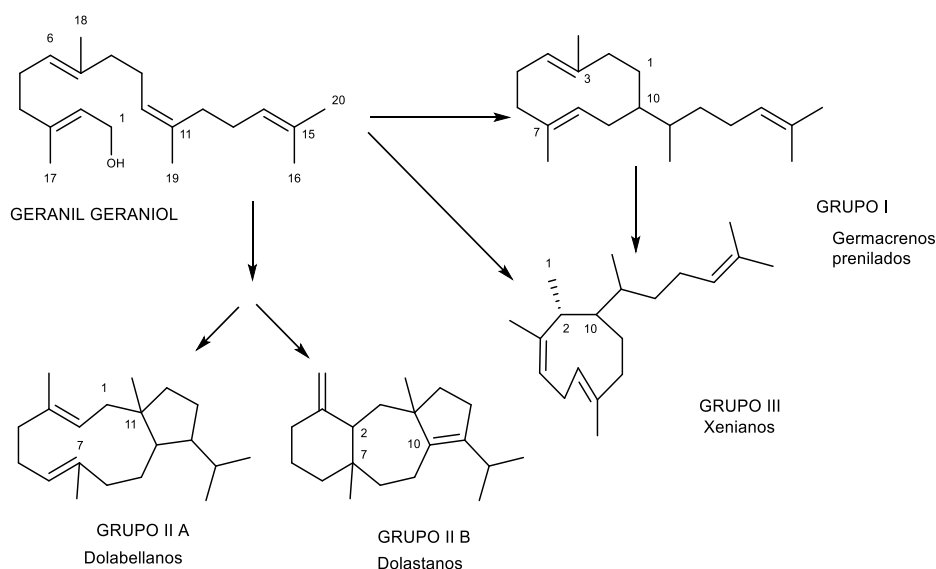
## 2.1. INTRODUCCIÓN

El orden Dictyotales está constituido por macroalgas marinas e incluye 20 géneros ampliamente distribuidos alrededor del mundo.[1] No obstante, su , lo que ha llevado a múltiples cambios en sus taxas durante los últimos años. Este orden se divide en tres familias: Dictyotopsaceae, Scoresbyellaceae y Dictyotaceae.[2] La familia Dictyotaceae a su vez se subdivide en dos tribus: Dictyoteae y Zonarieae. [3] Recientemente, De Clerck y colaboradores, propusieron la división de la tribu Dictyoteae en tres géneros, basados en el análisis de su secuencia de ADN ribosomal 26S y *rbcL*. Estos géneros son: *Dictyota* Lamouroux, *Canistrocarpus* De Paula et De Clerck y *Rugulopteryx* De Clerck et Coppejans.[1] Esta tribu con sus tres géneros es el objeto de trabajo de esta tesis de maestría.

Por otro lado, las algas pertenecientes a la tribu Dictyoteae son reconocidas como una fuente excepcional de terpenos, muchos de ellos con potente actividad citotóxica, antiviral, antibacterial y leishmanicida, por lo que en la actualidad son objeto de múltiples estudios químicos.[4-6] No obstante, es bien conocido que el estudio químico de los organismos requiere de una delimitación clara entre especies, lo cual es particularmente difícil en la tribu Dictyoteae debido a su alta variabilidad morfológica.[2] Para una correcta clasificación se han realizado estudios basados en el análisis de su secuencia de ADN ribosomal 26S y *rbcL*. [1] También, se ha demostrado que los diterpenos presentes en las algas de la tribu Dictyoteae son producto de rutas metabólicas que reflejan características propias de cada especie, por lo que pueden ser considerados como marcadores quimiotaxonómicos, útiles para la delimitación de estas especies.[7]

Los diterpenos mayoritarios encontrados en estas algas pueden ser distribuidos en tres grupos (I-III), dependiendo del lugar donde ocurra la primera ciclación de su precursor biogenético común, el geranil-geraniol (Figura 2.1).





**Figura 2.1** Ruta biogénica propuesta por Teixeira *et al* 1988, grupos de terpenos (I-III) de acuerdo con la primera ciclación de su precursor común el geranil-geraniol.

El grupo I, germacrenos prenilados, está constituido por diterpenos con una primera ciclación del geranilgeraniol entre C-1 y C-10. En el grupo II, se encuentran los diterpenos que resultan de una primera ciclación del geranil-geraniol entre el C-1 y C-11. Este grupo se subdivide en dos subgrupos: el IIA, que incluye los dolabellanos, y IIB, que incluye los dolastanos y secodolastanos (ciclación adicional entre las posiciones C-2 y C-7). Finalmente, los diterpenos del grupo III, que incluye los xenianos y dichotomanos, son el resultado de una ciclación formal entre C-2 y C-10, o de la contracción del anillo del germacreno prenilado. Así, y de acuerdo a lo anterior, los especímenes de la tribu Dictyoteae se pueden agrupar en diferentes taxos no sólo en función de sus características morfológicas sino que también según el tipo de diterpenos que contienen (grupos I a III). Esta estrategia ha permitido delimitar algunas especies (Tabla 2.1),[8] e incluso identificar unas nuevas mediante esta metodología quimiotaxonómica, como es el caso de *Dictyota dolabellana* que contiene una gran cantidad de diterpenos del grupo IIA (dolabellanos), de ahí su nombre (Tabla 2.1).[9]

**Tabla 2.1** Poblaciones de especies de *Dictyota* estudiadas en la región tropical atlántica americana .[8]

Especie (País)	Tipo de diterpenos	Grupos Químicos
<i>D. cervicornis</i> (Brasil)	Dolastanos y secodolastanos	IIB
<i>D. dentatta</i> (Barbados)	Guayanos prenilados	I

<i>D. divaricata</i> (Honduras)	Dolastanos	IIB
<i>D. divaricata</i> (Islas Virgenes)	Dolastanos	IIB
<i>D. linearis</i> (Honduras)	Dolastanos	IIB
<i>D. menstrualis</i> (Brasil)	Guayanos prenilados y Dichotomanos	I y III
<i>D. mertensii</i> (Brasil)	Guayanos prenilados	I
<i>D. pardalis</i> (Brasil)	Dolastanos y secodolastanos	IIB
<i>D. pfaffii</i> (Brasil)	Dolabellano	IIA
<i>D. guineensis</i> (Puerto Rico)	Guayanos prenilados y Xeniano	I y III
<i>D. dolabellana</i> (Brasil)	Dolabellanos	IIA

El estudio de los metabolitos para determinar condiciones biológicas de un organismo se enmarca en un estudio metabolómico. Concretamente, la metabolómica es el estudio del perfil global de metabolitos en un sistema (célula, tejido u organismo), en donde este perfil está asociado a una interacción entre las capacidades de un organismo de producir un compuesto (su genoma) y el ambiente en el que vive.[10] Es decir, se espera que el patrón de respuesta de los metabolitos, tanto conocidos como desconocidos, sea el reflejo de una condición biológica determinada.[11] En este marco, también se han empezado a desarrollar estudios sistemáticos de determinados tipos de metabolitos; generando diferentes clases de estudios metabolómicos como la lipidómica (estudio de los lípidos), proteómica (proteínas) e incluso la terpedómica (terpenos).[10, 12-14]

Es claro que ninguna técnica analítica es capaz de detectar la totalidad de compuestos presentes en la mezcla. Así por ejemplo, la RMN <sup>1</sup>H es capaz de determinar el perfil metabólico de una muestra intacta en poco tiempo y con muy poco tratamiento previo, por lo que se espera refleje la composición metabólica muy fielmente sin fomentar la producción de artefactos; sin embargo, esta técnica está limitada a metabolitos que se encuentren en mediana o alta concentración en la muestra, y no permite identificar compuestos presentes en pequeñas cantidades, o con muy baja solubilidad en el disolvente que se emplea. [10] Por otro lado, la CG-EM es muy sensible, reproducible y permite la comparación de los datos obtenidos con una biblioteca de referencia, siendo muy útil en el análisis de compuestos presentes en bajas concentraciones; no obstante, esta metodología también tiene unas claras limitaciones, ya que sólo los compuestos volátiles pueden ser analizados por esta técnica (o aquellos que puedan ser derivatizados con el fin de hacerlos volátiles), y requiere tratamiento previo para retirar compuestos de baja volatilidad de la muestra antes del análisis, así mismo el proceso de calentamiento en la columna cromatográfica puede llevar a la producción de artefactos.[15] El uso de CLAE-EM también es importante en estos estudios, y permite

el análisis de una gran diversidad de metabolitos aunque su resolución es menor que la de CG, y la información estructural obtenida también es de inferior calidad.[10, 15]

En este contexto, trabajos previos han demostrado que el análisis de los diterpenos con valor quimiotaxonómico presentes en estas algas de la tribu Dictyoteae puede ser llevado a cabo mediante CG-EM,[16, 17] ya que estos diterpenos son volátiles, y esta técnica permite una identificación clara de estos compuestos basado en su tiempo de retención, espectro de masas (patrón de fragmentación)[18], y la comparación de éstos con bases de datos construidas a partir de datos experimentales.

En el presente trabajo, se exploran químicamente por primera vez las algas de la tribu Dictyoteae recolectadas en aguas del mar Caribe colombiano, con el fin de determinar si son fuente de diterpenos útiles para la delimitación quimiotaxonómica y biogeográfica. Y, en caso de encontrar diterpenos de manera abundante, buscarles una posible aplicación biomédica.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies GC7890A acoplado a un espectrómetro de masas MSD-5975C Agilent Technologies con autoinyector, en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70eV. El cromatógrafo fue equipado con una columna HP-5MS (5% PhenylMethylSilox) de 60 m x 250 µm x 0.25 µm. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono fueron registrados en un equipo Varian VNMRS de 500MHz, y en un Bruker Avance de 400MHz usando cloroformo deuterado al 99.5% (Merck).

La cromatografía en columna (CC) se realizó sobre sílica gel tipo 60 (70-230 MESH ASTM, Merck). Los solventes empleados fueron calidad R.A. (Reactivo analítico)

### **2.2.1. Material Vegetal**

Los individuos de la tribu Dictyoteae se recolectaron en El Rodadero, Taganga y Pozos Colorados (Santa Marta, Colombia) en el mes mayo de 2008 mediante buceo a pulmón libre a profundidades entre los 1 y 5 metros. La recolección de estos individuos fue realizada por el biólogo marino Ph. D. Fredy Ortiz del Laboratorio de Produtos Naturais de Algas Marinhas, de la Universidad Federal de Fluminense, Brasil

Una segunda recolección se realizó en el mes de Mayo de 2012 en la bahía de Santa Marta y en playa cristal, mediante buceo a pulmón libre a profundidades entre los 1 y 5

metros. La recolección de estos individuos fue realizada por la bióloga marina Ph. D. Diana Calvacanti, el biólogo marino Ph. D. Fredy Ortiz y el químico Alonso Pardo.

La identificación de todos los especímenes fue realizada por los biólogos Ph. D. Fredy Ortiz, Ph. D. Joel Campos De Paula y Ph. D. Valeria Teixeira de la Universidad Federal del estado de Río de Janeiro, Brasil. Los voucher de los especímenes reposan en INVEMAR (MHNMC 133-160).

Ejemplares del alga *Dictyota pfaffii* fueron recolectados en Atol das Rocas (Brasil) en el mes de abril de 2009 mediante buceo autónomo a una profundidad de 6-9 metros. Éstas fueron identificadas por el biólogo marino Roberto Villaça (UFF). El voucher HRJ 9117 se encuentra depositado en el herbario de la Universidad de Río de Janeiro, Brasil.

Individuos de *Canistrocarpus cervicornis* se recolectaron a lo largo de la costa de Río de Janeiro en diciembre de 2012 en las poblaciones Paraty, Angra dos Reis y Buzios (Ensenado do Forno) por el biólogo Ph. D. Joel Campos De Paula de la Universidad Federal del estado de Río de Janeiro, Brasil. El voucher se encuentra depositado en el herbario de la Universidad de Río de Janeiro, Brasil

Las muestras recolectadas fueron lavadas en campo con el fin de retirar los organismos epífitos, posteriormente se secaron a temperatura ambiente bajo sombra y se conservaron en refrigeración hasta el momento de su extracción.

### **2.2.2. Extracción y limpieza**

El material vegetal seco se limpió minuciosamente retirando los invertebrados pequeños y la arena que pudieran contener. Luego se pesó y se extrajo con acetato de etilo durante 24 horas por 3 veces, secando los extractos a presión reducida sin calentar por encima de los 40°C. Por último, estos extractos crudos fueron pesados y almacenados en refrigeración (Tabla 2.3).

La limpieza de los extractos para su posterior análisis por CG-EM se llevó a cabo de la siguiente manera: cada extracto crudo (100 mg aprox.) fue sometido a CC sobre sílica gel 60 Mesh (2 g), que contenía carbón activado (30 mg) en su superficie, eluyendo en un gradiente discontinuo, con mezclas de hexano:acetato de etilo 1:1 y 0:1. Las fracciones eluidas se reunieron y concentraron a presión reducida para obtener así el extracto limpio, que después fue filtrado por una membrana de 0.22 µm y analizado por CG-EM.

### 2.2.3. Análisis por CGAR-EM

Cada uno de los extractos ya tratados (limpios) fueron inyectados en el CG-EM (1  $\mu$ L de una solución 1 mg/mL en acetato de etilo). La temperatura del inyector fue de 260°C, y la inyección se hizo en modo splitless. Como gas de arrastre se empleó helio grado 5.0, el flujo se fijó a 1 mL/min. Se empleó el siguiente programa de temperatura: T<sub>i</sub>: 40°C durante 1 min, luego se aumentó la temperatura a una velocidad de 60°C/min hasta 100°C, en seguida, se aumentó ésta a 4°C/min hasta 260°C, finalmente se calentó a 10°C/min hasta 290°C, esta temperatura se mantuvo por 15 min. La detección se hizo a 290°C, usando un rango de *m/z* de entre 40 y 800. Adicionalmente, se inyectó en las mismas condiciones cromatográficas una mezcla de parafinas patrón (C<sub>14</sub>-C<sub>26</sub>), con el fin de poder calcular los índices de Kovats (IK) [19], para lo cual se usó el programa AMDIS 32 versión 2.62 que, por medio de una calibración previa con las parafinas, realiza el cálculo de los IK de los compuestos desde el cromatograma mismo.

Los datos fueron procesados mediante el programa MSD ChemStation versión E.01.00.237 y AMDIS 32 versión 2.62.

Los datos de literatura de los espectros de masas y los índices de Kovats fueron obtenidos de la base de datos NIST Mass Spectral Library versión 2.0 de abril 25 de 2005, junto con el programa NIST Mass Spectral Search Program. Así como la base de datos de diterpenos del grupo Produtos Naturais de Algas Marinhas (UFF, Rio de Janeiro, Brasil). No obstante, para establecer la identidad de la mayoría de diterpenos se debió hacer uso de la base de datos construida en este trabajo (ver más adelante).

#### *Espectros de masas de los compuestos identificados en los extractos*

Ester metílico del ácido mirístico (1) 20.75 min (IK 1743): **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 242 (14) [M]<sup>+</sup>, 185 (32), 129 (57), 97 (13), 83 (22), 73 (94), 60 (68), 43 (100).

Ester metílico del ácido palmítico (2) 25.79 min (IK 1907): **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 270 (10) [M]<sup>+</sup>, 227 (12), 199 (5), 171 (7), 143 (18), 97 (7), 87 (70), 74 (100), 55 (21), 43 (25).

Ácido palmítico (3) 26.59 min (IK 1943): **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 256 (24) [M]<sup>+</sup>, 213 (21), 185 (16), 157 (25), 129 (46), 97 (20), 83 (26), 73 (100), 60 (77), 43 (74).

4,9,14-trihidroxi-1,9-dolastadieno (4) 37.40 min (IK 2470): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 302 (13), 284 (30), 277 (20), 266 (13), 259 (78), 241 (100), 223 (37), 199 (39), 183 (30), 171 (29), 157 (25), 149 (40), 133 (43), 123 (60), 105 (52), 91 (65), 79 (42), 55 (42), 43 (73). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.65 (1H, dd  $J=9.5, 4.2$  Hz, H-7), 4.95 (1H, br s, H-15a), 4.82 (1H, br s, H-15b), 3.49 (1H, m, H-4), 1.25 (3H, s, H-20), 1.05 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 0.86 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19), 0.80 (3H, s, H-16)

4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno (5) 37.92 min (IK 2502): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa)  $[\text{M}]^+$  362 (2), 344 (10), 316 (10), 319 (23), 301 (38), 284 (12), 259 (23), 241 (95), 223 (38), 209 (10), 199 (57), 183 (20), 157 (30), 133 (40), 119 (55), 105 (45), 91 (50), 79 (35), 67 (25), 55 (30), 43 (100). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.54 (1H, dd  $J=9.6, 4.8$  Hz, H-7), 4.93 (1H, s, H-15a), 4.85, (1H, m, H-4), 4.82 (1H, s, H-15b), 2.16 (3H, s, H-22), 1.24 (3H, s, H-20), 1.03 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 0.86 (3H, s, H-16), 0.83 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19).

4,14-dihidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (6) 34.18 min (IK 2315): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 302 (14)  $[\text{M}]^+$ , 284 (82), 269 (25), 251 (25), 241 (52), 225 (37), 197 (29), 183 (24), 171 (24), 157 (30), 133 (90), 119 (67), 105 (80), 91 (100), 77 (48), 69 (30), 55 (57), 43 (95). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.58 (1H, m, H-10), 5.45 (1H, dd  $J=9.3, 4.5$  Hz, H-7), 4.91 (1H, s, H-15a), 4.78 (1H, s, H-15b), 3.46 (1H, br s, H-4) 1.34 (3H, s, H-20), 1.09 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.07 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19). 0.81 (3H, s, H-16).

4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (7) 34.56 min (IK 2333): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) , 344  $[\text{M}]^+$  (10), 326 (15), 301 (5), 283 (8), 266 (18), 251 (20), 241 (9) 223 (25), 209 (10), 195 (10), 181 (12), 165 (8), 157 (15), 133 (30), 119 (27), 105 (27), 91 (30), 81 (20), 72 (75), 59 (100), 55 (50), 60 (43). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.60 (1H, m, H-10), 5.35 (1H, dd  $J=9.3, 4.2$  Hz, H-7), 4.91 (1H, s, H-15a), 4.85 (1H, m, H-4), 4.81 (1H, s, H-15b), 2.16 (3H, s, H-22), 1.33 (3H, s, H-20), 1.09 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.06 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19). 0.91 (3H, s, H-16).

4-7-diacetoxi-14-hidroxi-1,9-dolastadieno (8) 37.26 min (IK 2470): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 362 (5), 344 (10), 326 (12), 302 (6), 284 (16), 266 (25), 241 (46), 223 (40), 209 (15), 199 (20), 181 (15), 165 (20), 157 (25), 149 (45), 121 (50), 105 (50), 91 (55), 79 (30), 55 (30), 43 (100). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.88 (1H, dd  $J=10.8, 7.5$  Hz, H-4), 4.91 (1H, s, H-15a), 4.86 (1H, s, H-15b), 4.77 (1H, dd  $J=2.7, 2.4$  Hz, H-7), 2.15 (3H, s, H-22), 2.02 (3H, s, H-24) 1.47 (3H, s, H-20), 0.94 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-16).

2-deoxi-isolinearol (9) 33.10 min (IK 2270): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 284 (12), 268 (18), 253 (20), 221 (32), 203 (15), 173 (19), 161 (100), 133 (30), 125 (53), 105 (50), 91 (47), 71 (43), 55 (40) **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.86 (1H, s, H-15a), 4.69 (1H, s, H-15b), 1.12 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.11 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19), 1.01 (3H, s, H-20), 0.72 (3H, s, H-16).

Isolinearol (10) 37.04 min (IK 2457): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 318 (5), 300 (5), 285 (3), 275 (7), 257 (7), 251 (14), 245 (7), 233 (12), 219 (55), 206 (7), 201 (13), 193 (50), 173 (30), 159 (57), 143 (30), 133 (33), 125 (48), 119 (30), 105 (30), 91 (31), 79 (25), 17 (46), 55 (45), 43 (100). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.97 (1H, s, H-15a), 4.82 (1H, s, H-15b), 3.58 (1H, m, H-4), 1.12 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19), 1.11 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.02 (3H, s, H-20), 0.67 (3H, s, H-16).

4-acetoxi-isolinearol (11) 38.54 min (IK 2534): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 318 (6), 293 (10), 275 (14), 257 (12), 233 (24), 219 (100), 194 (25), 173 (55), 159 (76), 125 (60), 91 (45), 71 (70), 55 (58). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.96 (1H, s, H-15a), 4.82 (1H, s, H-b), 4.85 (1H, m, H-4), 2.18 (3H, s, H-22) 1.12 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.11 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19), 1.02 (3H, s, H-20), 0.78 (3H, s, H-16).

Linearol (12) 38.54 min (IK 2534): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 235 (24), 219 (30), 207 (24), 191 (18), 173 (22), 159 (100), 143 (52), 133 (42), 119 (65), 105 (49), 95 (38), 91 (65), 79 (48), 71 (69), 55 (70). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.13 (1H, s, H-15a), 4.89 (1H, s, H-15b), 3.23 (1H, m, H-2), 1.12 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.11 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19), 1.02 (3H, s, H-20), 0.67 (3H, s, H-16).

4,14-dihidroxi-1(15),8-dolastadieno (13) 33.20 min (IK 2273): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 286 (30), 268 (70), 253 (63), 225 (59), 197 (31), 169 (35), 148 (42), 133 (100), 121 (54), 105 (71), 91 (74), 79 (35), 67 (23), 55 (44).

Pachydictyol A (14) 33.31 min (IK 2281): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 288 (36)  $[\text{M}]^+$ , 270 (12), 255 (27), 227 (7), 188 (26), 173 (18), 159 (100), 145 (33), 119 (86), 107 (74), 91 (52), 69 (93), 55 (63), 41 (94)

Isopachydictyol A (15) 33.30 min (IK 2282): **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 288 (31)  $[\text{M}]^+$ , 270 (12), 255 (25), 203 (25), 175 (15), 159 (82), 105 (54), 91 (70), 69 (97), 55 (73), 41 (100)

Dictyol C: (16) 35.55min (IK 2386): **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 306 (4) [M]<sup>+</sup>, 288 (30), 270 (18), 255 (37), 203 (33), 185 (27), 177 (47), 159 (100), 145 (31), 119 (78), 81 (73), 69 (100), 55 (79), 41 (100).

Fucoesterol (17) 57.07 min (IK 3598): **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 412 (8) [M]<sup>+</sup>, 379 (4), 314 (75), 299 (23), 281 (45), 229 (20), 207 (100), 191 (12), 159 (18), 145 (16), 133 (17), 119 (18), 107 (25), 91 (20), 81 (35), 69 (25), 55 (45), 44 (71).

10,18-Diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (18) 37.31 min (IK 2475) **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 346 (6), 286 (14), 271 (12), 245 (15), 161 (29), 147 (23), 121 (23), 95 (71), 69 (34), 55 (31), 43 (100).

10-Acetoxi-8,18-dihidroxi- 2,6-dolabelladieno (19) 34.06 (IK 2314) **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 349 [M]<sup>+</sup> (1), 271 (11), 161 (25), 147 (34), 121 (28), 95 (100), 69 (32).

8,10,18-trihidroxi- 2,6-dolabelladieno (20) 32.86 min (IK 2257) **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 304 [M]<sup>+</sup> (1), 147 (23), 121 (30), 95 (100), 69 (32), 55 (27).

#### 2.2.4. Metodología de análisis de los extractos de algas.

##### Selección de condiciones cromatográficas:

- a. Variación de la temperatura del inyector: Se determinó la variación de las áreas de los principales picos cromatográficos al variar la temperatura del inyector a 240, 250, 260, 270, 280 y 290°C. Los ensayos fueron realizados inyectando 1 µL de una solución del extracto de EF1 a 0,8 mg/mL, en acetato de etilo, en modo splitless, siguiendo el programa de temperatura citado anteriormente. El experimento fue realizado por triplicado.
- b. Estudio de la repetitividad del proceso de purificación e inyección: La extracción fue realizada por maceración de 500 mg de alga seca (EF1) en 10 mL de acetato de etilo por 48 horas a temperatura ambiente (3 veces). Después de la filtración y evaporación del solvente, cada extracto crudo fue sometido a CC sobre sílica gel 60 Mesh y 10 mg de carbón activado, el cual se ubicó sobre la superficie del cartucho de extracción en fase sólida (SPE), eluyendo con 25 mL de acetato de etilo. Las fracciones eluidas se concentraron a presión reducida para obtener el extracto limpio, que luego fue filtrado por una membrana de 0.22 µm y analizado por CG-EM. El experimento fue realizado por triplicado.



- c. Identificación de los diterpenos: Los brutos de *C. cervicornis* (EF1) y de *D. paffii* (ADR1) se sometieron a una CC sobre sílica gel utilizando un gradiente discontinuo de polaridad (Hexano-DCM-AcOEt) de la cual se obtuvieron aproximadamente 60 fracciones (F1-F60). Cada fracción fue analizada por CCD. Las fracciones menos complejas fueron analizadas por CG-EM y RMN <sup>1</sup>H. A partir de esta metodología se identificaron diterpenos tipo dolastano, secodolastano y dolabellano (**4-13** y **18-20**).

### 2.2.5. Estudio químico de un alga parda colectada en la bahía Santa Marta:

El alga parda *Dictyota* sp código DR'2 (peso seco 250 g) se extrajo con una mezcla de DCM:MeOH 1:1 (diclorometano:metanol) por 24 horas, por 3 veces. El solvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener 12.6 g de extracto bruto el cual fue sometido a una partición H<sub>2</sub>O:DCM 1:1 de la cual se obtuvo una fracción orgánica (3.7 g) y una fracción acuosa (9.0 g). Se llevó a cabo una cromatografía en columna al vacío sobre sílica gel, de la fracción orgánica, empleando un gradiente discontinuo de polaridad (hexano, DCM, AcOEt, MeOH) obteniendo doce fracciones (F1-F12). La F2 (75 mg) fue sometida a una nueva columna sobre sílica gel, eluyendo de manera isocrática con hexano:AcOEt 9:1 para obtener nueve fracciones (F2.1-F2.9). La fracción F2.7 (9 mg), correspondía a una mezcla de grasas y del compuesto **21**, identificado como Dictyol K, nuevo en la naturaleza.

Dictyol K (**21**):. **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 344 (3), 326 (3), 301 (4), 284 (20), 244 (39), 202 (28), 184 (61), 169 (40), 160 (55), 125 (100), 109 (57), 91 (53), 67 (46), 43 (61). **RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ<sub>H</sub> 5.79 (1H, dd *J*= 5.8, 1.7 Hz, H-3), 5.73 (1H, dd *J*= 5.8, 2.0 Hz, H-2), 5.36 (1H, m, H-13), 5.12 (1H, m, H-14), 4.93 (1H, br s, H-18a), 4.79 (1H, br s, H-18b), 4.39 (1H, m, H-9), 4.02 (1H, dd *J*= 8.5, 2.8 Hz, H-6), 2.96 (1H, d *J*= 9.2 Hz, H-1), 2.16 (3H, s, H-22), 1.71 (3H, d *J*= 1.2 Hz, H-16), 1.67 (3H, d *J*= 1.2 Hz, H-20), 1.43 (3H, s, H-17), y 1.08 (3H, d *J*= 7.1 Hz, H-19). **RMN** <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> 135.6 (CH, C-3), 132.7 (CH, C-2), 125.0 (CH, C-14), 105.8 (CH<sub>2</sub>, C-18), 76.0 (CH, C-9), 70.2 (CH, C-13), 69.0 (CH, C-6), 61.1 (CH, C-5), 46.5 (CH, C-1), 39.4 (CH, C-7), 35.0 (CH<sub>2</sub>, C-12), 33.2 (CH, C-11), 27.2 (CH<sub>2</sub>, C-8), 25.7 (CH<sub>3</sub>, C-20), 21.2 (CH<sub>3</sub>, C-22), 19.2 (CH<sub>3</sub>, C-17), 18.8 (CH<sub>3</sub>, C-19), 18.20 (CH<sub>3</sub>, C-16).

### 2.3. Resultados y discusión de resultados

Las algas de la tribu Dictyoteae son una fuente probada de terpenos, con potente actividad citotóxica, antiviral, antibacterial y leishmanicida;[20] sin embargo, de la gran variedad de este tipo de algas presentes en las costas colombianas (tabla 2.2) ninguna ha sido aprovechada y, actualmente se desconoce su composición química y sus posibles aplicaciones farmacológicas e industriales. Así, este estudio químico pionero en el país, contribuyó a la exploración de dichas fuentes tanto en el ámbito farmacológico como en el campo de la delimitación de especies, dado el probado uso de los diterpenos como marcadores taxonómicos para esta tribu.[7]

**Tabla 2.2.** Lista de especies de la tribu Dictyoteae reportadas para la región caribe colombiana.[21]

<b>Especie</b>	<b>Distribución en el mar caribe colombiano</b>
<i>Dictyota bartayresiana</i>	Tayrona, San Andrés y Providencia
<i>Dictyota canaliculata</i>	Tayrona
<i>Dictyota caribaea</i>	San Andrés y Providencia
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Guajira, Tayrona, Magdalena, Morrosquillo, Islas del Rosario, Darién, San Andrés y Providencia
<i>Dictyota ciliolata</i>	Guajira, Tayrona, Magdalena, Morrosquillo
<i>Dictyota crenulata</i>	Guajira, Tayrona, Magdalena, Islas del Rosario
<i>Canistrocarpus crispata</i>	Guajira, Tayrona, Magdalena, Islas del Rosario
<i>Dictyota guajirae</i>	Guajira
<i>Dictyota guineensis</i>	Darién, San Andrés y Providencia
<i>Dictyota hamifera</i>	Tayrona, San Andrés y Providencia
<i>Dictyota humifusa</i>	Tayrona
<i>Dictyota menstrualis</i>	Guajira, Tayrona, Magdalena, Morrosquillo
<i>Dictyota mertensii</i>	Islas del Rosario, Darién, San Andrés y Providencia
<i>Dictyota pfaffii</i>	Islas del Rosario, Darién, San Andrés y Providencia
<i>Dictyota pinnatifida</i>	Guajira, Tayrona,
<i>Dictyota pulchella</i>	Guajira, Tayrona, Magdalena, Islas del Rosario
<i>Dictyota volubilis</i>	Tayrona

Para determinar la presencia de diterpenos en las algas colombianas de la tribu Dictyoteae se decidió analizar los extractos por CG-EM, teniendo en cuenta la gran utilidad de esta técnica para el análisis de los diterpenos de estas algas. [16, 17, 22]

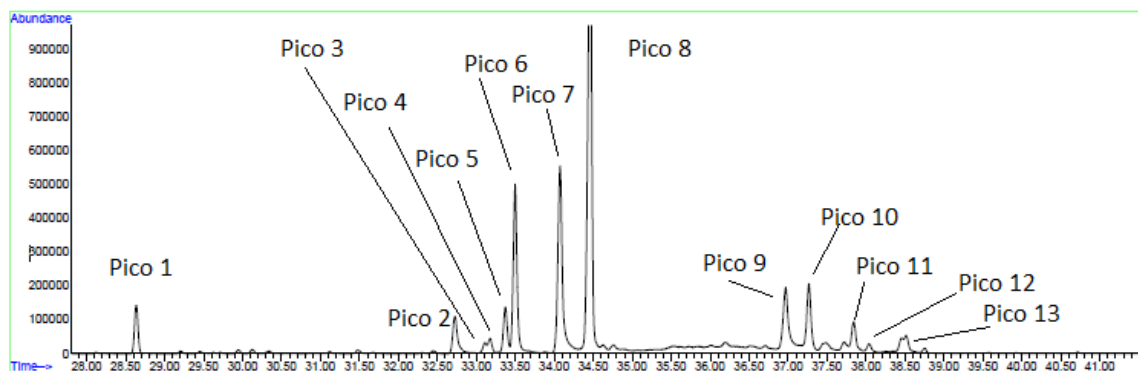
Antes de comenzar la extracción, el material vegetal recolectado debió ser limpiado cuidadosamente, ya que por tratarse de una especie que vive en aguas someras, suele colectarse con otros organismos epífitos, que al momento de la extracción pueden mezclarse con los compuestos propios del alga e interferir en el análisis quimiotaxonómico. La extracción de las algas se realizó utilizando acetato de etilo, con el fin de obtener la mayor cantidad de diterpenos.[17] El proceso de extracción se realizó por triplicado, con el fin de buscar una extracción exhaustiva de los compuestos presentes en el alga. Esto se comprobó al realizar CCD a una cuarta extracción del alga.

Los extractos obtenidos eran de color verde intenso, lo que denotaba la presencia de clorofilas, las cuales debían ser eliminadas antes de llevar a cabo el análisis por CG-EM, ya que estos compuestos pueden acumularse en el *liner* del cromatógrafo y deteriorar así el equipo. Para su remoción, los extractos se pasaron por una columna de sílica gel 60 y carbón activado, de acuerdo a la metodología desarrollada por Calvacanti y colaboradores,[17] los eluidos fueron concentrados y disueltos en acetato de etilo para su inyección en el cromatógrafo.

Se buscó establecer unas condiciones cromatográficas que evitaran la degradación de los diterpenos, con la consecuente formación de artefactos, para esto se varió la temperatura del inyector y se estableció su influencia en el área de los picos.

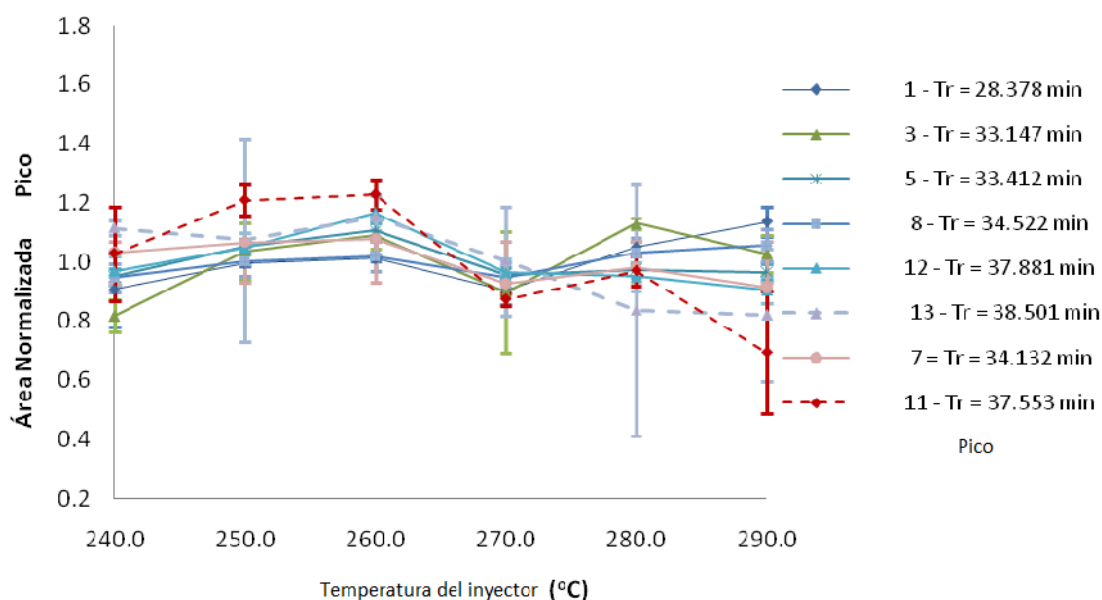
### **Determinación de la estabilidad térmica de los diterpenos**

Para determinar que los diterpenos analizados por CG-EM correspondían a los compuestos presentes en la muestra y no a artefactos generados por el aumento drástico de temperatura en el inyector del equipo, se analizó el extracto bruto del alga EF1, en el cual se detectaron 13 terpenos (Figura 2.2). Se determinó la variación del área normalizada para cada uno de los picos al variar la temperatura del inyector entre 240 y 290°C; cada ensayo se hizo por triplicado.

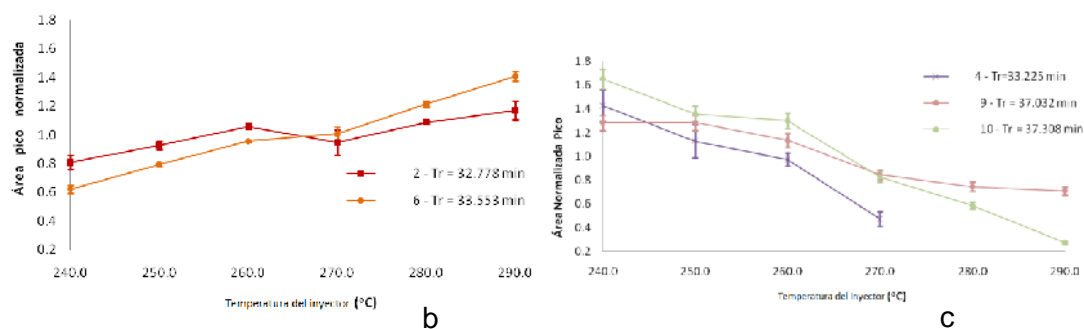


**Figura 2.2** Cromatograma del extracto del alga EF1, donde se destacan los picos con fragmentación típica de diterpeno.

Al evaluar la variación del área de cada pico en función de la temperatura del puerto de inyección, se pudo observar que en general no hay cambio en ésta al aumentar la temperatura (figura 2.3a), lo cual se cumple para ocho de los trece picos; no obstante, algunos de ellos aumentan el área de su pico al aumentar la temperatura (figura 2.3b); mientras otros presentan un comportamiento decreciente (figura 2.3c). Estructuralmente, no se encontró relación entre los picos que aumentan y los que disminuyen, por lo que no se pudo establecer si unos procedían de los otros. Por otro lado, se seleccionó como temperatura de trabajo 260°C porque a esta temperatura se presenta la menor desviación estándar entre los triplicados de las muestras.



a



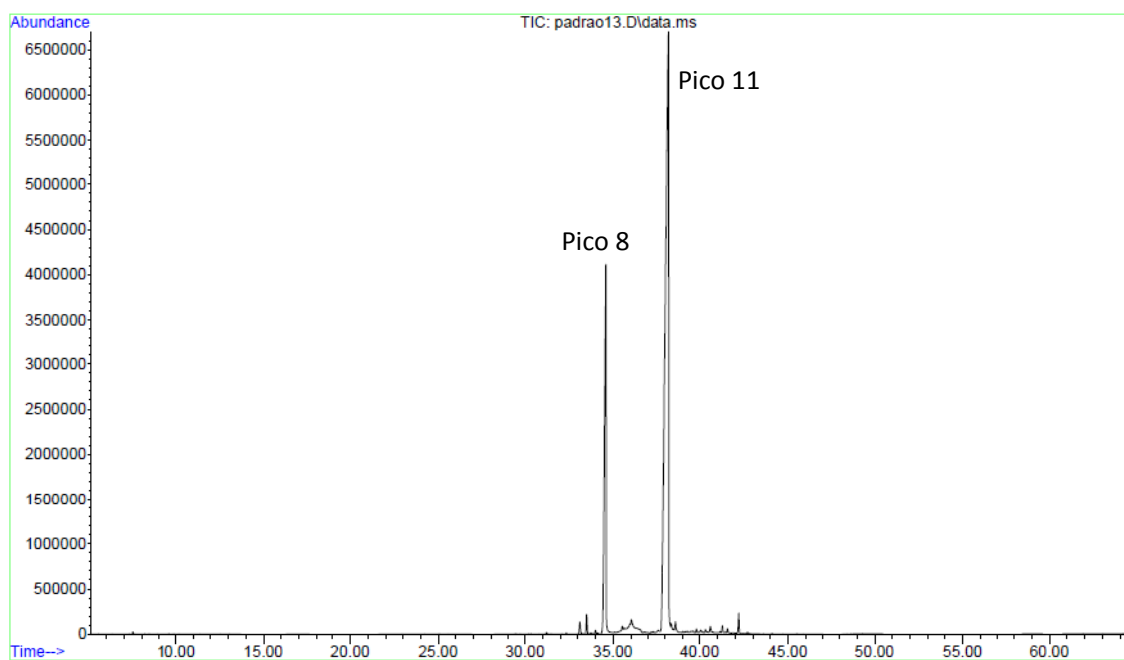
**Figura 2.3** Área de pico normalizada para los 13 picos al variar la temperatura del inyector entre 260 y 290°C, con  $\pm$  se indica la variación estándar a) Picos que no presentan variación significativa b) Picos que aumentan su área al aumentar la temperatura c) Picos que disminuyen su área al aumentar la temperatura.

### Identificación de diterpenos

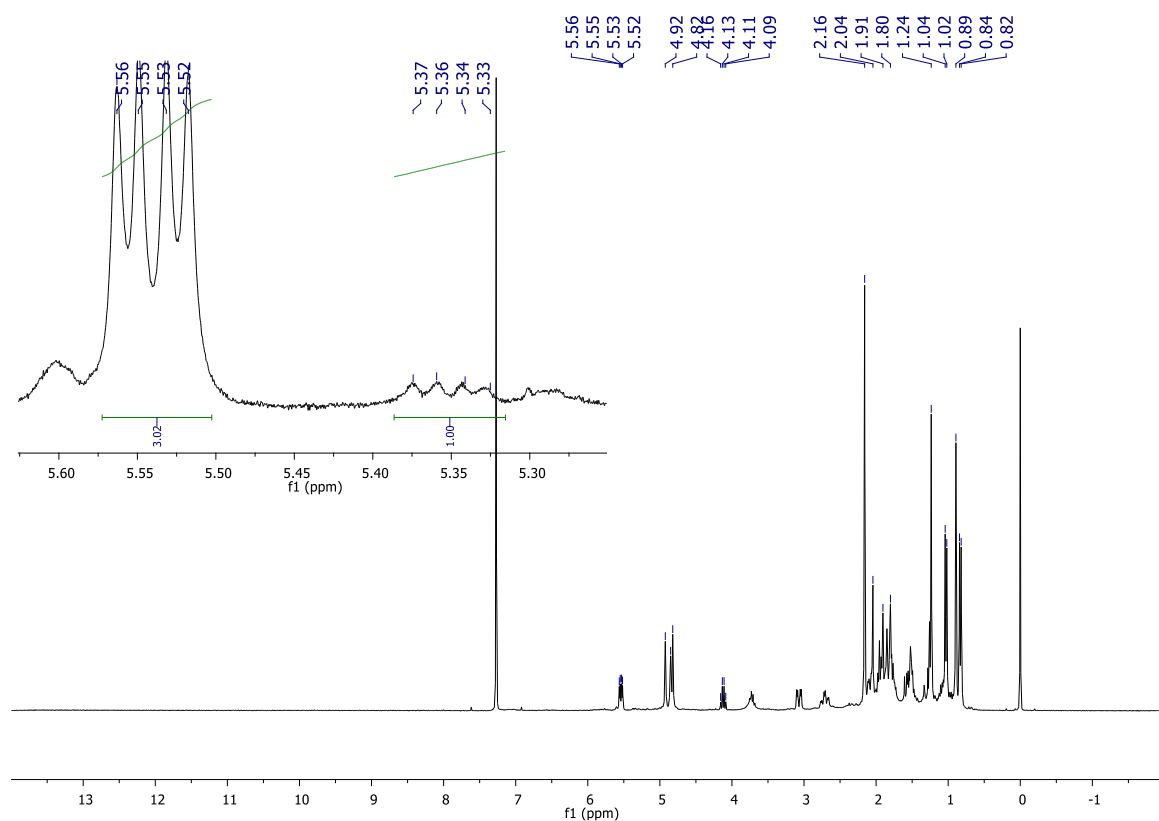
La identificación de los diterpenos se hizo por combinación de dos técnicas: RMN y EM. Para esto, el organismo EF1, correspondiente a *Canistrocarpus cervicornis* que mostró poseer 13 señales de diterpenos (figura 2.2), fue fraccionado por CC sobre sílica gel obteniendo aproximadamente 60 fracciones, cada una de ellas fue analizada por CCD, y las que mostraron ser menos complejas se analizaron por CG-EM y paralelamente RMN  $^1\text{H}$ , con el fin de establecer los tiempos de retención de cada uno de los compuestos así como su identidad mediante el estudio de sus espectros, como se ilustra a continuación:

La fracción F13, eluída con DCM:AcOEt 9:1, mostró ser la mezcla de dos componentes (picos 8 y 11) de acuerdo a su cromatograma de CG-EM (figura 2.4). Los espectros de masas son característicos de diterpenos tipo dolastano. El análisis de los desplazamientos de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción F13 (figura 2.5) permitió determinar que el diterpeno mayoritario tenía señales de protones en  $\delta_{\text{H}}$  5.54 (1H, dd  $J=9.6, 4.8$  Hz, H-7), 4.93 (1H, s, H-15a) y 4.82 (1H, s, H-15b), pertenecientes a dos insaturaciones en la molécula una de ellas exocíclica; además de un protón carbinólico en  $\delta_{\text{H}}$  4.85, (1H, m, H-4), y 5 señales de metilo en 2.16 (3H, s, H-22), 1.24 (3H, s, H-20), 1.03 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 0.86 (3H, s, H-16) y 0.83 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-19), siendo la primera característica de un grupo acetato. Todas estas señales son típicas de un biciclo tipo dolastano. Mediante comparación con bases de datos de resonancia se confirmó que se trata del 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno (**5**), aislado anteriormente del alga *Canistrocarpus cervicornis* (sinónimo de *D. cervicornis*).[23] Los datos de EM también son congruentes con los reportados para este compuesto.[16] El análisis del compuesto

minoritario se realizó de manera similar encontrando 5 señales para doble enlace en  $\delta_H$  5.60 (1H, m, H-10), 5.35 (1H, dd  $J=9.3, 4.2$  Hz, H-7), 4.91 (1H, s, H-15a) y 4.81 (1H, s, H-15b) correspondientes a 3 insaturaciones, siendo una de ellas exocíclica; además de una señal para protón carbinólico en  $\delta_H$  4.85 (1H, m, H-4) y señales para 5 metilos en 2.16 (3H, s, H-22), 1.33 (3H, s, H-20), 1.09 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-18), 1.06 (3H, d,  $J=6.9$  Hz, H-19) y 0.91 (3H, s, H-16), siendo el primero grupo acetato. La comparación del patrón de fragmentación y las señales de RMN  $^1H$  con compuestos reportados en la literatura, permitieron confirmar que el compuesto minoritario es el 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (**7**).



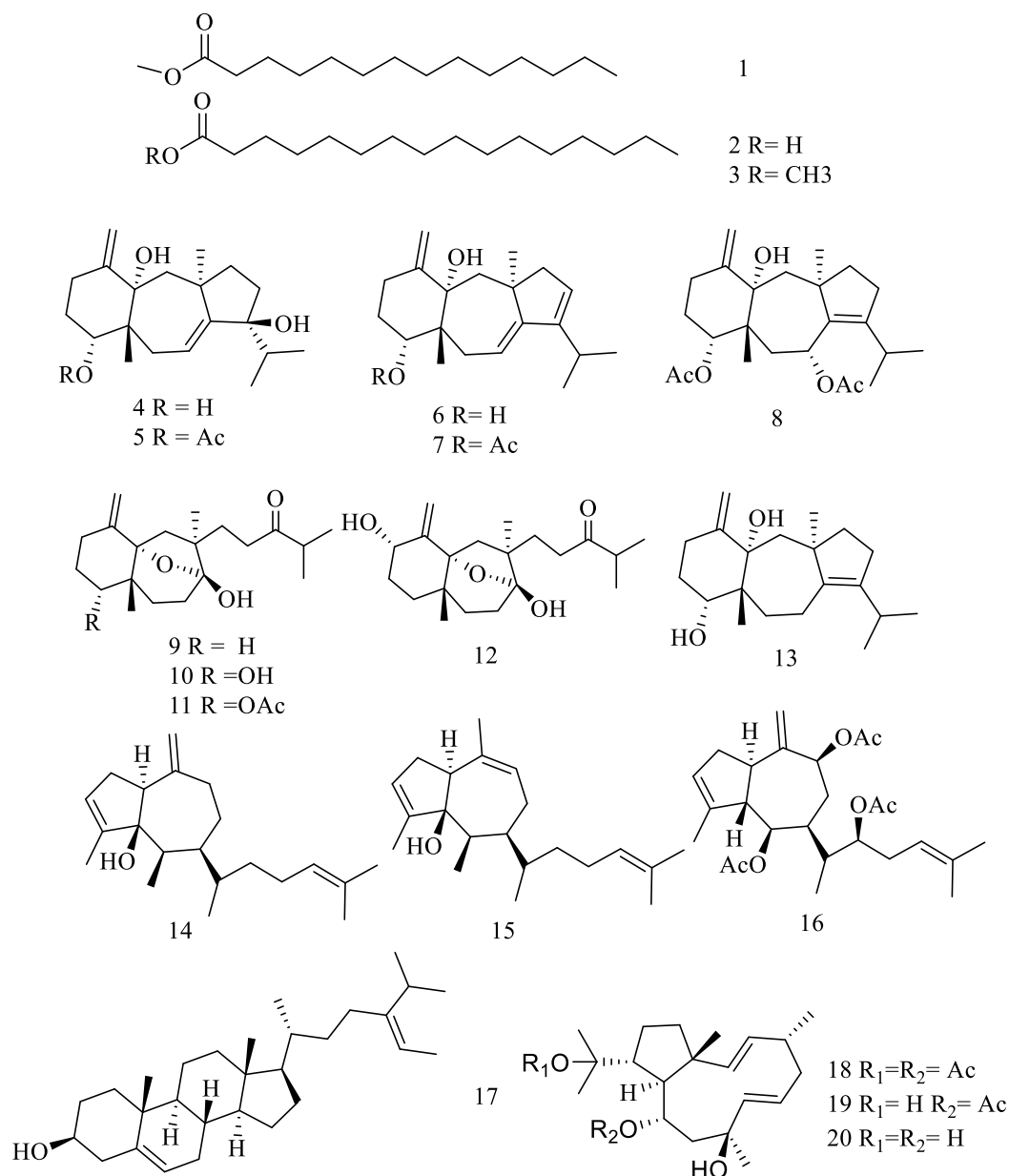
**Figura 2.4** Cromatograma de la fracción F13 del individuo EF1 constituida por 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno (**5**) y 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (**7**).



**Figura 2.5** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la fracción F13 de del individuo EF1 constituida por los diterpenos 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno (**5**) y y 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (**7**).

La relación de intensidades de las señales de RMN  $^1\text{H}$  para los 2 compuestos presentes en la mezcla es de 1:3. Al comparar la relación de áreas en el cromatograma (figura 2.4) se reveló que la abundancia relativa de los compuestos es 1:3.2 lo que confirma que el calentamiento de en el inyector del CG no es el responsable de producir artefactos. Este procedimiento se repitió con otras fracciones de la columna y se logró identificar los compuestos **4-13** diterpenos tipo dolastano y secodolastano. Un trabajo similar se llevó a cabo con el espécimen ADR1, correspondiente al alga *Dictyota paffii*, a partir del cual se identificaron por RMN y EM los dolabellanos **18-20**. Con esta información se inició la construcción de la base de datos [diterpenos.msl](#), la cual permitió analizar los extractos de los otros especímenes e incluye los espectros de masas e índices de Kovats.

Posteriormente, los extractos de los 37 especímenes fueron analizados por CG-EM. La identificación de los compuestos mayoritarios se llevó a cabo mediante el estudio concienzudo de los espectros de masas, y la comparación de éstos y del IK con nuestra base de datos. Los compuestos identificados se muestran en la figura 2.6.



**Figura 2.6.** Compuestos identificados por CG-EM en las algas trabajadas: **1-3** Ácidos grasos, **4-13** diterpenos tipo dolastano y secodolastano (grupo IIB), **14-16** diterpenos tipo guayano prenilado (grupo I), fucosterol (**17**) y **18-20** diterpenos tipo dolabellano (grupo IIA).

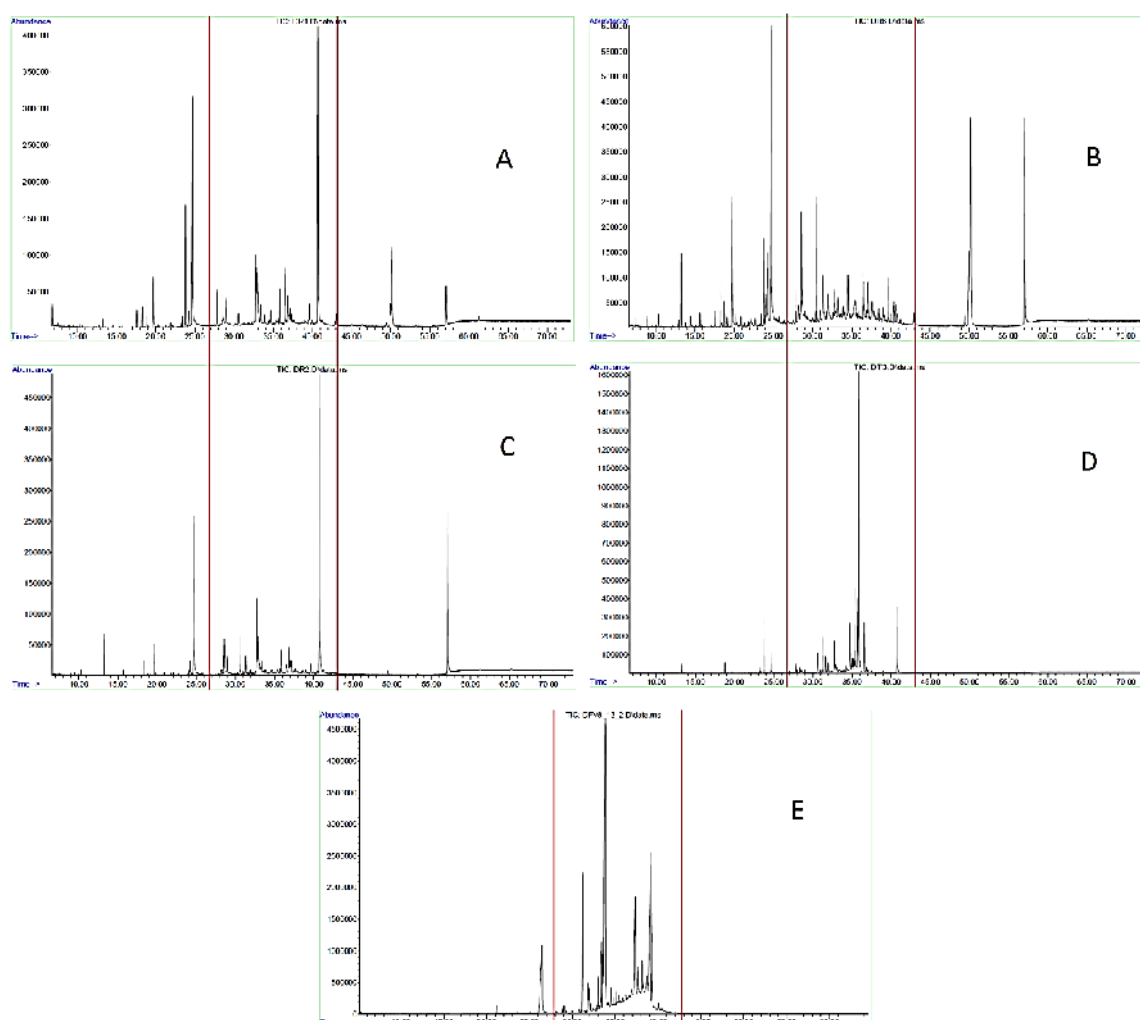
### Agrupación quimiotaxonómica de las algas de la tribu Dictyoteae de acuerdo a su perfil cromatográfico

Para la clasificación de las muestras se tuvieron en cuenta tres zonas del cromatograma: En la primera zona (de 0 hasta 2000 IK) eluyen compuestos de baja polaridad, entre los picos mayoritarios se destacan los ácidos grasos, como el ácido mirístico (**1**) y ácido palmítico (**2**), al igual que sus ésteres metílicos. En la segunda



región, comprendida entre 2000 y 2750 IK, eluyen los diterpenos útiles para la delimitación taxonómica de estas algas, y es donde se observa la mayor variación entre los diferentes especímenes. En la tercera zona (IK mayores a 2750) se observa la presencia de esteroides, (figura 2.6) y otros compuestos de alta polaridad. [16, 17]

Así, con los cromatogramas de cada uno de los especímenes (Anexo 2.1) y teniendo en cuenta la proporción de los compuestos mayoritarios en cada una de las tres zonas cromatográficas antes definidas, se identificaron cinco clados (A-E). Las proporciones fueron establecidas de acuerdo al área de cada pico, que a su vez fue obtenida mediante la integración en el programa AMDIS 32 versión 2.62. En la figura 2.7 se ilustran los perfiles característicos de cada uno de los cinco clados.



**Figura 2.7** Perfiles cromatográficos para cada uno de los cinco clados identificados (A-D). a) Cromatograma del espécimen DR1, clado A. b) Cromatograma del espécimen DR6, clado B. c) Cromatograma del espécimen DR2, clado C. d) Cromatograma del espécimen DT3, clado D. e) Cromatograma del espécimen ADR1, clado E

(Adicionalmente se observan líneas verticales que dividen el cromatograma en las 3 zonas de estudio)

Los especímenes del clado **A** (figura 2.7.a) se caracterizan por no tener o tener un solo pico atribuible a diterpenos, mientras los compuestos más abundantes de este grupo corresponden a ácidos grasos monoinsaturados y sus ésteres metílicos, se destacan por su abundancia el éster metílico del ácido mirístico (**1**), ácido palmítico (**2**) y el éster metílico del ácido palmítico (**3**). Los especímenes del clado **B** (figura 2.7.b) se caracterizan por tener entre cinco y nueve compuestos mayoritarios del tipo diterpeno, que a juzgar por sus patrones de fragmentación e IK corresponden a guyanos prenilados (grupo I - figura 2.1) como el pachydictyol A (**14**), el isopachydictyol A (**15**), y el dictyol C (**16**).[17] Los especímenes de este clado **B** también tienen una presencia de ácidos grasos monoinsaturados importante, aunque inferior a la de los del clado **A**. Los extractos de los especímenes del clado **C** (figura 2.7.c) tiene un perfil similar a los del clado **B**, es decir, una gran presencia de guyanos prenilados y ácidos grasos insaturados, pero a diferencia de **B** se observa la presencia minoritaria de compuestos tipo dolastano. El clado **D** (figura 2.7.d), se caracteriza por la presencia de dolastanos y secodolastanos (**4-13**) en gran proporción, y ácidos grasos monoinsaturados de manera minoritaria. Finalmente, los del clado **E** (figura 2.7.e), se caracterizan por tener ácidos grasos de manera minoritaria y, en cambio, gran abundancia de diterpenos tipo dolabellano (**18-20**) (grupo IIA).

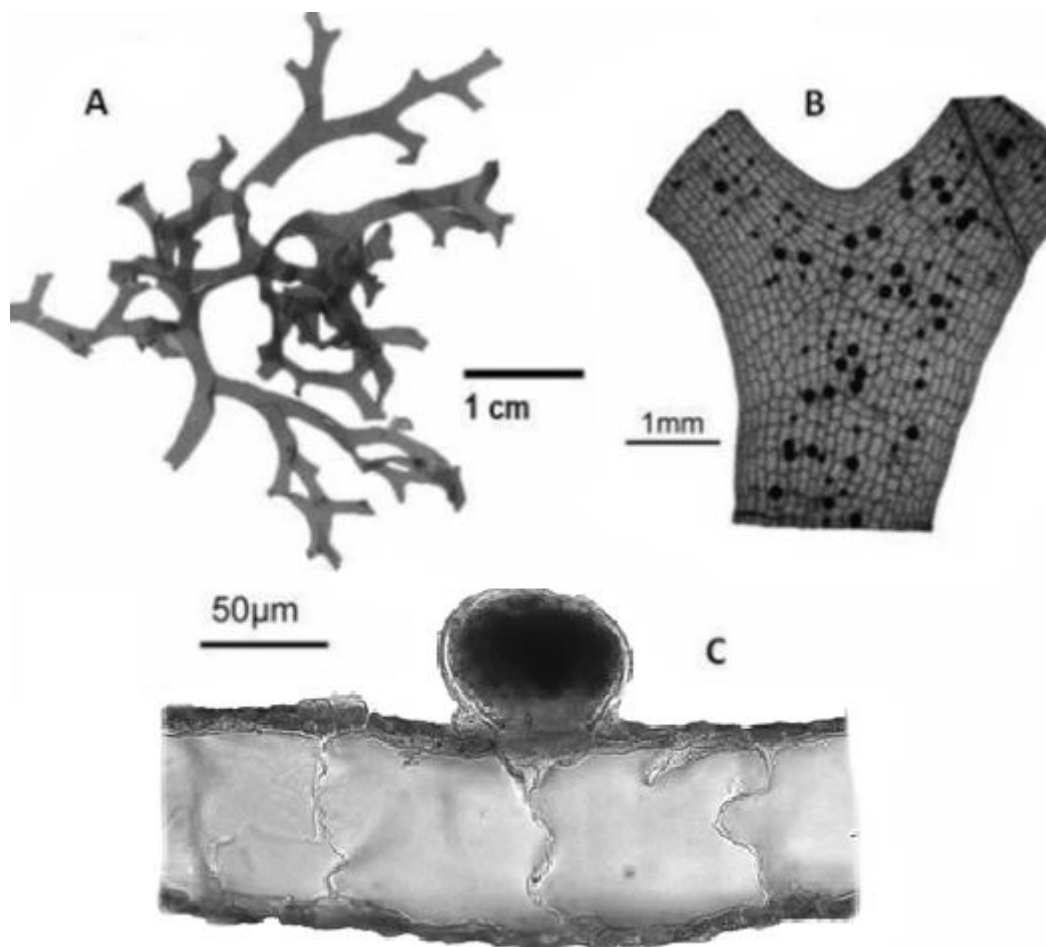
En cuanto al valor quimiotaxonómico de estos clados, pudo establecerse que la información metabólica obtenida para los organismos del clado **A** no fue suficiente para determinar la clasificación taxonómica de estos individuos, el alto contenido de ácidos grasos en algas se ha reportado para mantener la fluidez de la membrana a bajas temperaturas, lo cual es cierto para las aguas frías de Santa Marta, debido a fenómenos de surgencia.[24] Adicionalmente, es destacable que todos los individuos *Dictyota crenulata*, identificados por métodos morfológicos clásicos, pertenecen al clado **A** (tabla 2.3); sin embargo, hubo otros individuos que no se pudieron identificar.

En los especímenes del clado **B** se identificaron ésteres metílicos de ácidos grasos (palmítico **1** y mirístico **2**), y fucosterol (**17**); además de diterpenos del grupo I como el pachydictyol A (**14**), el isopachydictyol (**15**), y el dictyol C (**16**) [17], que tienen valor quimiotaxonómico (figura 2.1). No obstante, en el extracto existen otros componentes minoritarios con fragmentación similar a la de guyanos prenilados, grupo I también, que hasta el momento no han sido identificados adecuadamente y que deben ser

abordados en estudios químicos posteriores. Esta información no fue suficiente para delimitar las especies; sin embargo, diterpenos del grupo I (**14-16**) han sido reportados para las siguientes especies: *D. mertensi*, *D. ciliolata*, *D. crenulata*, y *D. menstrualis*, las cuales ya han sido descritas para la región de Santa Marta.[8] Lo anterior es congruente con la identificación taxonómica por métodos morfológicos para la muestra PC1 *Dictyota menstrualis*; y corresponde a la primera aproximación a un estudio químico para la *Dictyota pulchella* (muestra PC2), la cual también mostró picos con espectros de masas característicos de xeniano (grupo III) sin que se tenga certeza en su identidad, por lo cual esta especie también es una buena candidata para estudios químicos posteriores.

Para el clado **C**, se detectaron guayanos prenilados del grupo I,[17] como el pachydictyol A (**14**), el isopachydictyol (**15**); y en menores cantidades diterpenos del grupo IIB como el 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1(15),9-dolastadieno (**5**), y el 4,7-diacetoxi-14-hidroxi-1(15),7-dolastadieno (**8**). Esta información debe ser analizada con reserva, pues nunca antes se había reportado un alga productora de diterpenos de los grupos I y IIB. Por esto, se cree que en realidad las muestras estudiadas son una mezcla de varios individuos de diferentes especies.

En cuanto a los individuos de clado **D** se pudo establecer que contienen terpenos del grupo IIB como: 4,9,14-trihidroxi-1,9-dolastadieno (**4**); 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno (**5**); 4,14-dihidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (**6**); 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (**7**); 4-7diacetoxi-14-hidroxi-1,9-dolastadieno (**8**); 2-deoxi-isolinearol (**9**); isolinearol (**10**); 4-acetoxi-isolinearol (**11**); linearol (**12**); y 4,14-dihidroxi-1(15),8-dolastadieno (**13**). Estos diterpenos son del grupo IIB se han considerado marcadores propios para las especies *Canistrocarpus cervicornis* y *Canistrocarpus crispata*. [7, 16] Para confirmar la identidad de estos individuos, se realizó el análisis morfológico a los individuos del clado **D**. Se encontró que estos presentaban una ramificación cervicornea (figura 2.8a); ápices en forma de cuernos de ciervo; esporangios dispuestos de manera aleatoria sobre la superficie (en la figura 2.8b se observan en color oscuro) y dispuestos sobre una única célula peduncular (figura 2.8c), presentando una corona de células corticales estériles más altas que las demás, esta estructura es llamada canistrocarpo (canasto de fruta). Todas estas características son propias de *Canistrocarpus cervicornis*, [2] lo que indica que los 9 especímenes del clado **D** (DN2, DN5, DT1, DR-1, DT5, DT'1 y DT'3, EF1, RP1 y RA1) corresponden a esta especie, tanto por sus características morfológicas, como por los diterpenos del tipo dolastano y secodolastano (Grupo IIB).[16]



**Figura 2.8** *Canistrocarpus cervicornis* a) Vista general del espécimen DN5- Clado **D** b) Vista superficial de un tallo de alga DN5 con esporangios c) Corte transversal de un esporangio rodeado por una corona de células corticales (Foto: Fredy Ortiz).

El estudio de los diterpenos principales de dos poblaciones de *C. cervicornis* del Brasil (Estado de Bahía y Estado de Río de Janeiro) fue desarrollado por Oliveira y colaboradores.[16] En este trabajo se determinó que esta alga era productora de diterpenos tipo dolastano y secodolastano, siendo el 4-7-diacetoxi-14-hidroxi-1(15),9-dolastadieno (**8**) el compuesto mayoritario para las 2 poblaciones. Mientras los individuos de *C. cervicornis* recolectados en la región de Santa Marta, que también son productores de dolastanos y secodolastanos, presentan como mayoritario al 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1(15),9-dolasta-1,7-dieno (**5**), que se diferencia del anterior por tener un grupo acetato menos y por un patrón de oxigenación diferente (posiciones C-7 vs C-9). Al ser diferentes los compuestos mayoritarios para las poblaciones del Brasil y de Colombia se puede inferir que estos diterpenos de *C. cervicornis* son marcadores biogeográficos.

La presencia de diterpenos tipo dolastano y secodolastano (grupo IIB) ha sido también reportada para algas identificadas como *Dictyota divaricata*, y *D. linearis* del mar caribe [25, 26] y de Japón[27]. Así como para *D. dichotoma* y *D. indica*, recolectadas en Pakistán,[28-30] y *D. furcellata*, recolectada en Australia.[31] De Cleck y de Paula[1] determinaron que basados en los diterpenos del grupo IIB y en el análisis de su secuencia de ADN ribosomal 26S y rbcL las algas *Dictyota Cervicornis* y *D. crispata* debían pertenecer a un nuevo género-*Canistrocarpus*. De acuerdo a lo anterior cualquier alga de ésta tribu con diterpenos del grupo IIB debe pertenecer al género *Canistrocarpus*. Esto sugiere que las algas reportadas en la literatura fueron determinadas erróneamente y deberían ser llamadas *Canistrocarpus sp.*

En los especímenes del clado **E** se identificaron diterpenos tipo dolabellano (Grupo II-A) como el 10,18-diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (**18**), 10-acetoxi-8,18-dihidroxi-2,6-dolabelladieno (**19**) y el 8,10,18-trihidroxi-2,6-dolabelladieno los cuales tienen valor quimiotaxonómico para esta alga. La única alga de la tribu Dictyoteae de la cual se han aislado estos compuestos es *Dictyota pfaffii*. Análisis morfológicos posteriores demostraron que el individuo ADR1 recolectado en Brasil pertenece a esta especie.

Los datos de sitio de recolección, rendimientos de los extractos y agrupación de acuerdo a su perfil cromatográfico, e identificación taxonómica de acuerdo a los métodos morfológicos de los especímenes estudiados tanto de Brasil como Colombia se resumen en la tabla 2.3. Los datos de rendimiento del extracto no se deben usar con fines comparativos puesto que muchas algas son recolectadas con arena, la cual no puede ser retirada por completo, y genera un error al determinar el peso de alga seca a partir del cual se calcula el rendimiento del extracto. Sin embargo, tras realizar el extracto y filtrar es posible retirar esta arena fácilmente por lo cual no se afecta el perfil químico del organismo.

**Tabla 2.3** Lugar de recolección, rendimientos de los extractos y agrupación de acuerdo a su perfil cromatográfico de las especies de algas estudiadas.

Código espécimen	Clasificación taxonómica	Extracto AcOEt (mg)	Rendimiento del extracto(%)	Lugar de recolección	Clado de acuerdo a su perfil cromatográfico
DG1	<i>Dictyota</i> sp	55.0	4.6	Bahía Taganga norte	A
DG2	<i>Dictyota</i> sp	29.3	3.0	Bahía Taganga norte	A
DN2	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	83.9	3.0	Bahía Taganga sur	D
DN3	<i>Dictyota</i> sp	35.1	1.4	Bahía Taganga sur	B
DN4	<i>Dictyota</i> spp	36.5	1.6	Bahía Taganga sur	C
DN5	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	51.4	3.9	Bahía Taganga sur	D
DPC1	<i>Dictyota</i> sp	82.3	2.2	Pozos colorados	A
DPC2	<i>Dictyota</i> sp	201.7	4.8	Pozos colorados	A
DR'1	<i>Dictyota</i> sp	85.8	1.7	Rodadero - Puerto luz	A
DR'2	<i>Dictyota</i> sp	43.9	0.9	Rodadero - Puerto luz	A
DR'3	<i>Dictyota</i> sp	400.6	12.0	Rodadero - Puerto luz	A
DR1	<i>Dictyota</i> sp	35.7	0.7	Rodadero - Puerto luz	A
DR2	<i>Dictyota</i> spp	115.0	2.3	Rodadero - Puerto luz	C
DR3	<i>Dictyota</i> sp	70.8	1.5	Rodadero - Puerto luz	B
DR4	<i>Dictyota</i> spp	240.8	4.8	Rodadero - Puerto luz	C
DR5	<i>Dictyota</i> sp	196.1	3.9	Rodadero - Puerto luz	B
DR6	<i>Dictyota</i> sp	52.7	1.0	Rodadero - Puerto luz	B
DR7	<i>Dictyota</i> sp	125.6	2.4	Rodadero - Puerto luz	B
DR8	<i>Dictyota crenulata</i>	140	3.9	Rodadero - Puerto luz	A
DR9	<i>Dictyota crenulata</i>	280	6.1	Rodadero - Puerto luz	A
DR10	<i>Dictyota crenulata</i>	156	5.3	Rodadero - Puerto luz	A
DT1	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	59.9	1.2	Bahía Taganga norte	D
DT2	<i>Dictyota</i> spp	84.3	3.3	Bahía Taganga norte	C
DT3	<i>Dictyota</i> sp	291.9	5.8	Bahía Taganga norte	A
DT4	<i>Dictyota</i> sp	66.3	1.2	Bahía Taganga norte	B
DT5	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	135.3	2.9	Bahía Taganga norte	D
DT'1	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	181.2	3.2	Bahía Taganga sur	D
DT'2	<i>Dictyota</i> sp.	148.3	3.4	Bahía Taganga sur	B
DT'3	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	440.0	5.6	Bahía Taganga sur	D
PC1	<i>Dictyota menstrualis</i>	144.0	4.5	Playa Cristal	B
PC2	<i>Dictyota pulchella</i>	84.3	5.3	Playa Cristal	B
PC3	<i>Dictyota ciliolata</i>	95.4	3.4	Playa Cristal	A
PC4	<i>Dictyota ciliolata</i>	134.7	4.4	Playa Cristal	A
EF1	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	32.50	6.5	Ensenado do Forno - Brasil	D
RP1	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	32.14	6.4	Paraty-Brasil	D
RA1	<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	29.57	5.8	Angra dos reis-Brasil	D
ADR1	<i>Dictyota pfaffii</i>	3510	5.3	Atol das Rochas-Brasil	E

Es importante resaltar que este trabajo se constituye como el primer estudio químico de *Dictyota pulchella*. Adicionalmente, se puede observar que las muestras pertenecientes al clado **B** (*Dictyota pulchella* PC2, *Dictyota menstrualis* PC1 y *Dictyota sp.* DN3, DR3, DR5, DR6, DR7, DT4, DT'2) tienen una gran cantidad de diterpenos sin identificar por lo cual se deben hacer esfuerzos en este sentido, para esta la caracterización de estos diterpenos minoritarios no identificados se requerirá un trabajo posterior de aislamiento y purificación, con cantidades mayores de material vegetal. Este trabajo permitirá tener más parámetros para una correcta delimitación taxonómica de las algas de esta tribu presentes en los mares colombianos.

Finalmente, compuestos tipos guayano prenilado de clado **B** han sido reportados como citotóxicos [5]. Mientras los dolastanos y secodolastanos del clado **D** y **E** han sido reportados con actividad antiviral, leishmanicida y antiofidica, [4, 32, 33] por lo que los estudios químicos de estas especies deberían estar acompañados de la evaluación de este tipo de actividades.

Estos resultaron fueron utilizados como criterio de selección para un estudio químico tradicional: Se seleccionó un individuo del clado **A**, para determinar si en verdad estas algas son o no productoras de diterpenos; y un individuo del clado **E**, por ser productor de diterpenos tipo dolabellanos los cuales han sido reconocidos como compuestos con potencial antiviral (Capítulo 3).

### **Estudio químico del alga *Dictyota sp.* colectada en la bahía de Santa Marta**

Para iniciar el estudio químico con un alga colombiana se eligió el alga parda *Dictyota sp.* (DR'2) por ser abundante en el Rodadero (Puerto Luz) -Santa Marta. Esta alga pertenece al clado **A** caracterizado por una gran presencia de ácidos grasos y pocos o ningún terpeno; así, y con el ánimo de buscar la posible presencia de terpenos minoritarios en el extracto, se llevó a cabo el estudio químico. El alga que fue recolectada en mayo del 2008 (250 g), fue extraída con DCM:MeOH y posteriormente sometida a una partición líquido-líquido. De la fracción orgánica y tras un fraccionamiento en columna, guiado por CG-EM, se determinó que sólo la fracción F2 (75 mg) contenía señales con patrones de fragmentación típicas de diterpenos. La fracción F2 fue sometida a una nueva columna sobre sílica eluyendo de manera isocrática con Hex:AcOEt 9:1 para obtener nueve fracciones (F2.1-F2.9). El análisis por CG-EM de estas fracciones permitió establecer que en F2.7 (9 mg) hay un terpeno junto

con un triglicérido. Esta fracción fue sometida a una nueva columna sobre sílica gel pero no fue posible recuperar el diterpeno, probablemente por la poca cantidad, por lo que se decidió realizar la elucidación estructural a partir de la mezcla F2.7. (Figuras 2.9 y 2.10)

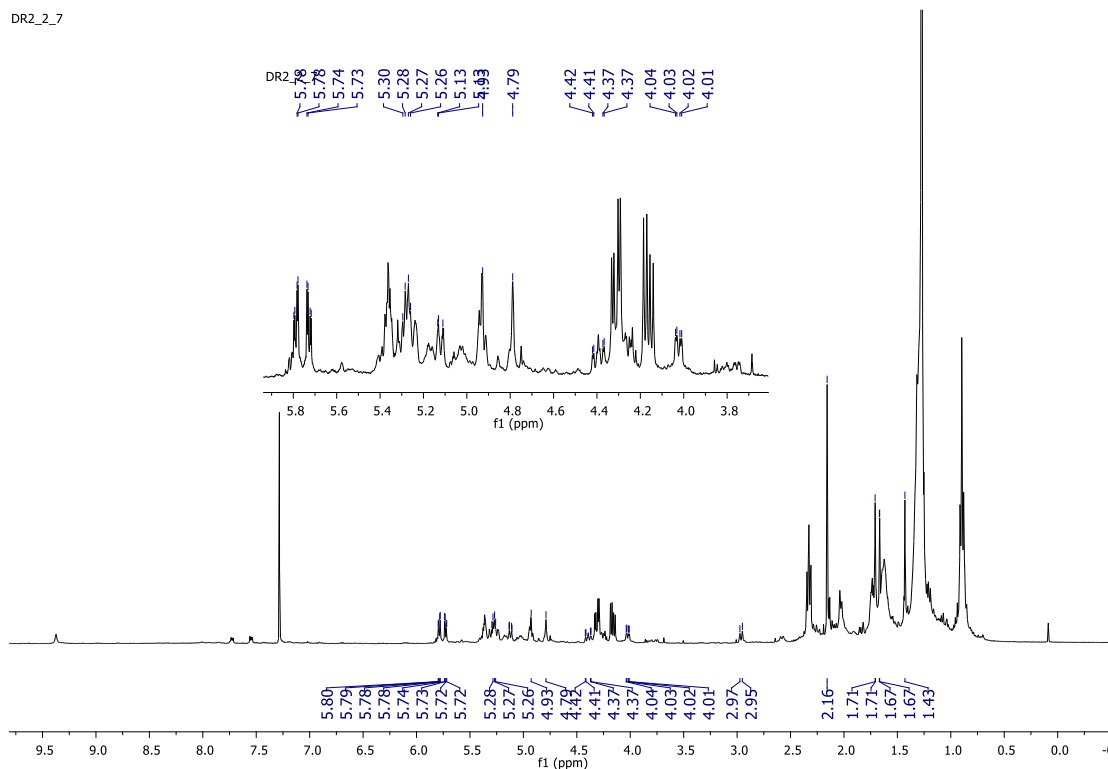


Figura 2.9 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción F2.7

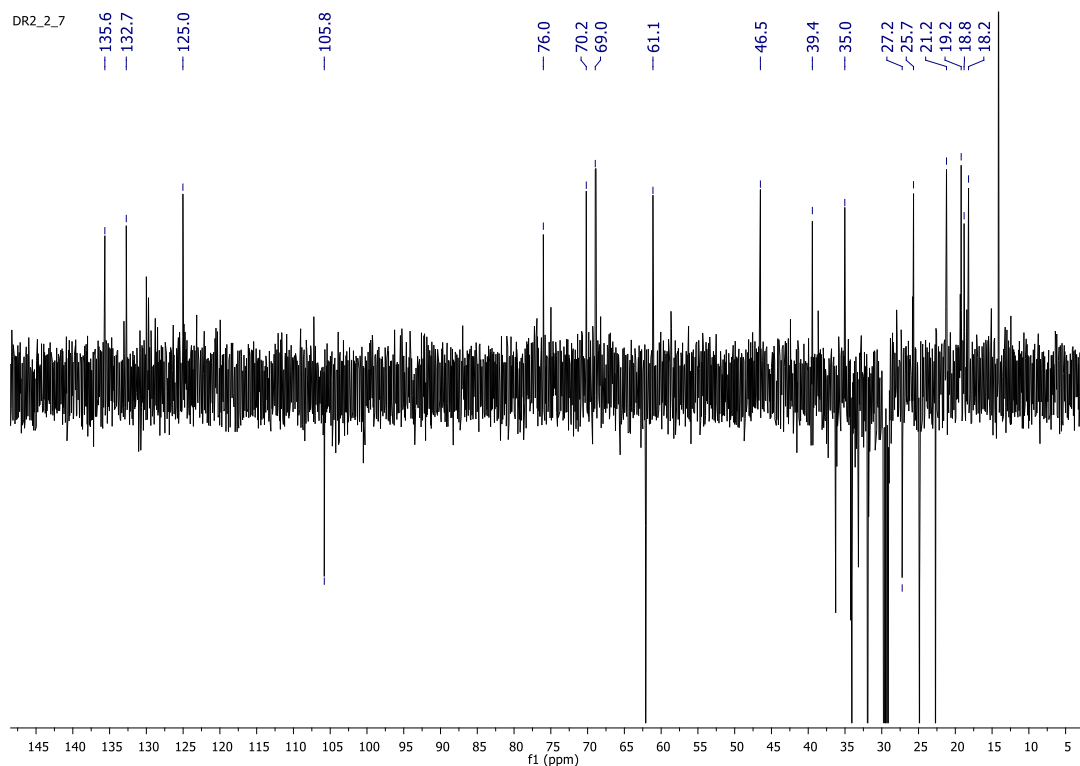


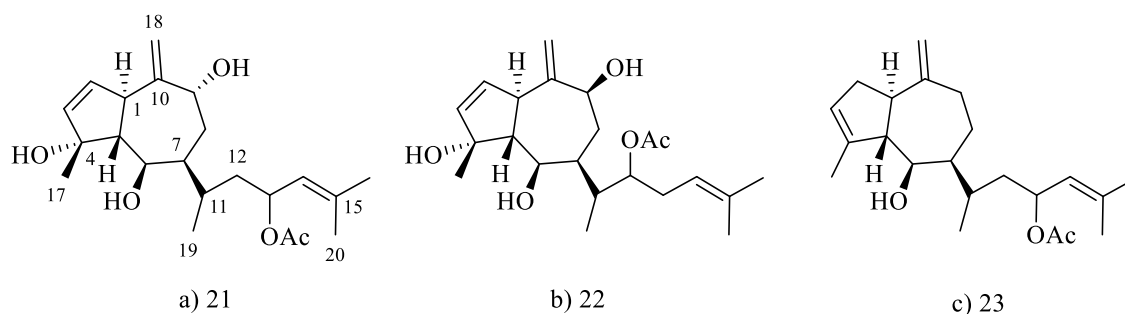
Figura 2.10 Espectro de RMN DEPT135 de la fracción F2.7



El espectro de masas del terpeno de la fracción F2.7 no permitió observar el ion molecular; sin embargo, el patrón de fragmentación corresponde a un guayano prenilado y es similar al encontrado para los compuestos **14-16**. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la fracción F2.7 (figura 2.9) se observa la presencia de señales en  $\delta_{\text{H}}$  1,26 ( $\text{CH}_2$  br s) y 0.89 ( $\text{CH}_3$ , t  $J=6.8$  Hz) correspondientes a las señales características de ácido(s) graso(s); adicionalmente se observan señales en  $\delta_{\text{H}}$  en 4.16 (dd  $J=11.9, 6.0$  Hz), 4.31 (dd  $J=11.9, 4.3$  Hz) y 5.36 (m) todas correspondientes a triglicéridos.[34] Además de las señales anteriores se observan 5 señales de metilo en  $\delta_{\text{H}}$  2.16 (3H, s, H-22), 1.71 (3H, d  $J=1.2$  Hz, H-16), 1.67 (3H, d  $J=1.2$  Hz, H-20), 1.43 (3H, s, H-17), y 1.08 (3H, d  $J=7.1$  Hz, H-19); siendo el primero un grupo metilo de acetato. También se observan cinco señales de protones olefínicos en  $\delta_{\text{H}}$  5.79 (1H, dd,  $J=5.8, 1.7$  Hz, H-3), 5.73 (1H, dd,  $J=5.8, 2.0$  Hz, H-2), 5.12 (1H, m, H-14), 4.93 (1H, br s, H-18a), y 4.79 (1H, br s, H-18b), correspondiendo los dos últimos a los protones de una instauración exocíclica; y los dos primeros para un doble enlace 1,2-disustituido con geometría *cis* a juzgar por el valor de la constante de acoplamiento. Adicionalmente, se observan 3 protones sobre carbono oxigenado en  $\delta_{\text{H}}$  5.28 (1H, m, H-13), 4.39 (1H, m, H-9), y 4.02 (1H, dd,  $J=8.5, 2.8$  Hz, H-6).

En el experimento DEPT-135 (figura 2.10) de F2.7 se observan señales características de un ácido graso en torno de  $\delta_{\text{C}}$  29 ( $\text{CH}_2$ ) y en  $\delta_{\text{C}}$  14.1 ( $\text{CH}_3$ ); además de señales de los carbonos oxigenados del triglicérido en 68.9 (CH) y 62.1 ( $\text{CH}_2$ ).[34, 35] Adicionalmente, se observan señales para el terpeno correspondientes a 5 metilos en  $\delta_{\text{C}}$  25.7 ( $\text{CH}_3$ , C-20), 21.2 ( $\text{CH}_3$ , C-22), 19.2 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 18.8 ( $\text{CH}_3$ , C-19) y 18.20 ( $\text{CH}_3$ , C-16), de estos el segundo corresponde a un grupo acetato; y el primero y el tercero a metilos sobre doble enlace. También se ven señales para 3 metilenos en  $\delta_{\text{C}}$  105.8 ( $\text{CH}_2$ , C-18), 36.3 ( $\text{CH}_2$ , C-12) y 27.2 ( $\text{CH}_2$ , C-8), el primero corresponde a un doble enlace exocíclico. Adicionalmente, se observa la presencia de 10 metinos, 3 de los cuales son de carbono olefínico en  $\delta_{\text{C}}$  135.6 (CH, C-3), 132.7 (CH, C-2) y 125.0 (CH, C-14), y 3 son de carbono oxigenado en  $\delta_{\text{C}}$  76.0 (CH, C-13), 70.2 (CH, C-9) y 69.0 (CH, C-6), los cuatro restantes corresponden a carbonos CH alifáticos en  $\delta_{\text{C}}$  61.1 (CH, C-1), 46.5 (CH, C-5), 39.4 (CH, C-7), y 33.2 (CH, C-11). A partir de la información anterior, se determinó que **21** es un diterpeno con estructura bicíclica tipo guayano prenilado;[36] con tres dobles enlaces, uno de ellos exocíclico, otro *cis*-1,2-disustituido, otro trisustituido; y al menos tres carbonos oxigenados, uno de los cuales se encuentra acetilado. La poca

cantidad que se obtuvo de **21** no permitió realizar experimentos bidimensionales que permitieran elucidar completamente este compuesto, sin embargo con la información obtenida se propone la siguiente estructura (figura 2.11a) por comparación con los datos reportados para compuestos similares como se describe a continuación.



**Figura 2.11** a) Estructura propuesta para el compuesto **21**. b) y c) Compuestos **22** y **23** tipo guayano prenilado aislados del alga *Dictyota volubilis*

Diterpenos del tipo guayano prenilado de estructura similar (**22** y **23**) fueron aislados del alga parda *Dictyota volubilis* (figura 2.11). [36] Una comparación de los desplazamientos de carbono e hidrógeno de la estructura propuesta **21**, con los desplazamientos reportados para **22** y **23** (tabla 2.4) sugiere que el compuesto **21** tiene el mismo patrón de sustitución en el sistema bicíclico perhidroazuleno que **22**, es decir el doble enlace *cis* disustituído está en las posiciones C-2 y C-3, el doble enlace exocíclico está entre C-10 y C-18, los hidroxilos se encuentran en C-6 y C-9, además de un grupo hidroxilo extra en C-5. Sin embargo, se observa una diferencia en el desplazamiento  $\delta_C$  del C-18 y el C-9, lo que sugiere que **21** tiene una estereoquímica en C-9 opuesta a la que se reporta para el compuestos **22**. En lo que se refiere a la cadena prenilada los desplazamientos de carbono e hidrógeno de **21** corresponden con los reportados para el compuesto **23**, indicando que el grupo acetato se encuentra en la posición C-13.

**Tabla 2.4** Desplazamiento de  $\delta_C$  y  $\delta_H$  para los compuestos tipo guayano prenilado **21-23** aislados de algas del género *Dictyota* [36, 37]

#C/#H	Compuesto 21		Compuesto 22		Compuesto 23	
1	46.5	2.96 (d $J=9.2$ Hz)	45.3	3.24(br d $J= 9.1$ Hz)	46.0	ND
2	132.7	5.73 (dd $J=5.8,$ 2.0 Hz)	133.3	5.74 (dd $J=1.9, 5.8$ Hz)	33.8	2.49 (m)
3	135.6	5.79 (dd $J=5.8,$ 1.7 Hz)	135.5	5.80 (dd $J=1.7, 5.8$ Hz)	124.3	5.33 (br s)
4	ND	-	96.8	-	141.3	-
5	61.1	2.15 (m)	59.8	2.15 (t $J=9.0$ Hz)	60.3	2.33 (m)
6	69.0	4.02 (dd $J=8.5.2.8$ Hz, 1H)	70.5	4.10 (dd $J=3.5, 9.0$ Hz)	74.8	3.93 (br d $J=8$ Hz)
7	39.4	ND	36.3	2.20 (ddd $J=3.5, 8.7, 9.0$ Hz)	48.0	ND
8	27.2	1.73 (m), 1.84 (m)	29.8	1.72(dd, $J=5.8, 15.7$ Hz), 1.88 (ddd $J=2.2, 9.0 15.7$ Hz)	23.8	ND
9	76.0	4.39 (dd $J=11.0,$ 8.1) Hz,	73.6	4.44 (dd $J=2.2, 5.8$ Hz)	40.6	ND
10	ND	-	154.0	-	152.4	-
11	33.2	1.71 (m)	37.3	1.92 (m)	31.9	
12	36.3	1.43 (m)	76.5	4.93 (ddd $J=4.1, 6.2, 6.3$ Hz)	40.1	1.93 (rn)
13	70.2	5.36 (dd $J=3.4,$ 2.3 Hz)	27.8	2.29 (dd $J=6.3, 7.4$ Hz)	70.5	5.57 (dt $J=8,4$ Hz)
14	125.0	5.12 (br d $J=8.1$ Hz),	119.5	5.11 (br t $J=7.4$ Hz)	124.1	5.12 (br d $J=8$ Hz)
15	ND	-	134.4	-	136.4	-
16	18.2	ND	17.9	1.63 (br s)	18.4	1.72 (d $J=1.5$ Hz)
17	19.2	ND	19.0	1.40 (s)	15.9	1.82 (d $J= 1$ Hz)
18	105.8	4.93 (1H, br s), 4.79 (1H, br s)	111.5	4.79 (br s), 4.92 (br s)	107.2	4.75 (s), 4.73 (s)
19	18.8	1.08 (m)	12.5	1.04 (d $J=6.8$ Hz)	18.1	1.04 (d $J=7$ Hz)
20	25.7	1.67 (d $J=1.2$ Hz)	25.8	1.69 (br s)	25.7	1.74 (d $J=1.5$ Hz)
21	ND	-	172.4	-	170.6	-
22	21.2	2.16 (3H, s)	21.2	2.06 (s)	21.4	2.02 (3H, s)

ND- Desplazamiento no fue determinado

La búsqueda de la estructura en las bases de datos especializadas: Scifinder y Antimarin, permitió establecer que la estructura propuesta para el compuesto **21** es nueva, y corresponde a un nuevo componente de la serie de los dictyoles, y siguiendo la secuencia hemos denominado **Dictyol K**.

## CONCLUSIONES

Los extractos de los 37 especímenes de algas de la tribu Dictyoteae recolectados en Santa Marta y Brasil fueron analizados por CGAR-EM, identificando como compuestos mayoritarios los ácidos grasos y sus ésteres metílicos (**1-3**), un esteroide (**17**) y diterpenos del tipo dolastano y secodolastano (**4-13**), guayano prenilado (**14-16**), y dolabellano (**18-20**). De acuerdo a la composición de diterpenos presentes en cada individuo es posible clasificar las algas en cinco clados **A-E**.

Los especímenes de los clados **A-C** no pudieron ser identificados mediante análisis quimiotaxonómicos, sin embargo es destacable que todos los individuos clasificados morfológicamente como *Dictyota crenulata* pertenecían al clado **A**. Los especímenes del clado **B** pueden pertenecer a las especies *D. mertensi*, *D. ciliolata*, *D. crenulata*, o *D. menstrualis*. Las muestras del clado **C** tienen diterpenos tipo dolastano y guayano prenilado, esto sugiere que se trata de una mezcla de varios individuos de diferentes especies.

Los individuos del clado **D** fueron identificados taxonómicamente como *C. cervicornis* tanto por su contenido de diterpenos del grupo IIB (tipo dolastano y secodolastano) como por sus características morfológicas, siendo el 4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1(15),9-dolastano-1,7-dieno (**5**) el compuesto mayoritario para las algas recolectadas en Colombia, siendo éste diferente al diterpeno mayoritario reportado para los especímenes recolectados en Brasil. Adicionalmente, este estudio valida el uso de los diterpenos del grupo IIB como marcadores quimiotaxonómicos y biogeográficos, para la especie *C. cervicornis*.

El individuo del clado **E** es productor de diterpenos tipo dolabellanos (grupos IIA), siendo 10,18-Diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (**18**) el compuesto mayoritario. Tanto las características morfológicas como el perfil químico permitieron identificar a este individuo como *Dictyota pfaffii*.

Durante este trabajo se creó una base de datos de diterpenos de algas ([diterpenos.msl](#)) que permite la comparación de los espectros de masas e índices de Kovats directamente sobre el cromatograma.

El estudio químico del alga colombiana DR'2-clado **A**, permitió el aislamiento y la elucidación estructural del compuesto **21**, un diterpeno tipo guayano prenilado de estructura nueva y de nombre **Dictyol K**

Adicionalmente se mediante este estudio se demuestra que las algas del clado **A**, son capaces de producir también diterpenos aunque en menor cantidad relativa comparada con los individuos de otros clados .

## BIBLIOGRAFÍA

1. De Clerck, O.; Leliaert, F.; Verbruggen, H.; Lane, C. E.; De Paula, J. C.; Payo, D. A.; Coppejans, E., A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcL* and 26S ribosomal DNA sequence analyses. *Journal of Phycology* **2006**, 42, (6), 1271-1288.
2. De Clerck, O., *The genus Dictyota in the Indian Ocean*. Opera Botanica Belgica, 2003; Vol. 13, p 205.
3. Hoshina, R.; Kamako, S. i.; Imamura, N., Phylogenetic Position of Endosymbiotic Green Algae in *Paramecium bursaria* Ehrenberg from Japan. *Plant Biology* **2004**, 6, (4), 447-453.
4. Santos, A. O. d.; Britta, E. A.; Bianco, E. M.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V., 4-Acetydolastane Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* as Antileishmanial Agent. *Marine Drugs* **2011**, 9, (11), 2369-2383.
5. Ayyad, S.-E. N.; Makki, M. S.; Al-kayal, N. S.; Basaif, S. A.; El-Foty, K. O.; Asiri, A. M.; Alarif, W. M.; Badria, F. A., Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, (1), 175-182.
6. Cirne-Santos, C. C.; Souza, T. M.; Teixeira, V. L.; Fontes, C. F.; Rebello, M. A.; Castello-Branco, L. R.; Abreu, C. M.; Tanuri, A.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., The dolabellane diterpene Dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. *Antiviral Research* **2008**, 77, (1), 64-71.
7. Teixeira, V. L.; Kelecom, A., A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *Science of The Total Environment* **1988**, 75, (2-3), 271-283.
8. Vallim, M. A.; De Paula, J. C.; Pereira, R. C.; Teixeira, V. L., The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, 33, (1), 1-16.
9. De Paula, J.; Bueno, L.; Paixão Frugulhetti, I.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Teixeira, V., *Dictyota dolabellana* sp. nov. (Dictyotaceae, Phaeophyceae) based on morphological and chemical data. *Botanica Marina* **2007**, 50, (5/6), 288-293.
10. Rochfort, S., Metabolomics Reviewed: A New "Omics" Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. *Journal of Natural Products* **2005**, 68, (12), 1813-1820.
11. Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W. B.; Harrigan, G. G.; Kell, D. B., Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in biotechnology* **2004**, 22, (5), 245-252.
12. Lagarde, M.; Bernoud-Hubac, N.; Calzada, C.; Vericel, E.; Guichardant, M., Lipidomics of essential fatty acids and oxygenated metabolites. *Molecular nutrition & food research* **2013**.
13. Bantscheff, M.; Schirle, M.; Sweetman, G.; Rick, J.; Kuster, B., Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2007**, 389, (4), 1017-31.
14. Christianson, D. W., Unearthing the roots of the terpenome. *Current opinion in chemical biology* **2008**, 12, (2), 141-50.

15. Pasikanti, K. K.; Ho, P. C.; Chan, E. C., Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2008**, 871, (2), 202-11.
16. Oliveira, A. S.; Cavalcanti, D. N.; Bianco, E. M.; De Paula, J. C.; Pereira, R. C.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Teixeira, V. L., Chemical Composition of Diterpenes from the Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). *Natural Products Communications* **2008**, 3, 1469-1472.
17. Calvacanti, D. N.; Rezende, C. M.; Pinto, A. C.; Teixeira, V. L., Diterpenoid constituents from the brown alga *Dictyota Menstrualis* (Dictyotaceae, Phaeophyta). *Natural Products Communications* **2006**, 8, 609-611.
18. Kanani, H.; Chrysanthopoulos, P. K.; Klapa, M. I., Standardizing GC-MS metabolomics. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2008**, 871, (2), 191-201.
19. IUPAC, *The gold Book Nomenclature for chromatography*-. 2nd ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford 1997; p 844.
20. El Gamal, A. A., Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2010**, 18, (1), 1-25.
21. Diaz, G.; Diaz, M. C., Diversity of benthic marine algae of the Colombia Atlantic *Biota colombiana* **2003**, 4, (2), 203-246.
22. De-Paula, J.; Bueno, L.; Cavalcanti, D.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Teixeira, V., Diterpenes from the Brown Alga *Dictyota crenulata*. *Molecules* **2008**, 13, (6), 1253-1262.
23. Kelecom, A.; Teixeira, V. L., Dolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota cervicornis*. *Phytochemistry* **1988**, 27, (9), 2907-2909.
24. Terrados, J.; Lopez-Jimenez, J. A., Fatty acid composition and chilling resistance in the green alga *Caulerpa prolifera* (Forsskal) Lamouroux (Chlorophyta, Caulerpales). *Biochemistry and molecular biology international* **1996**, 39, (5), 863-9.
25. Sun, H. H.; McConnell, O. J.; Fenical, W.; Hirotsu, K.; Clardy, J., Tricyclic diterpenoids of the dolastane ring system from the marine alga *dictyota divaricata*. *Tetrahedron* **1981**, 37, (6), 1237-1242.
26. Crews, P.; Klein, T. E.; Hogue, E. R.; Myers, B. L., Tricyclic diterpenes from the brown marine algae *Dictyota divaricata* and *Dictyota linearis*. *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47, (5), 811-815.
27. Ochi, M.; Miura, I.; Tokoroyama, T., Structure of linearol, a novel ditrepenoid from the brown seaweed *Dictyota linearis*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1981**, 0, (3), 100a-100a.
28. Bano, S.; Parveen, S.; Ahmad, V. U., Marine Natural Products, XIV. Secodolastane Diterpenoids of *Dictyota indica* from the Arabian Sea. *Journal of Natural Products* **1990**, 53, (2), 492-495.
29. Pereira, H. S.; Leão-Ferreira, L. R.; Moussatché, N.; Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; Costa, L. J.; Diaz, R.; Frugulhetti, I. C. P. P., Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* **2004**, 64, (1), 69-76.
30. Ali, M. S.; Pervez, M. K.; Ahmed, F.; Saleem, M., Dichotenol-A, B and C: the C-16 oxidized seco-dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. *Nat Prod Res* **2004**, 18, (6), 543-9.
31. Dunlop, R.; Ghisalberti, E.; Jefferies, P.; Skelton, B.; White, A., Structure of a New Dolastane Diterpene From *Dictyota furcellata*. *Australian Journal of Chemistry* **1989**, 42, (2), 315-319.
32. Moura, L. D.; Sanchez, E. F.; Bianco, E. M.; Pereira, R. C.; Teixeira, V. L.; Fuly, A. L., Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. *Biomed Pharmacother* **2010**.

33. Soares, A. R.; Robaina, M. C. S.; Mendes, G. S.; Silva, T. S. L.; Gestinari, L. M. S.; Pamplona, O. S.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Kaiser, C. R.; Romanos, M. T. V., Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22*, 714-723.
34. Hardwood, H.; Randall, J. The AOCS Lipid Library. <http://lipidlibrary.aocs.org/nmr/1NMRglyc/index.htm>
35. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, (21), 7512-7515.
36. König, G. M.; Wright, A. D.; Sticher, O.; Ruegger, H., Four New Hydroazulenoid Diterpenes from the Tropical Marine Brown Alga *Dictyota volubilis*. *Planta medica* **1993**, *59*, (2), 174-8.
37. Pathirana, C.; Andersen, R. J., Diterpenoids from the brown alga *Dictyotabinghamiae*. *Canadian Journal of Chemistry* **1984**, *62*, (9), 1666-1671.





### 3. DOLABELLANOS MINORITARIOS DEL ALGA PARDA *Dictyota pfaffii* CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

#### RESUMEN

El alga parda *Dictyota pfaffii* había mostrado ser una rica fuente de compuestos tipo dolabellano con potente actividad antiviral frente al virus VIH-1. En este trabajo se retomó el estudio químico del extracto orgánico del alga buscando los dolabellanos minoritarios; así, se identificó la presencia de 4 dolabellanos no antes descritos para esta alga (**20**, **24**, **25** y **26**), 3 de los cuales son nuevos: (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,7*R*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno (**24**), (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,7*S*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno (**25**), y (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,8*E*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-Diacetoxi-7-hidroxi-2,8-dolabelladieno (**26**), además de los dos dolabellanos mayoritarios previamente reportados para esta alga 10,18-diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (**18**) y 10-acetoxi-8,18-dihidroxi-2,6-dolabelladieno (**19**). Los dolabellanos evaluados como antivirales (**24** y **25**) presentaron mayor actividad antiviral que el **20** (evaluado en estudios anteriores), por lo cual estos compuestos resultan promisorios como anti-VIH-1.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) infecta algunas células del sistema inmune, los linfocitos T CD4+, generando un deterioro progresivo del mismo. La pérdida de los linfocitos T CD4+ conduce al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).[1] El VIH/sida es la principal causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en el mundo; según un estudio de la OMS a 2009 dicha enfermedad había cobrado más de 27 millones de vidas, y se calcula que cada año mueren por esta causa 2 millones de personas a nivel mundial, mientras que 2.6 millones de personas se infectan.[1] En la actualidad, se calcula que a nivel mundial hay 33.4 millones de personas infectadas con el VIH, mientras para América latina se cuentan 2 millones de personas infectadas por el virus. La infección se concentra en algunos grupos poblacionales, tales como: homosexuales, población transexual, trabajadoras sexuales y usuarios de drogas ilegales no obstante, la infección está avanzando a otros sectores de la población, inclusive a velocidades mayores que lo que lo hace en las poblaciones tradicionalmente asociadas a la enfermedad.[1, 2]

Esta enfermedad además de su gran impacto social, también demanda un alto gasto anual para el tratamiento de los pacientes. La Organización de Naciones Unidas contra el SIDA "ONUSIDA", estima que a nivel mundial se invirtieron más de US\$25.000 millones para los servicios relacionados con el VIH durante el año 2010.[2] La infección por VIH-1 (Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1) con diagnóstico oportuno, y correcto acceso a tratamiento, usualmente dado con una combinación de 3 o 4 medicamentos antirretrovirales (Terapia Antirretroviral de Gran Actividad, TARGA), reduce las tasas de mortalidad y aumenta expectativa de vida en pacientes infectados con este virus.[3] Sin embargo, el tratamiento actual no erradica el VIH-1 del tejido infectado y la replicación del virus permanece activa,[4] así que el tratamiento sólo controla la enfermedad pero no la cura. Por otro lado, el uso de este tipo de tratamiento se está viendo limitado por el aumento de líneas de HIV-1 resistentes, y en algunos casos, por trastornos metabólicos del paciente.[5]

Por esta razón actualmente se continúa en la búsqueda de nuevos agentes antirretrovirales capaces de inhibir los diferentes estadios de vida del VIH-1; y así avanzar hacia la cura definitiva del SIDA.

Las algas pardas de la tribu Dictyoteae se caracterizan por producir diterpenoides de los tipos guayano, xeinano, dolastano y dolabellano, [6-8] estos últimos con una destacada actividad antiviral. Los dolabellanos 10,18-diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (**18**) y 10-acetoxi-8,18-dihidroxi-2,6-dolabelladieno (**19**) aislados de *Dictyota pfaffii*, recolectada en el Atol das Rocas (Brasil), y el compuesto 8,10,18-trihidroxi-2,6-dolabelladieno (**20**), obtenido por reducción del primero, fueron ensayados frente al Virus del Herpes Simple-1 (VHS-1), inhibiéndolo en un 25%, 20% y 80%, respectivamente.[7, 9] Adicionalmente, este último fue activo frente al virus del VIH-1 y a la transcriptasa reversa de éste; además es capaz de actuar durante la morfogénesis del virus, es decir, en las etapas finales de la replicación viral.[10] Su propiedad de impedir la replicación del HIV-1, una vez éste está en el interior de la célula, ha animado a proponerlo como principio activo en la formulación de un gel microbicida, que se usa 12 horas antes de la relación sexual[11], iniciativa que ha contado con el apoyo de la fundación de Melinda and Bill Gates.

En esta parte del trabajo de maestría se planteó la búsqueda de nuevos dolabellanos minoritarios en *Dictyota pfaffii*, recolectada en el Brasil, así como la evaluación de su actividad antiviral. Los compuestos y datos acá reportados podrán usarse para hacer estudios de dereplicación con especímenes de *Dictyota pfaffii* recolectados en aguas colombianas más adelante.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies GC7890A acoplado a un espectrómetro de masas MSD-5975C Agilent Technologies con autoinyector, en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70eV. El cromatógrafo fue equipado con una columna DB-5MS (5% Phenilmetilsiloxano) de 60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ . Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono fueron registrados en un equipo Varian VNMRS de 500MHz, usando como disolvente cloroformo deuterado al 99.5% Merck. La cromatografía en columna (CC) se realizó sobre sílica gel tipo 60 (70-230 MESH ASTM, Merck) usando como revelador sulfato cérico amónico. Los solventes empleados fueron calidad R.A. (Reactivo Analítico).

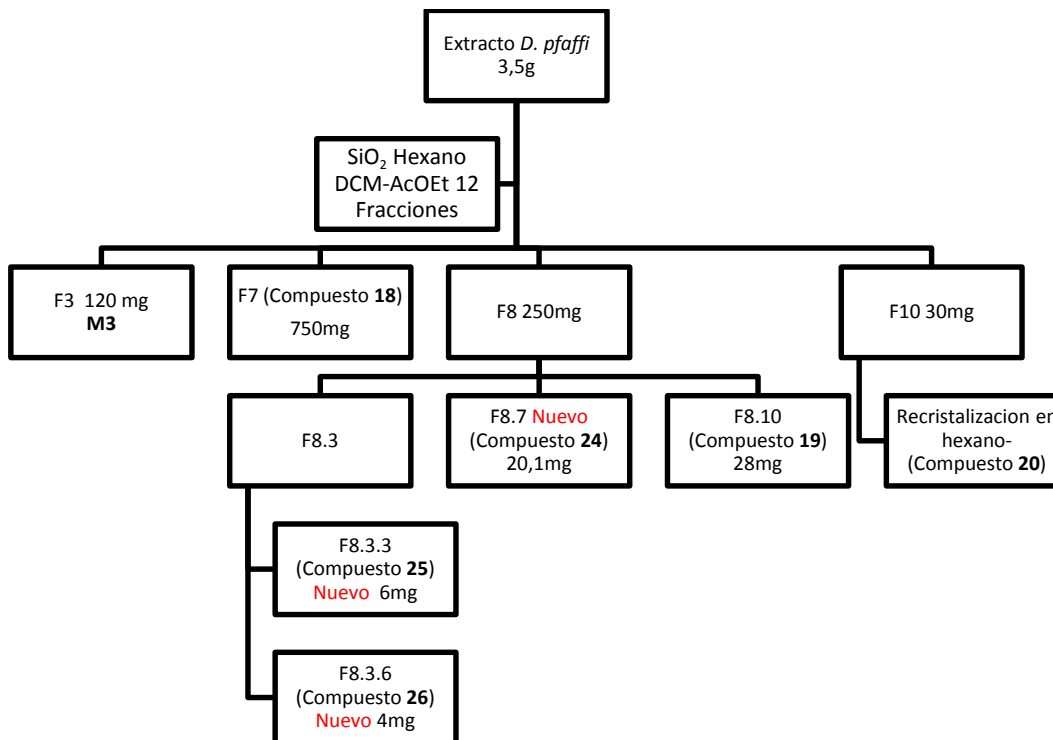
### 3.2.1. Material vegetal

Ejemplares del alga parda *Dictyota pfaffii* fueron recolectados en Atol das Rocas (Brasil), en el mes de abril de 2009 mediante buceo autónomo a una profundidad de 6-9 metros. Éstas fueron identificadas por el biólogo marino Roberto Villaça (UFF). El voucher HRJ 9117 se encuentra depositado en el herbario de la Universidad de Río de Janeiro, Brasil.

### 3.2.2. Extracción, purificación y elucidación estructural

El alga parda *Dictyota pfaffii* (peso seco 65g) se extrajo 3 veces con 500mL de diclorometano (DCM) por 24 horas, el solvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener 3.5g de extracto bruto. Éste fue sometido a cromatografía en columna al vacío sobre sílica gel, empleando un gradiente discontinuo de polaridad creciente (hexano, DCM, AcOEt, MeOH) obteniendo doce fracciones (F1 a F12) (Figura 3.1). A partir de la fracción F3, eluída con Hexano:DCM 8:2, se obtuvo una mezcla de tres compuestos, denominada **M3**. De la fracción F7, eluída con DCM:AcOEt 9:1, se recuperó un cristal blanco en forma de agujas que correspondió al compuesto **18** (750mg). La F8 fue sometida a una nueva columna sobre sílica eluyendo de manera isocrática con DCM:AcOEt 9:1 para obtener 12 fracciones (F8.1-F8.12). La fracción F8.3 contenía la mezcla de 2 diterpenos que pudo ser separada mediante una nueva columna sobre sílica obteniendo los compuestos nuevos **25** (6,0mg) y **26** (4,0mg). La fracción F8.7 correspondió al compuesto nuevo **24** (20,1mg); mientras que de la fracción F8.10, se

recuperó el dolabellano conocido **19** (28mg). Finalmente, por recristalización en hexano de la fracción F10 se obtuvo un cristal blanco identificado como **20** (30mg). El proceso de separación se resume en la figura 3.1. Todos los compuestos fueron identificados por técnicas espectroscópicas, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mono- y bidimensionales, y espectrométricas (EM-IE).



**Figura 3.1** Esquema del fraccionamiento del alga *D. paffii*

(1R\*,2E,4R\*,6E,8S\*,10S\*,11S\*,12R\*)-10,18-Diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno(18)  
 Agujas Blancas,  $[\alpha]_D^{25}$   $-123^\circ$  (c 0.002,  $\text{CHCl}_3$ ); 37.31 min (IK 2475) **EM-IE** *m/z*  
 (intensidad relativa) 346 (6), 286 (14), 271 (12), 245 (15), 161 (29), 147 (23), 121 (23), 95  
 (71), 69 (34), 55 (31), 43 (100) **RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.60 (1H, ddd  $J=$  15.1, 11.1,  
 4.2 Hz, H-6), 5.22 (1H, d  $J=$  16.2, H-2), 5.06 (1H, dd  $J=$  16.2 8.4 Hz, H-3), 4.92 (1H, dd  $J=$   
 15.1, 1.3 Hz, H-7), 4.78 (1H, d  $J=$ 6.9 Hz, H-10), 3.20 (1H, ddd  $J=$  11.1 11.0, 6.9 Hz, H-12),  
 2.33 (1H, dddd  $J=$  12.3, 4.2, 3.9, 1.3 Hz, H-5b), 2.22 (1H, dd  $J=$ 15.1, 7.5 Hz, H-9b), 2.19  
 (1H, d  $J=$  6.6 Hz, H-4), 2.06 (3H, s, H-22), 1.92 (3H, s, H-24), 1.63 (1H, m, H-9a), 1.64  
 (1H, m, H-14b), 1.60 (3H, s, H-20), 1.58 (1H, d  $J=$  7.5, H-11), 1.40 (3H, s, H-19), 1.35 (2H,  
 m, H-13), 1.31 (1H, m, H-14a), 1.19 (3H, s, H-17), 1.08 (3H, d  $J=$  6.6 Hz, H-16), 0.79 (3H,  
 s, H-15). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.5 (C, C-21), 169.8 (C, C-23), 140.5 (CH, C-2),  
 138.2 (CH, C-7), 132.2 (CH, C-3), 127.7 (CH, C-6), 84.4 (C, C-18), 72.0 (C, C-8), 68.8  
 (CH, C-10), 59.3 (CH, C-11), 51.4 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 47.8 (C, C-1), 43.5 (CH, C-12), 40.7 (C  $\text{H}_2$ ,  
 C-5), 36.7 (CH, C-4), 35.1 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 30.1 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 26.6 ( $\text{CH}_3$ , C-20), 25.5 ( $\text{CH}_2$ , C-

13), 23.0 (CH<sub>3</sub>, C-24), 22.4 (CH<sub>3</sub>, C-19), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C-22), 21.0 (CH<sub>3</sub>, C-16), 20.2 (CH<sub>3</sub>, C-15)

(1R\*,2E,4R\*,6E,8S\*,10S\*,11S\*,12R\*)-10-Acetoxy-8,18-dihidroxi-2,6-dolabelladieno (19)

Sólido blanco,  $[\alpha]_D^{25}$  -70° (c, 0.5, CHCl<sub>3</sub>) 34.06 (IK 2314) **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 349 [M]<sup>+</sup> (1), 271 (11), 161 (25), 147 (34), 121 (28), 95 (100), 69 (32). **RMN** <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.57 (1H, ddd *J*= 15.0, 11.1, 3.8 Hz, H-6), 5.22 (1H, d *J*= 16.3 Hz, H-2), 5.08 (1H, dd *J*= 16.3, 8.4 Hz, H-3), 4.97 (1H, d *J*= 15.0 Hz, H-7), 4.84 (1H, br d *J*= 6.7 Hz, H-10), 2.42 (1H, dd *J*= 6.7, 2.4 Hz, H-9b), 2.32 (1H, dddd *J*= 12.0, 3.8, 3.3, 1.3 Hz, H-5b), 2.20 (1H, m, H-4), 2.08 (3H, s, H-22), 1.74 (1H, dd *J*= 12.0, 11.1 Hz, H-5a), 1.60 (1H, d *J*= 11.0 Hz, H-9a), 1.59 (1H, dd *J*= 10.2, 5.7 Hz, H-12), 1.58 (1H, d *J*= 10.2 Hz, H-11), 1.29 (3H, s, H-20), 1.20 (3H, s, H-19), 1.18 (3H, s, H-17), 1.08 (3H, d *J*= 6.6 Hz, H-16), 0.80 (3H, s, H-15) **RMN** <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  171.9 (C, C-21), 140.6 (CH, C-2), 138.7 (CH, C-7), 132.1 (CH, C-3), 127.3 (CH, C-6), 72.6 (C, C-18), 72.2 (C, C-8), 69.7 (CH, C-10), 59.3 (CH, C-11), 52.9 (CH<sub>2</sub>, C-9), 47.8 (C, C-1), 48.2 (CH, C-12), 40.7 (C H<sub>2</sub>, C-5), 36.6 (CH, C-4), 35.5 (CH<sub>2</sub>, C-14), 31.9 (CH<sub>3</sub>, C-20), 30.1 (CH<sub>3</sub>, C-17), 26.3 (CH<sub>2</sub>, C-13), 22.6 (CH<sub>3</sub>, C-19), 21.5 (CH<sub>3</sub>, C-22), 20.9 (CH<sub>3</sub>, C-16), 20.0 (CH<sub>3</sub>, C-15).

(1R\*,2E,4R\*,6E,8S\*,10S\*,11S\*,12R\*)-8,10,18-trihidroxi-2,6-dolabelladieno (20) Agujas

blancas  $[\alpha]_D^{25}$  -27° (c, 0.5, CHCl<sub>3</sub>) 32.86 min (IK 2257) **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 304 [M]<sup>+</sup> (1), 147 (23), 121 (30), 95 (100), 69 (32), 55 (27); **RMN** <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  5.75 (1H, d *J*=16.2 Hz, H-7), 5.33 (1H, dd *J*=16.2, 4.3 Hz, H-3), 5.10 (1H, ddd *J*=16.2, 7.5, 7.3 Hz, H-6), 4.94 (1H, dd *J*=16.2, 1.2 Hz, H-2), 3.90 (1H, d *J*=9.3 Hz, H-10), 2.58 (1H, m, H-4), 2.34 (1H, ddd *J*=11.1, 11.0, 6.8 Hz, H-9b), 2.17 (1H, dd *J*=7.3, 4.3 Hz, H-5a), 1.91 (2H, m, H-13), 1.50 (1H, m, H-14a), 1.48 (1H, m, H-11), 1.41 (1H, m, H-12), 1.33 (1H, dd *J*=11.7, 2.1 Hz, H-9a), 1.24 (3H, s, H-19), 1.27 (3H, s, H-17), 1.17 (3H, s, H-20), 1.05 (3H, *J*=d 6.9 Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-15) **RMN** <sup>13</sup>C (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  143.5 (CH, C-7), 137.5 (CH, C-2), 132.5 (CH, C-3), 125.8 (CH, C-6), 75.3 (C, C-8), 73.1 (C, C-18), 67.3 (CH, C-10), 57.4 (CH<sub>2</sub>, C-9), 57.0 (CH, C-11), 49.7 (C, C-1), 47.2 (CH, C-12), 38.4 (CH<sub>2</sub>, C-5), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C-14), 34.3 (CH, C-4), 31.8 (CH<sub>3</sub>, C-19), 29.5 (CH<sub>3</sub>, C-17), 26.2 (CH<sub>2</sub>, C-13), 23.5 (CH<sub>3</sub>, C-20), 16.8 (CH<sub>3</sub>, C-15), 16.6 (CH<sub>3</sub>, C-16).

(1R\*,2E,4R\*,7R\*,10S\*,11S\*,12R\*)10,18-diacetoxy-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno (24)

Se aisló como un sólido blanco (20.1mg)  $[\alpha]_D^{25}$  +11° (c 0.002, CHCl<sub>3</sub>); 39.57 min (IK 2593)

**EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 406 (4), 346, (3), 304 (4), 286 (100), 271 (46), 243 (61), 215 (25), 173 (34), 145 (32), 133 (30), 107 (75), 93 (80), 55 (65). **RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  5.66 (1H, dd  $J=16.4, 7.2$  Hz, H-3), 5.17 (1H, d  $J=16.4$  Hz, H-2), 5.12 (1H, br s, H-17a), 4.99 (1H, br s, H-17b), 4.91 (1H, ddd  $J=8.9, 4.7, 2.4$  Hz, H-10), 4.37 (1H, dd  $J=8.4, 3.5$  Hz, H-7), 2.95 (1H, td  $J=10.8, 4.7$  Hz, H-12), 2.46 (1H, dd  $J=13.2, 8.9$  Hz, H-9b), 2.43 (1H, dd  $J=13.2, 4.7$  Hz, H-9a), 2.20 (1H, m, H-4), 2.04 (3H, s, H-22), 1.95 (1H, m, H-13a), 1.93 (3H, s, H-24), 1.90 (1H, m, H-6b), 1.84 (1H, dd  $J=10.8, 2.4$  Hz, H-11), 1.63 (1H, m, H-5b), 1.62 (1H, m, H-6a), 1.60 (3H, s, H-20), 1.58 (1H, m, H-5a), 1.46 (1H, m, H-14a), 1.45 (1H, m, H-13b), 1.42 (3H, s, H-19), 1.39 (1H, m, H-14b), 0.97 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-16), .83 (3H, s, H-15) **RMN  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5 (C, C-21), 170.5 (C, C-23), 146.2 (C, C-8), 137.5 (CH, C-2), 133.6 (CH, C-3), 113.5 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 84.8 (C, C-18), 70.2 (CH, C-7), 68.6 (CH, C-10), 51.1 (CH, C-11), 48.4 (C, C-1), 44.2 (CH, C-12), 41.0 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 38.9 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 34.8 (CH, C-4), 32.6 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 32.0 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 26.4 ( $\text{CH}_3$ , C-20), 26.4 ( $\text{CH}_2$ , C-13), 23.4 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 23.0 ( $\text{CH}_3$ , C-24), 22.2 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.0 ( $\text{CH}_3$ , C-22), 16.8 ( $\text{CH}_3$ , C-15).

(1*R*\*,2*E*,4*R*\*,7*S*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-Diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno (25) Se aisló como un sólido blanco.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +4^\circ$  (c 0.002,  $\text{CHCl}_3$ ) 39.03 min (IK 2567) **EM-IE**  $m/z$  (intensidad relativa) 406 (3), 328 (5), 304 (7), 286 (45), 243 (43), 215 (20), 187 (28), 161 (47), 135 (65), 107 (77), 93 (100), 55 (60) **RMN  $^1\text{H}$**  (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.53 (1H, dd  $J=16.4, 8.5$  Hz, H-3), 5.24 (1H, d  $J=16.4$  Hz, H-2), 5.04 (1H, br s, H-17a), 4.89 (1H, br s, H-17b), 4.88 (1H, ddd  $J=10.1, 3.2, 2.1$  Hz, H-10), 3.95 (1H, dd  $J=11.4, 4.9$  Hz, H-7), 3.06 (1H, td  $J=10.5, 4.9$  Hz, H-12), 2.65 (1H, dd  $J=13.8, 10.1$  Hz, H-9a), 2.50 (1H, br d  $J=13.8$  Hz, H-9b), 2.05 (3H, s, H-22), 2.04 (1H, m, H-4), 1.96 (1H, m, H-13a), 1.94 (1H, dd  $J=10.5, 3.2$  Hz, H-11), 1.92 (3H, s, H-24), 1.85 (1H, dd  $J=9.0, 4.9$  Hz, H-6a), 1.76 (1H, dd  $J=11.2, 2.3$  Hz, H-5a), 1.64 (1H, m, H-6b), 1.61 (3H, s, H-20), 1.51 (1H, m, H-14a), 1.48 (1H, m, H-13b), 1.47 (1H, m, H-14b), 1.45 (3H, s, H-19), 1.08 (1H, dd  $J=11.2, 4.9$  Hz, H-5b), 1.00 (3H, d  $J=6.7$  Hz, H-16), 0.83 (3H, s, H-15). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.5 (C, C-21), 169.9 (C, C-23), 144.8 (C, C-8), 138.9 (CH, C-2), 134.5 (CH, C-3), 117.0 ( $\text{CH}_2$ , C-17), 84.8 (CH, C-18), 76.7 (CH, C-7), 70.3 (CH, C-10), 50.6 (CH, C-11), 48.1 (C, C-1), 44.2 (CH, C-12), 38.7 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 36.5 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 34.7 (CH, C-4), 33.3 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 33.2 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 26.6 ( $\text{CH}_3$ , C-20), 26.5 ( $\text{CH}_2$ , C-13), 23.2 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 22.9 ( $\text{CH}_3$ , C-24), 21.1 ( $\text{CH}_3$ , C-16), 21.0 ( $\text{CH}_3$ , C-22), 18.4 ( $\text{CH}_3$ , C-15).

(1R\*,2E,4R\*,8E,10S\*,11S\*,12R\*)10,18-Diacetoxi-7-hidroxi-2,8-dolabelladieno (26) Se aisló como un sólido blanco  $[\alpha]_D^{25} +14^\circ$  (c 0.002, CHCl<sub>3</sub>) 37.34 min (IK 2475) **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa) 406 (4) 304 (5) 286 (38) 271 (31) 243 (32) 229 (12) 203 (23) 175 (51) 133 (52) 121 (71) 107 (75) 95 (100) 79 (58) 69 (53) 55 (63). **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_H$  5.70 (1H, dd  $J=16.3, 6.9$  Hz, H-3), 5.58 (1H, dd  $J=10.4, 2.3$  Hz, H-10), 5.31 (1H d  $J=10.5$  Hz, H-9), 5.23 (1H, dd  $J=16.4, 0.7$  Hz, H-2), 5.08 (1H, t  $J=6.6$  Hz, H-7), 2.98 (1H, m, H-12), 2.39 (1H, ddd  $J=13.9, 7.7, 3.3$  Hz, H-4), 2.34 (1H, m) 1.71 (1H, m, H-5), 2.02 (3H, s, H-24), 1.97 (3H, s, H-22), 1.95 (1H, m, H-13a), 1.76 (1H, dd  $J=10.1, 2.1$  Hz, H-11), 1.66 (3H, d  $J=1.4$  Hz, H-17), 1.67 (1H, m, H-6), 1.59 (3H, s, H-19), 1.49 (1H, m, H-14a), 1.46 (1H, m, H-13b), 1.45 (1H, m), 1.43 (3H, s, H-20), 1.39 (1H, m, H-14b), 0.96 (3H, d  $J=6.9$  Hz, H-16), 0.93 (3H, s, H-15) **RMN <sup>13</sup>C** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  170.8 (C, C-23), 170.2 (C, C-21), 140.1 (C, C-8), 136.9 (CH, C-2), 134.1 (CH, C-3), 125.8 (CH, C-9), 69.0 (CH, C-7), 84.9 (C, C-18), 67.9 (CH, C-10), 53.3 (CH, C-11), 48.9 (C, C-1), 44.3 (CH, C-12), 39.2 (CH<sub>2</sub>, C-14), 34.9 (CH, C-4), 33.5 (CH<sub>2</sub>, C-5), 30.7 (CH<sub>2</sub>, C-6), 26.2 (CH<sub>2</sub>, C-13), 26.0 (CH<sub>3</sub>, C-19), 23.6 (CH<sub>3</sub>, C-20), 23.0 (CH<sub>3</sub>, C-22), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C-24), 19.8 (CH<sub>3</sub>, C-16), 17.0 (CH<sub>3</sub>, C-17), 16.9 (CH<sub>3</sub>, C-15).

### 3.2.3 Ensayos de actividad antiviral

Los ensayos de actividad antiviral se llevaron a cabo en la Fundación Oswaldo Cruz (Río de Janeiro, Brasil) de acuerdo a la metodología establecida por Cirne do Santos & Frugulhetti y colaboradores [7, 8, 12], tal y como se describe brevemente a continuación:

#### Células y virus

Las células y virus utilizados para el ensayo antiviral y citotóxico fueron: Células de linaje MT-2, resuspendidas en medio RPMI 1640 (LGC Bio, Sao Paulo) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT). El virus del VIH-1 III<sub>B</sub> (tropismo CXCR4-X4, subtipo B) usado para infectar las células, fue preparado en células MT-2 activado con PHA y almacenado a -70°C.



### Determinación de la viabilidad celular

El siguiente ensayo pretende evaluar la citotoxicidad de los compuestos puros, frente a las líneas celulares MT-2 utilizando un método colorimétrico, ya que se espera que un compuesto con potencial antiviral no sea citotóxico frente a células humanas. La viabilidad celular fue evaluada mediante el método del bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma).

Linfocitos MT-2 ( $2 \times 10^6$  cel/100 $\mu$ L/pozo) cultivados en medio RPMI 1640 y suplementados con SFB 10% fueron colocados en placas de 96 pozos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos puros diluídos en DMSO 5% durante 4 a 5 días. Al final de este periodo la actividad celular fue determinada por colorimetría mediante la adición de 20 $\mu$ L de solución de MTT a 5mg/mL. Luego de 4 horas de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> se adicionaron 100 $\mu$ L de SDS 10% en HCl 0,01N. Tras 24 horas, las placas fueron analizadas en un lector de Elisa a 540 y 620nm. Los resultados fueron analizados comparando la absorbancia de los pozos tratados con la de los controles. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Esta información permitió calcular la concentración citotóxica 50 y 90 (CC<sub>50</sub> y CC<sub>90</sub>).[13]

### Ensayo antiviral, determinación de la actividad antiviral

Para determinar la actividad anti-VIH-1, se monitoreó la aparición de sincicios en células MT-2 por observación en microscopio, así como el efecto del virus citopático por un método colorimétrico (MTT, Sigma).

Los linfocitos MT-2 ( $2 \times 10^6$  cel/100 $\mu$ L/pozo) cultivados en medio RPMI 1640 suplementados con SFB 10%, fueron colocados en placas de 96 pozos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e infectados con el virus VIH-1 III<sub>B</sub> (5 a 10 ng de suspensión viral por 2 horas), posteriormente estas células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos puros, e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2 a 3 días. Al final de este periodo se realizaron las observaciones en el microscopio y se determinó el efecto citopático por colorimetría mediante la adición de 20 $\mu$ L de solución de MTT a 5mg/mL. Luego de 4 horas de incubación a 37°C se adicionaron 100 $\mu$ L de SDS 10% en HCl 0,01N. Tras 24 horas, las placas fueron analizadas en un lector de Elisa a 540 y 620nm. Los resultados fueron estudiados comparando la absorbancia de los pozos tratados con la de

los pozos control. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Como control positivo se utilizó Nevirapina 5 $\mu$ M. Esta información permitió el cálculo de la concentración efectiva 50 y 90 (EC<sub>50</sub> y EC<sub>90</sub>).[13]

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El alga parda *Dictyota paffii* ha sido estudiada químicamente en Brasil 2004, mostrando ser una productora prolífica de diterpenos tipo dolabellano.[7] Estudios anteriores mostraron que los dos diterpenos mayoritarios (**18** y **19**) y el producto semisintético (**20**), son activos frente al virus VIH-1 y la transcriptasa reversa del virus VIH-1, por lo que se interpretó que éstos son compuestos con un gran potencial antiviral;[7, 9, 10] sin embargo, nada se sabe acerca de los dolabellanos minoritarios de esta alga, por lo que en este estudio se buscó su identificación y así darle continuidad a los trabajos anteriores.

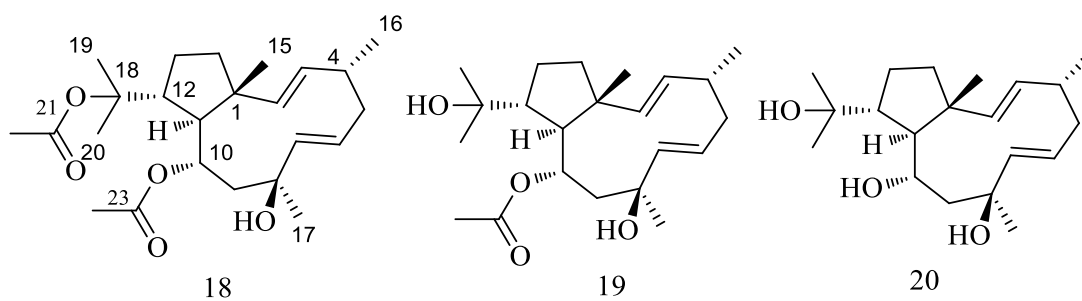
De esta manera, se colectaron ejemplares de esta alga en Atol das Rocas a 260 km al noreste de la ciudad de Natal (Brasil), secándolas para luego obtener su extracto por maceración en DCM. El extracto bruto (3,5g) fue fraccionado por cromatografía en columna sobre sílica gel obteniendo doce fracciones. Todas las fracciones fueron controlados por CCD y CG-EM, encontrando que las fracciones más apolares F2-F4, eluidas con mezclas Hexano:DCM, están constituidas por mezclas de ácidos grasos de cadena lineal (ácido palmítico **1** y ácido mirístico **3**), y esteroides (fuscoesterol **17**), compuestos encontrados de manera usual en algas pardas de este género. La caracterización de estos compuestos se hizo por sus espectros de masas, obtenidos mediante CG-EM, y su espectro de RMN <sup>1</sup>H.

Cuando la fracción F3, eluida con Hexano:DCM 8:2, fue analizada por CG-EM se observó la presencia señales para 3 compuestos mayoritarios, por lo que fue denominada mezcla **M3**, con patrones de fragmentación típicos de monoterpenos halogenados (Ver anexo 3.1). El análisis por RMN <sup>1</sup>H de esta fracción permite observar que el compuesto mayoritario de M3, tiene señales para hidrógenos olefínicos en  $\delta_H$  5.31 (1H, br d  $J=10.6$  Hz); 5.42 (1H, br d  $J=17.0$  Hz); 6.10 (1H, m) y 6.63 (1H, d  $J=9.6$  Hz), las tres primeras señales típicas de un alqueno terminal monosustituido. También se observan señales para metinos unidos a halógeno en 4.54 (1H, dd  $J=5.0, 2.7$  Hz) así como señales de dos metilos 1.79 (3H s,) y 1.99 (3H, s) muy desplazadas debido a la cercanía a un heteroátomo y/o un metilo sobre enlace. Todas estas son típicas de monoterpenos halogenados, abundantes en algas rojas de los géneros *Plocamium*, *Portieria* y *Ochtodes*. [14] Así, teniendo en cuenta que este tipo de compuestos nunca han sido reportados para algas pardas y dada su poca abundancia, se cree que la muestra de alga

parda recolectada tenía una pequeña contaminación de un alga roja, las cuales son conocidas por producir monoterpenos halogenados.[14, 15]

De la fracción F7, eluida con DCM:AcOEt 9:1, se aislaron 750mg de un cristal blanco en forma de agujas, lo que se identificó como el compuesto **18**; este compuesto es el mayoritario del alga y constituye más del 20% del extracto. En el espectro de masas de **18** en modo impacto electrónico (EM-IE) se observó un ion en  $m/z$  406 correspondiente a  $[M]^+$ , y congruente con una fórmula molecular  $C_{24}H_{38}O_5$ ; además, de los iones en  $m/z$  346  $[M-AcOH]^+$  y 286  $[M-AcOH-AcOH]^+$ . Lo anterior sugiere la presencia de un diterpeno con dos grupos acetato. El espectro RMN  $^1H$  de **18** mostró 7 señales para metilos en  $\delta_H$  2.06 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.07 (d  $J=6.7$  Hz, 3H), y 0.78 (s, 3H). Los dos primeros correspondientes a grupos acetato. También se observan cuatro señales de protones olefínicos en  $\delta_H$  5.60 (ddd  $J=15.2, 11.2, 4.1$  Hz), 5.22 (d  $J=16.1$  Hz), 5.06 (dd  $J=16.1, 8.8$  Hz), y 4.92 (d  $J=15.2$  Hz), lo cual es indicio de la presencia de dos insaturaciones en la molécula; los valores de las constantes de acoplamiento ( $J=16.1$  y  $15.2$  Hz) sugieren una configuración *trans* para las dos insaturaciones;[16] adicionalmente, se observa un protón de carbono oxigenado en  $\delta_H$  4.78 (d  $J=7.1$  Hz). En el experimento APT se observan 24 señales, correspondientes a 7 metilos (señales entre  $\delta_C$  20 y 26); 2 carbonilos ( $\delta_C$  170.0 y 172.5) seguramente de los grupos acetato antes identificados; 4 metilenos, y 9 metinos (4 de ellos corresponden a dos dobles enlaces). Entre estas señales de RMN  $^{13}C$ , tres corresponden a carbonos oxigenados en  $\delta_C$  68.8 (CH), 72.0 (C) y 84.4 (C), confirmando la presencia del metino oxigenado identificado en RMN  $^1H$ , e indicando la presencia de dos carbonos oxigenados cuaternarios adicionales. Las señales anteriores sugieren una estructura bicíclica tipo dolabellano.[17] La fusión de los dos anillos del dolabellano (posiciones 1 y 11) se identificó como *trans* debido al desplazamiento a campo alto del metilo Me-15 en  $\delta_C$  20.2, que es característico de una disposición axial del metilo, y está en concordancia con la fusión de anillos *trans* ( $\delta_C \sim 18$ ) y no con fusiones *cis* ( $\delta_C \sim 30$ ) de las decalinas C-10 metiladas.[18, 19] Todo lo anterior sugiere la presencia de un diterpeno tipo dolabellano con dos grupos acetato. La comparación de estos datos espectroscópicos con datos de literatura permitieron concluir que el compuesto **18** es el dolabellano ( $1R^*, 2E, 4R^*, 6E, 8S^*, 10S^*, 11S^*, 12R^*$ )-10,18-diacetoxi-8-hidroxi,2-6dolabelladieno (Figura 3.2), previamente aislado de esta misma alga en 2004 por Barbosa y colaboradores.[7]

El análisis de la fracción F8.10 mostró que correspondía a un compuesto puro (**19**), el cual fue analizado de manera análoga a la anterior, encontrando que su espectroscopia es muy similar a la de **18** con la diferencia que **19** presenta solo un hidroxilo adicional. La comparación de los datos espectroscópicos, tanto de RMN como de masas, con los de literatura permitió identificar a **19** como (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,6*E*,8*S*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)-10-Acetoxi-8,18-dihidroxi-2,6-dolabelladieno **19** (28mg) (Figura 3.2), compuesto aislado previamente del alga *Dictyota pfaffii*. [7] De la misma manera el compuesto **20**, aislado por recristalización desde hexano de la fracción F10, se analizó por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C mostrando señales típicas de dolabellano, muy similar a **18**, pero sin la presencia de grupos acetatos. Tras la comparación de su espectro con los datos de la literatura, [7] se determinó que **20** corresponde a (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,6*E*,8*S*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)-8,10,18-trihidroxi- 2,6-dolabelladieno (30mg) (Figura 3.2), compuesto reportado anteriormente en el molusco *Dolabella californica*, [17] siendo este el primer reporte de **20** para el alga *D. pfaffii*. En la literatura se confirma que el molusco *Dolabella californica* se alimenta de algas, y además el compuesto se aisló de su glándula digestiva, por lo que es claro que el diterpeno es adquirido mediante la dieta por esta liebre de mar. [20]



**Figura 3.2.** Dolabellanos **18-20** aislados de *Dictyota pfaffii*

La fracción F8.7 corresponde al compuesto puro **24**. El espectro de masas de **24** mostró un ion molecular en  $m/z$  406  $[M]^+$ , congruente con un compuesto de fórmula  $C_{24}H_{38}O$ , además de iones en  $m/z$  346  $[M-AcOH]^+$  y 286  $[M-AcOH-AcOH]^+$ , indicando la presencia de dos grupos acetato. El espectro de RMN <sup>1</sup>H (figura 3.3) para **24** muestra la presencia de 6 metilos en  $\delta_H$  2.04 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 0.97 (d  $J=6.9$  Hz, 3H), y 0.83 (s, 3H), los dos primeros pertenecientes a grupos acetato; también se observan dos dobles enlaces que a diferencia de **18**, corresponden a una insaturación exocíclica ( $\delta_H$  5.12 (1H, br s) y 4.99 (1H, br s)), y una endocíclica ( $\delta_H$  5.66 (dd  $J=16.4, 7.2$

Hz), 5.17 (d,  $J=16.4$  Hz)) con configuración *trans* de acuerdo al valor de  $J$ . [21]. Adicionalmente, se observan 2 protones de carbono oxigenado en  $\delta_H$  4.91 (ddd  $J=8.7, 4.6, 2.4$  Hz) y 4.37 (dd  $J=8.4, 3.5$  Hz), que indican la presencia de un metino oxigenado adicional con respecto a **18**. El primero de ellos debe corresponder a un CH que soporta a un grupo acetato, mientras el segundo es de protón carbinólico. [21].

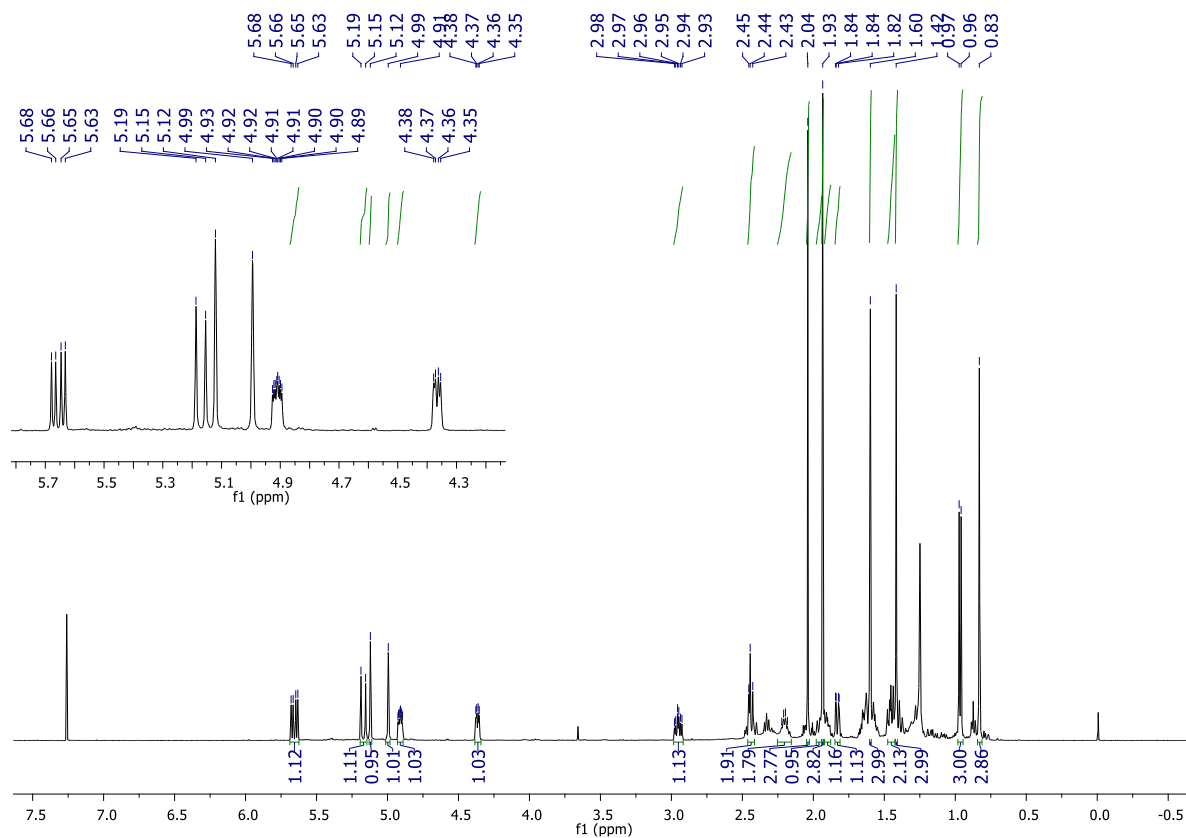
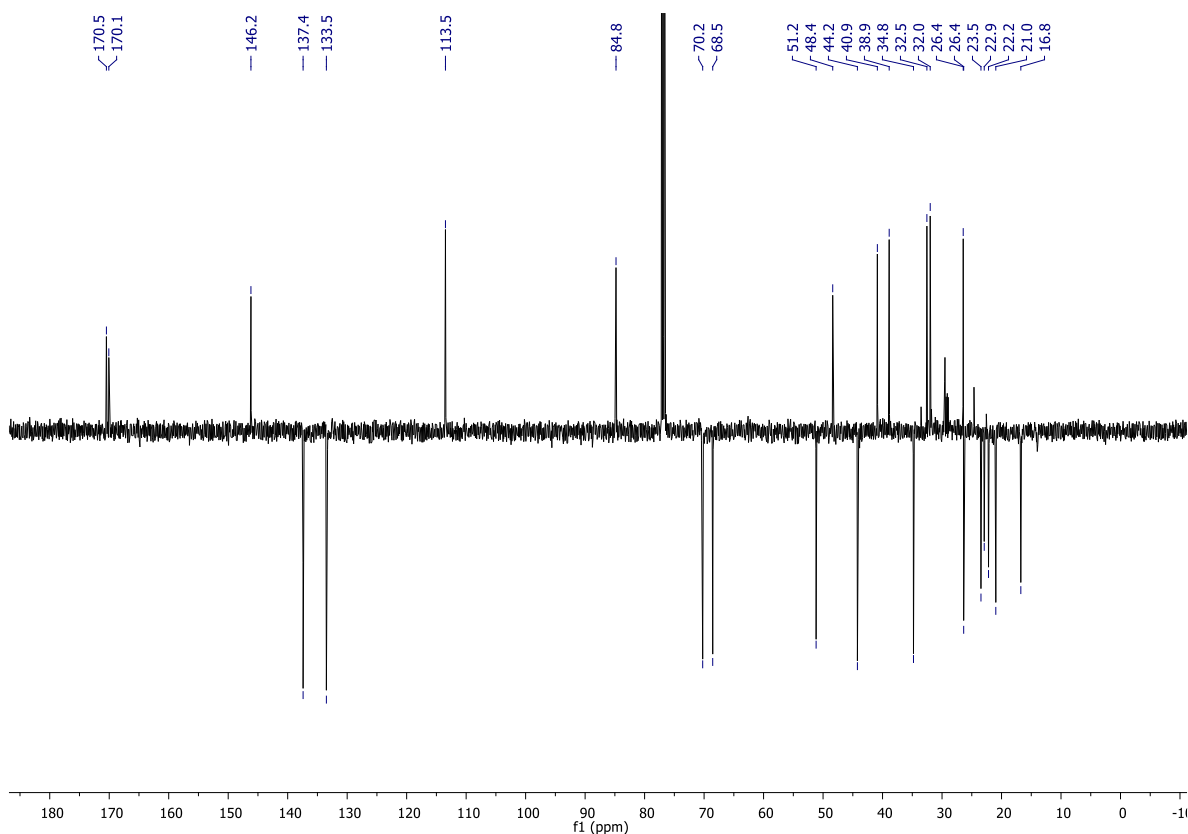


Figura 3.3: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **24**.



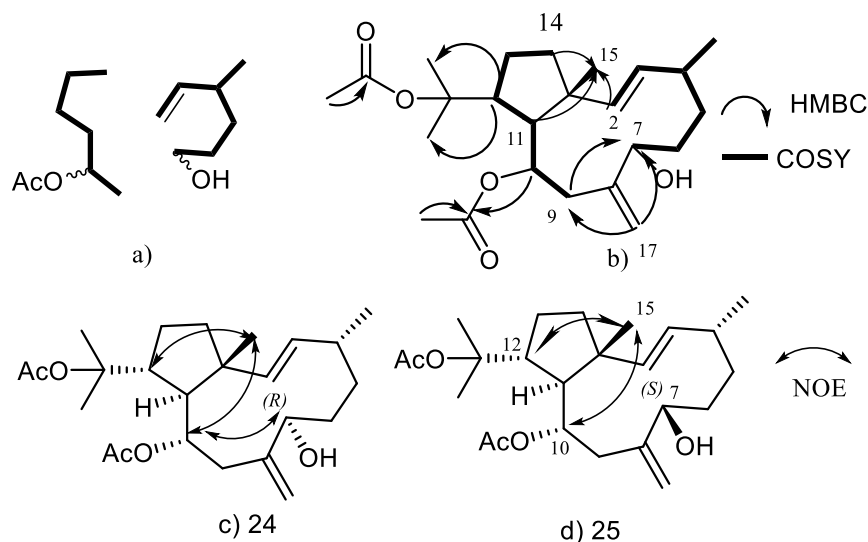
**Figura 3.4:** Espectro de RMN APT para el compuesto **24**

En el experimento APT (Figura 3.4) se observan 24 señales, correspondientes a seis metilos; seis metilenos, uno de los cuales corresponde al doble enlace exocíclico en  $\delta_c$  113.4; siete metinos (de los cuales dos son de un doble enlace); y cinco carbonos cuaternarios, dos de ellos de carboxilo de acetato (170.5 y 170.1 ppm) y uno olefínico en  $\delta_c$  146.2. Cabe resaltar que entre estas señales, tres corresponden a carbonos oxigenados en  $\delta_c$  70.2 (CH), 68.6 (CH) y 84.8 (C), lo que confirma la aparición de un metino oxigenado adicional con respecto al compuesto mayoritario **18**, así como la desaparición de un carbono cuaternario oxigenado con respecto a **18** mismo. Mediante el uso de los experimentos COSY y HSQC se identificaron dos sistemas de espín como se ilustra en la figura 3.5a; y quedaron sin asignar tres metilos, dos grupos acetato y un exometileno. El experimento HMBC permitió unir cada una de las subestructuras así como los sistemas de espín tal y como se describe a continuación: los protones olefínicos en  $\delta_H$  5.12 (br s, H-17a) y 4.99 (br s, H-17b) acoplan con el metino oxigenado en  $\delta_c$  70.2 (CH, C-

7), y con el carbono metilénico en  $\delta_c$  41.0 (CH<sub>2</sub>, C-9); a su vez los protones H-9a y H-9b en  $\delta_H$  2.43 (dd  $J=13.2$ , 4.7 Hz) y 2.46 (dd  $J=13.2$ , 8.9 Hz), respectivamente, acoplan con el carbono oxigenado en  $\delta_c$  70.2 (CH, C-7), lo que permitió unir los dos sistemas de espín a través de la doble enlace exocíclico de la posición C-8(17) (figura 3.5a). En HMBC también se observa que el protón olefínico H-2 en  $\delta_H$  5.17 (d  $J=16.4$  Hz), el protón H-14 en  $\delta_H$  1.46 (*m*) y el protón H-11 en  $\delta_H$  1.84 (dd  $J=0.8$ , 2.4 Hz) muestran correlación con el carbono en  $\delta_c$  16.8 (CH, C-15), estas correlaciones permitieron unir las 2 subestructuras entre las posiciones C1-C14, C1-C2 y C1-C11 (figura 3.5a). El protón carbinólico H-10 en  $\delta_H$  4.91 (ddd  $J=8.9$ , 4.7, 2.4 Hz) y los protones H<sub>3</sub>-24 en  $\delta_H$  1.93 (*s*) muestran correlaciones con el carbono en  $\delta_c$  170.1 (C, C-23), esta información permite afirmar que el carbono sobre la posición 10 se encuentra acetilado. Por último el hidrógeno H-12 en  $\delta_H$  2.95 (td  $J=10.8$ , 4.7 Hz, H-12) presenta acoplamiento con dos carbonos de metilo en  $\delta_c$  23.4 (C, C-19) y 26.4 (C, C-20), con lo cual se sugiere que se trata de una estructura tipo isopropilo unida al anillo principal en la posición C-12. Con todo lo anterior fue posible determinar la estructura plana del dolabellano **24** (Figura 3.5b).

El paso siguiente fue determinar la estructura tridimensional de **24**. Así, la fusión de los anillos de este dolabellano se identificó como *trans* a juzgar por el desplazamiento  $\delta_c$  del Me-15 en 16.8, indicando una estereoquímica relativa en C-1 y C-11 *R*<sup>\*</sup> y *S*<sup>\*</sup>, respectivamente. En el experimento NOESY se observan correlaciones entre la señal en  $\delta_H$  4.91 (ddd  $J=8.9$ , 4.7, 2.4 Hz, H-10) y la del metilo en  $\delta_H$  0.83 (*s*, Me-15), y de este metilo con la señal en  $\delta_H$  2.95 (td  $J=10.8$ , 4.7 Hz, H-12); adicionalmente, la señal en  $\delta_H$  4.91 (ddd  $J=8.9$ , 4.7, 2.4 Hz, H-10) correlaciona con  $\delta_H$  4.37 (dd  $J=8.4$ , 3.5 Hz, H-7), todo lo anterior indica que los protones H-7, H-10, H-12, y H<sub>3</sub>-15 están del mismo lado, fijando la estereoquímica relativa de estos centros como 7*R*<sup>\*</sup>, 10*S*<sup>\*</sup> y 12*R*<sup>\*</sup>. La estereoquímica en la posición 4 se asignó como 4*R*<sup>\*</sup> por ser los desplazamientos de los carbonos C-4 y C-16 en el compuesto **24** ( $\delta_c$  34,8 y 22.2) similares a los del compuesto **18** ( $\delta_c$  36,7 y 21.0, respectivamente) de estereoquímica ya establecida. Así, **24** fue identificado como (1*R*<sup>\*</sup>,2*E*,4*R*<sup>\*</sup>,7*R*<sup>\*</sup>,10*S*<sup>\*</sup>,11*S*<sup>\*</sup>,12*R*<sup>\*</sup>)10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno, que según la búsqueda de su estructura en bases de datos especializadas: Scifinder y Antimarin,[22, 23] permitió establecer que es un compuesto con estructura nueva en la naturaleza. En la tabla 3.1 se encuentra la asignación de todas las señales de RMN.





**Figura 3.5** a) Sistemas de spin determinados por COSY y HSQC para **24** b) Principales correlaciones HMBC observadas para el compuesto **24** c) Estructura tridimensional de **24** y d) Estructura tridimensional propuesta para los compuestos **25**. En c) y d) se presentan las principales correlaciones NOE observadas.

La fracción F8 fue sometida a una nueva columna sobre sílica eluyendo de manera isocrática con DCM:AcOEt 9:1 para obtener 12 fracciones (F8.1-F8.12). La fracción F8.3 contenía la mezcla de 2 compuestos, que fueron separados de nuevo por CC sobre sílica aislando los compuestos **25** y **26**.

El espectro de masas de **25** mostró un ion molecular en  $m/z$  406  $[M]^+$ , además de iones en  $m/z$  346  $[M-AcOH]^+$ , 328  $[M-AcOH-H_2O]^+$  y 286  $[M-AcOH-AcOH]^+$ , indicando la presencia de dos grupos acetato y un hidroxilo, lo anterior es congruente con un diterpeno de fórmula  $C_{24}H_{38}O$ , por lo que se trata de un isómero de **24**. El espectro RMN  $^1H$  de **25** muestra la presencia de 6 metilos en  $\delta_H$  2.05 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.00 (d  $J=6.7$  Hz, 1H) y 0.83 (s, 3H), los dos primeros pertenecientes a grupos acetato; también se observan señales para protones olefinicos en  $\delta_H$  5.53 (dd  $J=16.4, 8.5$ , 1H), 5.24 (d  $J=16.4$ , 1H), 5.04 (br s, 1H) y 4.89 (br s, 1H), las dos primeras para una insaturación endocíclica con configuración *trans* y las dos últimas para una exocíclica. Este patrón de insaturaciones es igual al de **24**. Adicionalmente, se observan 2 protones de carbonos oxigenados en  $\delta_H$  4.88 (dt  $J=10.1, 2.0$ ) y 3.95 (dd  $J=11.4, 4.9$  Hz, 1H), que indican la presencia de dos metinos oxigenados como en **24**. En el experimento APT se observan 24 señales, correspondientes a 6 metilos; 6 metilenos, uno de los cuales corresponde al doble enlace exocíclico en  $\delta_C$  117.0; 7 metinos (2 de ellos corresponden a

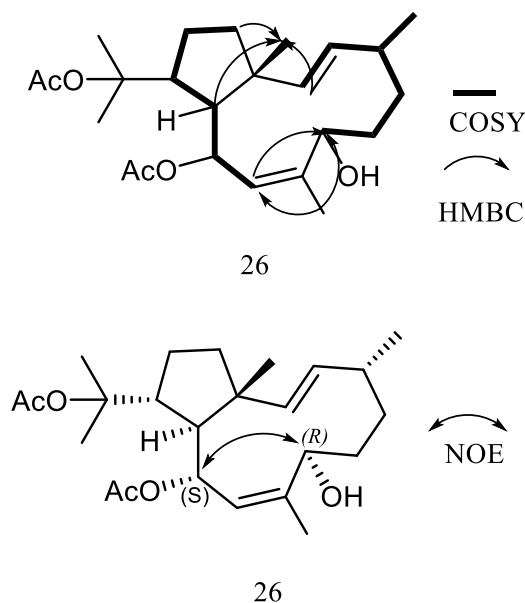
un doble enlace disustituído); y 5 carbonos cuaternarios, dos de ellos de carbonilos de acetato (171.5 y 170.0 ppm) y uno de ellos olefínico en  $\delta_c$  144.8. Cabe resaltar que entre estas señales de carbono, tres corresponden a carbonos oxigenados en  $\delta_c$  70.4 (CH), 76.7 (CH) y 84.8 (C), lo que confirma el mismo patrón de oxigenación de **24**. Mediante el uso de los experimentos COSY, HSQC y HMBC (figura 3.5 a y b) fue posible determinar la estructura plana del compuesto **25**, que resultó ser la misma de **24**. Para establecer las diferencias entre estos dos compuestos se compararon los desplazamientos químicos de los carbonos, encontrando que las mayores diferencias se hallan en torno de C-7, luego la estereoquímica relativa de estos dos compuestos debe ser igual en el resto de centros asimétricos siendo epímeros en C-7, pues el  $\delta_c$  de C-7 en **25** es de 76.7 mientras en **24** es de 70.2. Finalmente, el experimento NOESY (figura 3.5d) permitió observar correlaciones NOE entre los protones del metilo Me-15 en  $\delta_H$  0.83 (s, H<sub>3</sub>-15) y el protón H-12 en  $\delta_H$  3.06 (td  $J=10.5, 4.9$  Hz, H-12); además de la correlación entre H<sub>3</sub>-15 y el protón en  $\delta_H$  4.88 (ddd  $J=10.1, 3.2, 2.1$  Hz, H-10) indicando que los protones H-10, H-12 y H<sub>3</sub>-15 están del mismo lado. Y, a diferencia de **24** no se observa la correlación entre  $\delta_H$  3.95 (dd  $J=11.4, 4.9$  Hz, H-7) y  $\delta_H$  4.88 (ddd  $J=10.1, 3.2, 2.1$  Hz, H-10) lo que confirma que **25** es el epímero 7*S*\* de **24**. Así, **25** fue identificado como (1*R*\*,2*E*,4*R*\*,7*S*\*,10*S*\*,11*S*\*,12*R*\*)10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8(17)-dolabelladieno; la búsqueda de esta estructura en bases de datos especializadas permitió determinar que **25** (figura 3.5d) tiene una estructura nueva en la naturaleza.[22, 23] En la tabla 3.1 se encuentra la asignación de todas las señales de RMN.

**Tabla 3.1** Desplazamientos de  $\delta_C$  y  $\delta_H$  para los compuestos **24-26**

#C/# H	24		25		26	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	48.4	-	48.1	-	48.9	-
2	137.5	5.17 (d J=16.4 Hz)	138.9	5.24 (d J=16.4 Hz)	136.9	5.23 (dd J=16.4, 0.7 Hz, )
3	133.6	5.66 (dd J= 6.4, 7.2 Hz)	134.5	5.53 (dd J=16.4, 8.5 Hz)	134.1	5.70 (dd J=16.3, 6.9 Hz,)
4	34.8	2.20 (m)	34.7	2.04 (m)	34.9	2.39 (ddd J=13.9, 7.7, 3.3 Hz)
5	32.0	1.58 (m) 1.63 (m)	33.2	1.76 (dd J=11.2, 2.3 Hz) 1.08 (dd J=11.2, 4.9 Hz)	33.5	2.34 (m) 1.71 (m)
6	32.6	1.62 (m) 1.90 (m)	33.3	1.85 (dd J=9.0, 4.9 Hz) 1.64 (m)	30.7	1.45 (m) 1.66 (m)
7	70.2	4.37 (dd J=8.4, 3.5 Hz)	76.7	3.95 (dd J=11.4, 4.9 Hz)	69.0	5.08 (t J=6.6 Hz)
8	146.2	-	144.8	-	140.1	-
9	41.0	2.43 (dd J=13.2, 4.7 Hz) 2.46 (dd J=13.2, 8.9 Hz)	36.5	2.65 (dd J=13.8, 10.1 Hz) 2.50 (br d J=13.8 Hz)	125.8	5.31 (d J=10.5 Hz)
10	68.6	4.91 (ddd J= 8.9, 4.7, 2.4 Hz)	70.4	4.88 (ddd J=10.1, 3.2, 2.1 Hz)	67.9	5.58 (dd, J=10.4, 2.3 Hz)
11	51.1	1.84 (dd J= 10.8, 2.4 Hz)	50.6	1.94 (dd J=10.5, 3.2 Hz)	53.3	1.76 (dd, J=10.1, 2.1 Hz)
12	44.2	2.95 (td J=10.8, 4.7 Hz)	44.2	3.06 (td J=10.5, 4.9 Hz)	44.3	2.98 (m)
13	26.4	1.95 (m) 1.45 (m)	26.5	1.96 (m) 1.48 (m)	26.2	1.95 (m), 1.46 (m)
14	38.9	1.46 (m) 1.39 (m)	38.7	1.51 (m) 1.47 (m)	39.2	1.49 (m) 1.39 (m)
15	16.8	0.83 (s)	18.4	0.83 (s)	16.9	0.93 (s)
16	22.2	0.97 (d J=6.9 Hz)	21.1	1.00 (d J=6.7 Hz)	19.8	0.96 (d J=6.9 Hz)
17	113.5	5.12 (br s) 4.99 (br s)	117	5.04 (br s) 4.89 (br s)	17.0	1.66 (d J=1.4 Hz)
18	84.8	-	84.8	-	84.9	-
19	23.4	1.42 (s)	23.2	1.45 (s)	26.0	1.59 (s)
20	26.4	1.60 (s)	26.6	1.61 (s)	23.6	1.43 (s)
21	170.5	-	171.5	-	170.2	-
22	21.0	2.04 (s)	21	2.05 (s)	23.0	1.97 (s)
23	170.1	-	170	-	170.8	-
24	23.0	1.93 (s)	22.9	1.92 (s)	21.1	2.02 (s)

El espectro de masas del compuesto **26** mostró un ion molecular en  $m/z$  406  $[M]^+$ , además de iones en  $m/z$  346  $[M-AcOH]^+$  y 286  $[M-AcOH-AcOH]^+$ , indicando la presencia de dos grupos acetato, lo anterior es congruente con un diterpeno de fórmula  $C_{24}H_{38}O$ , por lo que se trata de un isómero de **25**. El espectro de RMN  $^1H$  de **26** (tabla 3.1) revela la presencia de 7 metilos,  $\delta_H$  2.02 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.67 (d J=1.4 Hz, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.43(s, 3H),

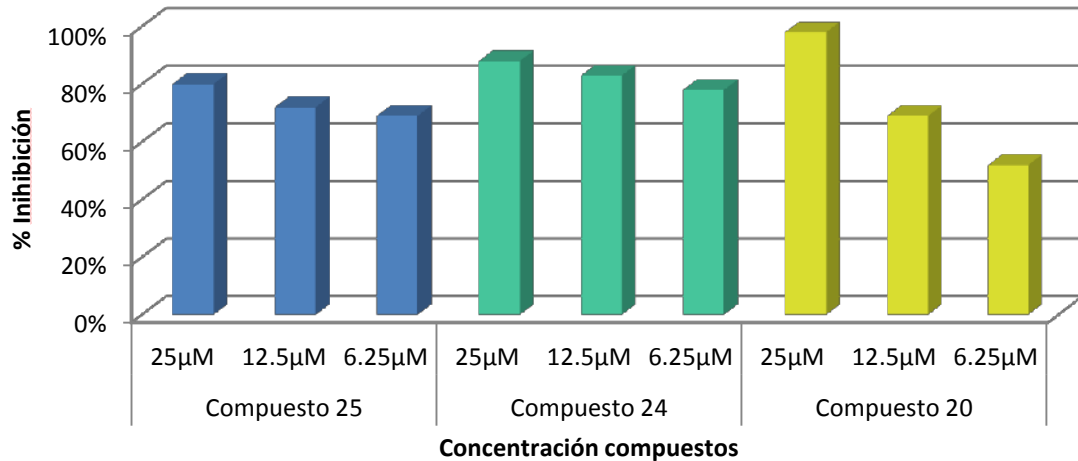
0.96 (d  $J=6.9$  Hz, 3H), y 0.93 (s, 3H), siendo los dos primeros de dos grupos acetato; y dos insaturaciones endocíclicas, a juzgar por las señales de los protones olefínicos en  $\delta_H$  5.70 (dd  $J=16.3, 6.9$  Hz, 1H), 5.31 (d  $J=10.4$  Hz, 1H), y 5.21 (s  $J=16.4$  Hz, 1H), una con configuración *trans* ( $J=16.4$  Hz) y la otra trisustituida. Adicionalmente, se observan señales para dos protones sobre carbono oxigenado muy desplazados en  $\delta_H$  5.08 (1H, t  $J=6.6$  Hz, H-7) y en 5.58 (1H, dd  $J=10.4, 2.3$  Hz, H-10) por lo que se presume que se trata de protones alílicos. En el experimento APT se observan 24 señales, correspondientes a 7 metilos (señales entre  $\delta_C$  20 y 26); 2 carboxilos ( $\delta_C$  170.2 y 170.8) de grupo acetato; 4 metilenos, y 8 metinos, tres de ellos correspondientes a dos dobles enlaces. También se observan las señales de 3 carbonos unidos a oxígeno en  $\delta_C$  69.0 (CH, C-7), 67.9 (CH, C-10) y 84.9 (C, C-18). Lo anterior, permitió establecer que **26** es un dolabellano diacetilado muy similar a **24**, pero con dos dobles enlaces endocíclicos. Mediante el uso de los experimentos, COSY, HSQC y HMBC fue posible determinar la estructura plana del dolabellano **26** (figura 3.6a) y que los dobles enlaces están en las posiciones 2 y 8, siendo *E* la configuración de la insaturación en C-2, a juzgar por el valor de las constantes de acoplamiento, mientras para el doble enlace en C-8 es *Z* a juzgar por los desplazamientos de H-9 y C-9 y su comparación con el compuesto ( $1R^*, 2E, 4R^*, 8Z, 10S^*, 11S^*, 12R^*$ )-10,18-diacetoxidolabella-2,8-dien-6-ona, reportado por Lu y Faulkner en 1998, y con la misma configuración en el doble enlace C-8 [24] (Figura 3.6b). Para determinar la estereoquímica relativa de **26** se emplearon las correlaciones NOE, donde el protón en  $\delta_H$  5.08 (t  $J=6.6$  Hz, H-7) acopla con el protón en  $\delta_H$  5.58 (dd  $J=10.4, 2.3$  Hz, H-10) sugiriendo que se encuentran del mismo lado de la molécula y fijando la estereoquímica de estos centros como  $7R^*$  y  $10S^*$ . La estereoquímica en 1, 4, 11 y 12 se asignó por comparación con los compuestos anteriores **24-25**. Así, el dolabellano **26** fue identificado como ( $1R^*, 2E, 4R^*, 8E, 10S^*, 11S^*, 12R^*$ )-10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8-dolabelladieno. La búsqueda de esta estructura en las bases de datos especializadas sugiere que **26** es un compuesto con estructura nueva. [22, 23] En la tabla 3.1 se encuentra la asignación de todas las señales de RMN.



**Figura 3.6.** Estructura del compuesto nuevo **26** ( $1R^*$ ,  $2E$ ,  $4R^*$ ,  $8E$ ,  $10S^*$ ,  $11S^*$ ,  $12R^*$ ) 10,18-diacetoxi-7-hidroxi-2,8-dolabelladieno. a) Principales correlaciones COSY y HMBC para **26** b) Correlaciones NOE para **26**.

Finalmente, se evaluó la actividad antiviral de tres de los diterpenos aislados, contra el virus VIH-1 III<sub>B</sub> -cepa del virus de mayor incidencia en Colombia y de mayor abundancia en la región de Suramérica-, en concentraciones de 25, 12.5 y 6.25  $\mu\text{M}$  (Figura 3.7), usando como control positivo la Nevirapina. De esta manera se pudo calcular el valor de la  $\text{EC}_{50}$  para cada compuesto (Tabla 3.2). Así se pudo establecer que los compuestos **24** y **25**, que presentan un patrón de insaturación 2,8(17), muestran una actividad antiviral mayor que el compuesto **20**, con un patrón de insaturación 2,6; por lo anterior, parece ser que este doble enlace ejerce efectos en la actividad biológica. En cualquier caso los buenos valores de actividad antiviral ( $\text{EC}_{50}$ ) de estos dolabellanos hacen que ellos puedan ser considerados como compuestos promisorios en el campo del desarrollo de antivirales. Vale la pena resaltar que en estudios anteriores se demostraba que al deacetilar este tipo de compuestos, la actividad antiviral aumentaba de manera considerable, por lo cual, teniendo en cuenta que los compuestos nuevos son diacetilados, se cree que si se deacetilan su actividad antiviral será aún más significativa, pero las bajas cantidades en que los recuperamos no nos permitieron hacer este ensayo. Finalmente, y con el fin de evaluar su seguridad, se probó su toxicidad frente a células MT-2 a concentraciones de 500, 250 y 50  $\mu\text{M}$  (Figura 3.8), encontrando que estos compuestos son inocuos para estas células, confirmando así su potencial como antivirales.

### % Inhibición contra VIH-1

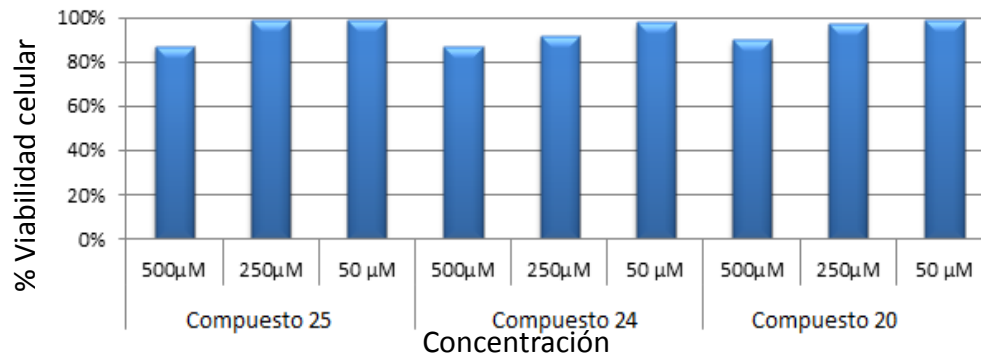


**Figura 3.7** Evaluación de la actividad antiviral de los compuestos 20, 24 y 25 aislados de *D. pfaffii*.

**Tabla 3.2** Valores de actividad antiviral y citotoxicidad de compuestos 20, 24 y 25 aislados de *D. pfaffii* y Nevirapina.

Compuesto	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	CC <sub>50</sub>
20	6.16 μM	-	1.135 mM
24	2.9 μM	34 μM	1.345 mM
25	4.1 μM	49 μM	1.456 mM
Nevirapina	0.25 μM	2.2 μM	325 μM

### % Viabilidad celular



**Figura 3.8** Evaluación de citotoxicidad de los compuestos 20, 24 y 25 aislados de *D. pfaffii*.

A manera de conclusión, puede decirse que el estudio químico del alga *Dictyota pfaflfii* realizado en esta tesis de maestría permitió la identificación y caracterización de seis compuestos tipo dolabellano (**18-20**, **24-26**). Dos reportados anteriormente en esta alga (**18 y 19**), tres compuestos nuevos (**24-26**) y un compuesto que se encuentra reportado en la literatura científica, pero es nuevo para esta especie (**20**).

La evaluación como antivirales de los compuestos **20**, **24** y **25** aislados de *Dictyota pfaflfii*, muestra que estos presentan actividad potente contra el VIH-1 III<sub>B</sub> (EC<sub>50</sub> 6.16, 2.9 y 4.1 µM, respectivamente).

## BIBLIOGRAFIA

1. World-HealthOrganization-WHO Informe sobre la respuesta mundial al VIH/SIDA <http://www.who.int/hiv/es/> (Mayo 23 de 2013),
2. United-Nations-AIDS La epidemia mundial de SIDA- ONUSIDA [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/factsheet/2009/20091124\\_fs\\_global\\_es.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/dataimport/pub/factsheet/2009/20091124_fs_global_es.pdf) (Febrero 20 de 2013),
3. Snyder, S.; D'Argenio, D. Z.; Weislow, O.; Bilello, J. A.; Drusano, G. L., The Triple Combination Indinavir-Zidovudine-Lamivudine Is Highly Synergistic. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2000**, 44, (4), 1051-1058.
4. Rodríguez, M. A.; Jarrin, I.; del Amo, J.; Iribarren, J. A.; Moreno, S.; Viciano, P. P., A.; Sirvent, J. L.; Vidal, F.; Lacruz, J.; Gutierrez, F.; Oteo, J. A.; Asencio, R.; Castilla, J.; Hoyos, S. P., Delay in the Initiation of HAART, Poorer Virological Response, and Higher Mortality among HIV-Infected Injecting Drug Users in Spain. *AIDS Research and Human Retroviruses* **2006**, 22, (8), 715-723.
5. Zhang, Z.; Walker, M.; Xu, W.; Shim, J. H.; Girardet, J.-L.; Hamatake, R. K.; Hong, Z., Novel Nonnucleoside Inhibitors That Select Nucleoside Inhibitor Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2006**, 50, (8), 2772-2781.
6. Ayyad, S.-E. N.; Makki, M. S.; Al-kayal, N. S.; Basaif, S. A.; El-Foty, K. O.; Asiri, A. M.; Alarif, W. M.; Badria, F. A., Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, (1), 175-182.
7. Barbosa, J. P.; Pereira, R. C.; Abrantes, J. L.; Cirne dos Santos, C. C.; Rebello, M. A.; Frugulhetti, I. C.; Teixeira, V. L., In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota pfaflfii*. *Planta medica* **2004**, 70, (9), 856-60.
8. Pereira, H. S.; Leão-Ferreira, L. R.; Moussatché, N.; Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; Costa, L. J.; Diaz, R.; Frugulhetti, I. C. P. P., Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* **2004**, 64, (1), 69-76.
9. Cirne-Santos, C. C.; Teixeira, V. L.; Castello-Branco, L. R.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota pfaflfii*. *Planta medica* **2006**, 72, (4), 295-9.
10. Cirne-Santos, C. C.; Souza, T. M.; Teixeira, V. L.; Fontes, C. F.; Rebello, M. A.; Castello-Branco, L. R.; Abreu, C. M.; Tanuri, A.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., The dolabellane diterpene Dolabelladienetriol is a typical noncompetitive

- inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. *Antiviral Research* **2008**, *77*, (1), 64-71.
11. In the news. *Nature Reviews Microbiology* **2007**, *5*, (3), 172-173.
  12. Cirne-Santos, C. C.; Teixeira, V. L.; Castello-Branco, L. R.; Frugulhetti, I. C. P. P.; Bou-Habib, D. C., Inhibition of HIV-1 Replication in Human Primary Cells by a Dolabellane Diterpene Isolated from the Marine Algae *Dictyota pfaaffii*. *Planta medica* **2006**, *72*, (EFirst), 295-299.
  13. Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A., International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacological Reviews* **2003**, *55*, (4), 597-606.
  14. El Gamal, A. A., Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2010**, *18*, (1), 1-25.
  15. Afolayan, A. F.; Mann, M. G.; Lategan, C. A.; Smith, P. J.; Bolton, J. J.; Beukes, D. R., Antiplasmodial halogenated monoterpenes from the marine red alga *Plocamium cornutum*. *Phytochemistry* **2009**, *70*, (5), 597-600.
  16. Crews, P.; Rodriguez, J.; Jaspars, M., *Organic Structure analysis*. . 2nd ed.; Oxford University: 2010; p 152.
  17. Ireland, C.; Faulkner, D. J., Diterpenes from *Dolabella californica*. *J Org Chem* **1977**, *42*, (19), 3157-62.
  18. Ando, M.; Arai, K.; Kikuchi, K.; Isogai, K., Synthetic Studies of Sesquiterpenes with a cis-Fused Decalin System, 4. Synthesis of (+)-5 $\beta$ H-Eudesma-3,11-diene, (-)-5 $\beta$ H-Eudesmane-4 $\beta$ ,11-diol, and (+)-5 $\beta$ H-Eudesmane-4 $\alpha$ ,11-diol, and Structure Revision of a Natural Eudesmane-4,11-diol Isolated from *Pluchea arguta*. *Journal of Natural Products* **1994**, *57*, (9), 1189-1199.
  19. Mahato, S. B.; Kundu, A. P., <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features. *Phytochemistry* **1994**, *37*, (6), 1517-1575.
  20. Barbosa, J. P.; Teixeira, V. L.; Villaça, R.; Pereira, R. C.; Abrantes, J. L.; Frugulhetti, I. C. P. d. P., A dolabellane diterpene from the Brazilian brown alga *Dictyota pfaaffii*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2003**, *31*, (12), 1451-1453.
  21. Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J., Tablas para la elucidación de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Alhambra: España, 1980.
  22. ACS Base de datos Scifinder. <https://scifinder.cas.org> (15 de Febrero de 2013),
  23. Canterbury, U. Base de datos Antimarin. <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml> (15 de Febrero de 2013),
  24. Lu, Q.; Faulkner, D. J., Three dolabellanes and a macrolide from the sponge *Dysidea* sp. from Palau. *J Nat Prod* **1998**, *61*, (9), 1096-100.



## 4. SEMISÍNTESIS DE DOLABELLANOS OXIGENADOS CON ACTIVIDAD ANTI VIH-1 *IN VITRO* MEJORADA

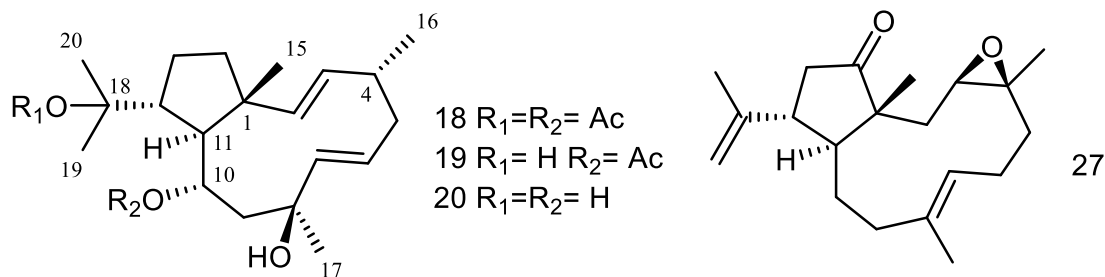
### Resumen

El octocoral caribeño *Eunicea laciniata* es un organismo productor con una gran variedad de dolabellanos, siendo los mayoritarios (1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*)13-ceto-dolabela-3,7,12(18)-trieno (**28**) y  $\beta$ -Araneosene (**29**), los cuales poseen una baja actividad antiviral frente al virus del VIH-1, y una baja citotoxicidad frente a la línea celular MT-2. Así, en este trabajo, aprovechando que **28** se puede aislar a nivel de multigramos se realizaron modificaciones estructurales como reducciones al carbonilo (compuestos **30** y **31**); epoxidaciones (compuesto **32**), apertura de epóxidos (compuesto **33**), y oxidaciones alilícas (compuesto **34**) buscando mejorar la actividad antiviral, dado que los dolabellanos oxigenados han mostrado una fuerte actividad anti-VIH-1, como lo han mostrado los dolabellanos oxigenados aislados de algas del género *Dictyota*. Estas modificaciones estructurales lograron aumentar significativamente la actividad antiviral del precursor, hasta en 100 veces, siendo los compuestos **32** y **34** los más activos frente al VIH-1 ( $EC_{90} < 2.9\mu\text{M}$ ). Su alta actividad antiviral y baja toxicidad frente a células MT-2 hacen de los compuestos **32** y **34** unas moléculas promisorias para el desarrollo de medicamentos antivirales.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

A partir de organismos marinos se han aislado una gran cantidad de compuestos con actividad antiviral, incluyendo la espongosina y espongouridina que inspiraron el desarrollo del AZT, uno de los medicamentos estrella en el tratamiento del SIDA, así como de otros antivirales.[1-3] Dentro de los compuestos con actividad antiviral aislados de fuentes naturales se destacan los dolabellanos, que son diterpenos bicíclicos presentes tanto en plantas como en el reino animal. La mayoría de los dolabellanos aislados de plantas provienen de algas marinas, mientras que en el reino animal las fuentes predominantes han sido los invertebrados marinos (moluscos y celenterados).[4] Hasta el momento, se han aislado e identificado más de 160 dolabellanos,[4, 5] muchos de los cuales poseen actividades farmacológicas potentes, entre las que se destacan la actividad citotóxica, antibacterial, antifúngica, antimalárica, moluscosida y antiviral.[6-10]

Las algas pardas del género *Dictyota* son una de las fuentes más reconocidas de dolabellanos en el mundo marino.[11, 12] Por ejemplo, a partir de *Dictyota dichotoma*, recolectada cerca a la isla de Sicilia (Italia), se aisló el epóxido **27** (Figura 4.1) que mostró actividad antibacterial frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas;[12] y, así mismo mostró poseer una fuerte actividad antiviral frente al virus de la influenza en ensayos *in vitro*. [13] De otro lado, los dolabellanos **18** y **19** (Figura 4.1) fueron aislados del alga parda *Dictyota paffii* recolectada en Atol das Rocas (Brasil); mientras el compuesto **20** (Figura 4.1) fue obtenido por deacetilación de **18**. Estos tres dolabellanos oxigenados (**18-20**) fueron activos frente al Virus del Herpes Simplex-1 (VHS-1), con una EC<sub>50</sub> de 185, 189 y 184  $\mu$ M respectivamente [11]. Adicionalmente, el compuesto **20** mostró una potente actividad antiviral frente al VIH-1, afectando la transcriptasa reversa de éste e inhibiendo la morfogénesis del virus, es decir, actúa en dos de las etapas de la replicación viral, al inicio y al final del proceso de infección.[14]



**Figura** ¡Error! No hay texto con el estilo especificado en el documento. **4.1.** Dolabellanos con actividad antiviral aislados de *D. dichotoma* (compuesto **27**) y *D. paffii* (Compuestos **18-20**).

Estudios *in silico* mostraron la afinidad del compuesto **20** por el extremo hidrofóbico p66 de la transcriptasa reversa del VIH-1 en una región llamada "non-nucleoside inhibitor binding pocket".[15] Estudios posteriores confirmaron experimentalmente que **20** es un inhibidor no competitivo de la transcriptasa reversa del virus.[16] Su propiedad de inhibir la transcriptasa reversa e impedir la replicación del VIH-1, una vez este está en el interior de la célula, ha animado a proponer a este compuesto como principio activo en la formulación de un gel microbicida, que se usa antes de la relación sexual.[17]

Con lo anterior, es claro que los productos naturales marinos y sus derivados semisintéticos han resultado efectivos en la búsqueda de nuevos medicamentos antivirales. Así, en esta parte del trabajo se pretendió sintetizar nuevos derivados de dolabellanos con actividad antiviral incrementada, para lo cual nos valimos del dolabellano mayoritario **28**, (figura 4.2) aislado en nuestro grupo de investigación a partir del octocoral *Eunicea laciniata*,[18] buscando la introducción de grupos oxigenados que parecen aumentar su actividad antiviral.[11, 13, 19]

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono fueron registrados en un equipo Varian VNMRS de 500 MHz, y en un Bruker Avance de 400 MHz usando cloroformo deuterado al 99.5% Merck. La rotación óptica se tomó en un equipo Polartronic E, Schmidt+Haensch, empleando una celda de 5 cm de longitud. La cromatografía en columna (CC) se realizó sobre sílica gel tipo 60 (70-230 MESH ASTM, Merck). Los solventes empleados fueron calidad R.A. (Reactivo Analítico) de Merck. Los solventes diclorometano y acetato de etilo, usados para síntesis, se secaron sobre sodio metálico y cloruro de calcio respectivamente, los cuales se destilaron antes de iniciar la reacción. Los reactivos utilizados fueron hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio de sodio, 70% p/p en tolueno (Alpha Aesar), m-CPBA, al 70% (Alpha Aesar), óxido de selenio (IV) 99% (Alpha Aesar) y *tert*-BuOOH, *tert*-butil hidroperóxido al 70% en agua (Alpha Aesar).

### 4.2.1. OBTENCIÓN DE DOLABELLANOS MAYORITARIOS DE *Eunicea laciniata* COMO COMPUESTOS DE PARTIDA PARA LAS SEMISÍNTESIS

Los dolabellanos mayoritarios **28** y **29** fueron obtenidos en 2010 a partir del gorgonáceo *Eunicea laciniata*, recolectado en Santa Marta.[18] Brevemente, el animal seco se extrajo con cloroformo-metanol (1:1) y el extracto se purificó por CC sobre sílica gel empleando un gradiente discontinuo de polaridad (benceno, acetato de etilo, metanol). De la fracción menos polar se aislaron tanto el compuesto mayoritario **28** (3,2 g) como el compuesto **29** (0,2 g). (Figura 4.2) Los dos compuestos fueron identificados por técnicas espectroscópicas EM, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , y experimentos bidimensionales.

(1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*)13-ceto-dolabela-3,7,12(18)-trieno (Compuesto **28**): Se aisló como un aceite amarillo.  $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$  (*c* 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ). **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta_{\text{H}}$  5.24 (1H, dd  $J=11.6, 4.5$  Hz, H-7), 4.93 (1H, bd  $J=10.3$  Hz, H-3), 2.83 (1H, bd  $J=12.1$  Hz, H-11), 2.38 (1H, d  $J=18.4$  Hz, H-14a), 2.32 (1H, m, H-6b), 2.28 (1H, m, H-5b), 2.25 (1H, m, H-3), 2.22 (3H, s, H-20), 2.15 (1H, d  $J=18.5$  Hz, H-14b), 2.15 (1H, m, H-2), 2.13 (1H, dd  $J=11.4; 9.6$  Hz, H-9), 2.11 (1H, m, H-6a), 2.10 (1H, m, H-5a), 1.83 (3H, s, H-19), 1.64 (3H, s, H-16), 1.63 (1H, m, H-10b) 1.60 (1H, dd  $J=11.7; 6.3$  Hz, H-8), 1.45 (1H, m, H-10a), 1.44 (3H, s, H-17), 1.23 (3H, s, H-15). **RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  207.4 (C, C-13), 148.3 (C, C-18), 138.0 (C,

C-12), 135.7 (C, C-8), 131.7 (C, C-4), 130.3 (CH, C-3), 124.8 (CH, C-7), 54.8 (CH<sub>2</sub>, C-14), 41.6 (CH, C-11), 41.0 (C, C-1), 40.2 (CH<sub>2</sub>, C-9), 39.8 (CH<sub>2</sub>, C-28), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C-5), 28.0 (CH<sub>2</sub>, C-10), 24.5 (CH<sub>3</sub>, C-19), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-6), 23.2 (CH<sub>3</sub>, C-15), 21.4 (CH<sub>3</sub>, C-20), 16.1 (CH<sub>3</sub>, C-16), 15.5 (CH<sub>3</sub>, C-17). **EM-IE** (70eV), *m/z* (Int. Rel.): 286 [M]<sup>+</sup> (21) (C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O); 271 [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (21); 203 [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup> (17); 163 [M-C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>]<sup>+</sup> (17); 150 [M-C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>]<sup>+</sup> (83); 136 [M-C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>]<sup>+</sup> (40); 107 [M-C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O]<sup>+</sup> (45); 93 [M-C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>O]<sup>+</sup> (40); 41 [M-C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>O]<sup>+</sup> (100). Estos datos se encuentran de acuerdo a los reportados por Corey y Kania en la síntesis total de este compuesto. [20]

$\beta$ -Araneoseno (compuesto **29**): Se aisló como un aceite incoloro.  $[\alpha]^{20}_D = -32^\circ$  (*c* 0,6, CHCl<sub>3</sub>). **RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  4,89 (1H, br d *J*=10,1 Hz, H-3), 5,24 (1H, dd *J*=10,7, 4,9 Hz, H-7), 1,64 (3H, s, H-16), 1,61 (3H, s, H-20), 1,44 (3H, s, H-17), 1,59 (3H, s, H-19), 1,12 (3H, s, H-15). **RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  (ppm): 142.5 (C, C-12), 134.8 (C, C-8), 132.5 (C, C-4), 129.3 (CH, C-3), 126.0 (CH, C-7), 122.0 (C, C-18), 48.4 (C, C-1), 42.0 (CH, C-11), 40.3 (CH<sub>2</sub>, C-9), 40.0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 38.7 (CH<sub>2</sub>, C-14), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C-5), 28.3 (CH<sub>2</sub>, C-13), 27.9 (CH<sub>2</sub>, C-10), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-6), 23.6 (CH<sub>3</sub>, C-15), 21.7 (CH<sub>3</sub>, C-19), 21.3 (CH<sub>3</sub>, C-20), 16.3 (CH<sub>3</sub>, C-16), 15.3 (CH<sub>3</sub>, C-17). **EM-IE** (70 eV), *m/z* (Int. Rel.): 272 [M]<sup>+</sup> (14) (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>); 229 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup> (30); 216 [M-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup> (34); 189 [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup> (40); 161 [M-C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>]<sup>+</sup> (45); 136 [M-C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>]<sup>+</sup> (70); 121 [M-C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>]<sup>+</sup> (90); 107 [M-C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>]<sup>+</sup> (65); 93 [M-C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>]<sup>+</sup> (60); 41 [M-C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>]<sup>+</sup> (100). Los datos espectroscópicos concuerdan con los reportados por Kingbury y Corey en la síntesis total de este compuesto. [21]

#### 4.2.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Los ensayos de actividad antiviral se llevaron a cabo en la Fundación Oswaldo Cruz (Río de Janeiro, Brasil) de acuerdo a la metodología establecida por Cirne-Dos Santos & Frugulhetti y colaboradores en 2006 [11, 22, 23] que se describe a continuación:

### Células y virus:

Las células y virus utilizados para el ensayo antiviral y citotóxico fueron: Células de linaje MT-2, resuspendidas en medio RPMI 1640 (LGC Bio, Sao Paulo) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT). El virus del VIH-1 III<sub>B</sub> (tropismo CXCR4-X4, subtipo B) usado para infectar las células, fue preparado en células MT-2 activado con PHA y almacenado a -70°C.

### Determinación de la viabilidad celular:

El siguiente ensayo pretende evaluar la citotoxicidad de los compuestos puros, frente a las líneas celulares MT-2 utilizando un método colorimétrico, porque un compuesto con potencial antiviral no debe ser citotóxico frente a células humanas. La viabilidad celular fue evaluada mediante el método del bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma).

Linfocitos MT-2 ( $2 \times 10^6$  cel/100 $\mu$ l/pozo) cultivados en medio RPMI 1640 y suplementados con SFB 10% fueron colocados en placas de 96 pozos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos puros diluidos en DMSO 5% durante 4 a 5 días. Al final de este periodo, la actividad celular fue determinada por colorimetría mediante la adición de 20 $\mu$ L de solución de MTT a 5mg/mL. Luego de 4 horas de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> se adicionaron 100 $\mu$ L de SDS 10% en HCl 0,01N. Tras 24 horas, las placas fueron analizadas en un lector de ELISA a 540 y 620nm. Los resultados fueron analizados comparando la absorbancia de los pozos tratados con los controles. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

### Ensayo antiviral, determinación de la actividad antiviral:

Para determinar la actividad anti VIH-1, se monitoreó la aparición de sincicios en células MT-2 por observación en microscopio, así como el efecto del virus citopático por un método colorimétrico (MTT, Sigma).

Los linfocitos MT-2 ( $2 \times 10^6$  cel/100 $\mu$ l/pozo) cultivados en medio RPMI 1640 suplementados con SFB 10%, fueron colocados en placas de 96 pozos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e infectadas con el virus VIH-1 III<sub>B</sub> (5 a 10ng de suspensión viral por 2 horas), posteriormente estas células

fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos puros, e incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2 a 3 días. Al final de este periodo se realizaron las observaciones en el microscopio y se determinó el efecto citopático por colorimetría mediante la adición de 20µL de solución de MTT a 5mg/mL. Luego de 4 horas de incubación a 37°C se adicionaron 100 µL de SDS 10% en HCl 0,01N. Tras 24 horas las placas fueron analizadas en un lector de ELISA a 540 y 620nm. Los resultados fueron analizados comparando la absorbancia de los pozos tratados con los pozos control. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 4.2.3. OBTENCIÓN DE DERIVADOS SEMISINTÉTICOS

##### 4.2.3.1 Obtención de **30** y **31** por reducción del carbonilo del compuesto **28** [24]

A una solución agitada del **28** (240mg, 0.84mmol) en 6mL de THF seco se agregaron 1.5 equivalentes de una solución de RED-Al (hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio de sodio) a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Tras una hora de reacción, se adicionaron 5mL de una mezcla 1:1 de THF/NaOH<sub>(aq)</sub> 1M para detener la reacción. Luego de 15 minutos, se agregaron 20mL de acetato de etilo y 20mL de agua. La fase orgánica fue lavada utilizando una solución saturada con NaHCO<sub>3(aq)</sub> (2 X15 mL), y finalmente, con una solución salina saturada (Brine). La fase orgánica fue concentrada y secada sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, el residuo fue purificado mediante cromatografía en columna flash, utilizando como fase estacionaria sílica gel y Hex:AcOEt (Hexano:Acetato de etilo) 8:2 como fase móvil, para obtener los compuestos **30** (67 mg, 0.25 mmol, rendimiento 30%) y **31** (55 mg, 0.21 mmol, rendimiento 25%).

(1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*, 13*R*)13-hidroxi-dolabela-3,7,12(18)-trieno (Compuesto **30**): Se aisló como un aceite incoloro.  $[\alpha]^{20}_D = -70^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>) **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta_H$  5.24 (1H, dd  $J=11.0, 5.0$  Hz, H-3), 4.89 (1H, br d  $J=10.0$  Hz, H-7), 4.65 (1H, br d  $J=5.7$  Hz, H-13), 1.82 (3H, br s, H-20), 1.69 (3H, br s H-19), 1.63 (3H, br s, H-17), 1.47 (3H, br s, H-16), 1.10 (3H, br s, H-15). **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta_C$  147.7 (C, C-12), 134.8 (C, C-4), 132.1 (C, C-8), 129.9 (C, C-18), 129.5 (CH, C-7), 125.9 (CH, C-3), 71.7 (CH, C-13), 49.8 (CH<sub>2</sub>, C-14), 47.8 (C, C-1), 42.9 (CH, C-11), 40.0 (CH<sub>2</sub>, C-2), 39.8 (CH<sub>2</sub>, C-9), 38.1 (CH<sub>2</sub>, C-5), 27.9 (CH<sub>2</sub>, C-10), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-6), 23.4 (CH<sub>3</sub>, H-15), 22.1 (CH<sub>3</sub>, C-19), 21.7 (CH<sub>3</sub>, C-20), 16.1 (CH<sub>3</sub>, H-16),

15.4 (CH<sub>3</sub>, C-17). Estos datos corresponden a los reportados por Shin y Fenical para este compuesto.[24]

(1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*, 13*S*)13-hidroxi-dolabela-3,7,12(18)-trieno (Compuesto **31**): Se aisló como un sólido blanco.  $[\alpha]^{20}_D = -165^\circ$  (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>) **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta_H$  5.19 (1H, dd  $J=11.4, 4.6$  Hz, H-3) 4.87 (1H, br d  $J=10.3$  Hz, H-7), 4.65 (1H, dd  $J=5.7, 5.1$  Hz, H-13), 1.80 (3 H, br s, H-20), 1.67 (3H, br s, H-19), 1.63 (3H, br s, H-17), 1.43 (3H, br s H-16), 1.18 (3H, br s, H-15) **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta_C$  145.4 (C, C-12), 135.0 (C, C-4), 132.2 (C, C-8), 129.5 (CH, C-7), 129.2 (C, C-18), 125.6 (CH, C-3), 71.8 (CH, C-13), 51.5 (CH<sub>2</sub>, C-14), 47.8 (C, C-1), 42.0 (CH, C-11), 40.7 (CH<sub>2</sub>, C-2), 39.9 (CH<sub>2</sub>, C-9), 38.2 (CH<sub>2</sub>, C-5), 29.0 (CH<sub>2</sub>, C-10), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C-6), 23.9 (CH<sub>3</sub>, H-15), 22.1 (CH<sub>3</sub>, C-19), 21.7 (CH<sub>3</sub>, C-20), 16.0 (CH<sub>3</sub>, H-16), 15.4 (CH<sub>3</sub>, C-17). Estos datos se encuentran de acuerdo a los reportados para este compuesto por Shin y Fenical.[24]

#### 4.2.3.2 Obtención de **32** por epoxidación del compuesto **28** [25]

A una solución agitada de **28** (270mg, 0.98mmol) en 10mL de DCM seco se agregaron 1.3 equivalentes de m-CPBA (284mg). Después de 2 horas de reacción a temperatura ambiente se agregaron 10mL de H<sub>2</sub>O. La fase de DCM fue lavada con una solución acuosa al 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (2 X 15 mL), luego con una solución acuosa al 5% de NaHCO<sub>3</sub> (2 X 15 mL) y finalmente con una solución salina saturada (Brine). La fase orgánica fue concentrada y secada sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, fue purificada por cromatografía en columna flash sobre sílica gel, usando Hex:AcOEt 7:3 como fase móvil para obtener el compuesto **32** (89 mg, 0.29 mmol, rendimiento 29.4%). Estos datos se encuentran de acuerdo a los reportados para este compuesto por Wei y colaboradores.[25]

(1*R*,11*S*,3*S*,4*S*,7*S*,8*S*) 13-ceto-di-3,4:7,8-epoxi-dolabela-12(18)-eno. (Compuesto **32**): Se aisló como un sólido blanco.  $[\alpha]^{20}_D = +8.4^\circ$  (c 0.04, CHCl<sub>3</sub>) **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  3.04 (1H, dd  $J=11.2, 2.6$  Hz, H-3), 2.94 (1H, d  $J=7.8$  Hz, H-7), 2.80 (1H, d  $J=12.6$  Hz, H-11), 2.42 (1H, d  $J=18.3$  Hz, H-14a), 2.25 (1H, m, H-5a), 2.23 (3H, s, H-20), 2.11 (1H, d  $J=18.3$  Hz, H-14b), 2.10 (1H, m, H-9a), 1.99 (1H, m, H-6a), 1.93 (3H,s, H-19), 1.79 (1H, m, H-6b), 1.77 (1H, m, H-10a), 1.74 (1H, m, H-2a), 1.56 (1H, m, H-10b), 1.42 (3H, s, H-17), 1.41 (1H, m, H-9b), 1.37 (1H, m, H-5b), 1.34 (1H, m, H-2-b), 1.32(3H, s, H-15), 1.20 (3H, s, H-16).



**RMN  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  205.6 (C, C-13), 149.7 (C, C-18), 137.2 (C, C-12), 63.9 (CH, C-7), 63.2 (CH, C-3), 60.7 (C, C-8), 60.5 (C, C-4), 54.9 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 43.1 (CH, C-11), 40.4 ( $\text{CH}_2$ , C-2), 38.0 (C, C-1), 37.4 ( $\text{CH}_2$ , C-5), 36.8 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 28.0 ( $\text{CH}_2$ , C-10) 25.4 ( $\text{CH}_3$ , C-19), 23.7 ( $\text{CH}_3$  C-15), 23.5 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 21.8 ( $\text{CH}_3$ , C-20), 17.7 ( $\text{CH}_3$ , C-17), 15.7 ( $\text{CH}_2$ , C-16).

#### 4.2.3.3 Obtención de **33** por apertura del epóxido **32** [26]

El epóxido **32** (60mg, 0.22mmol) fue disuelto en agua acidificada con HCl 0.5M (6mL) manteniendo agitación constante y una temperatura de 60°C por 3 días. Luego, esta mezcla fue extraída con AcOEt, y la fase orgánica fue lavada con una solución salina saturada (Brine), posteriormente fue secada sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El residuo orgánico fue purificado usando cromatografía en columna flash utilizando como fase estacionaria sílica gel, y DCM:AcOEt 8:2 como fase móvil para obtener el compuesto **33** (12mg, 0.03mmol, rendimiento 13.6%), que fue identificado como el 13-ceto-3,4,7-trihidroxi-dolabela-8(17),12(18)-dieno (Compuesto **33**).

13-ceto-3,4,7-trihidroxi-dolabela-8(17),12(18)-dieno (Compuesto **33**): Se obtuvo como un acetite incoloro.  $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +8.4^\circ$  ( $c$  0.04,  $\text{CHCl}_3$ ) **RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.18 (s, 1H), 5.02 (s, 1H), 3.70 (d,  $J=4.9$  Hz, 1H), 3.28 (d,  $J=11.4$  Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.77 (d,  $J=7.4$  Hz, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  116.27, 85.04, 72.10, 58.91, 51.37, 44.51, 36.64, 34.12, 29.91, 28.04, 23.53, 22.21, 21.24, 20.29, 14.30

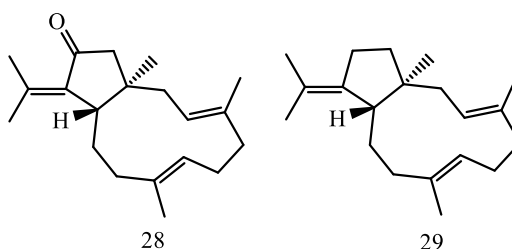
#### 4.2.3.4 Obtención de **34** por oxidación alílica del compuesto **28** [27]

Una mezcla de terbutilhidroperóxido (600 $\mu\text{L}$ , 0.72mmol) con  $\text{SeO}_2$  (4.1mg, 0.036mmol) en 5mL de DCM fue sometida a agitación por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego fue adicionada lentamente una solución del compuesto **28** (100mg, 0.36mmol), y ácido salicílico (9.0mg 0.036mmol), en 1mL de DCM. Al cabo de 2 horas, se agregaron 20mL de acetato de etilo y 20mL de agua para detener la reacción. La fase orgánica fue lavada utilizando una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2 X 15 mL) y finalmente con una solución salina saturada (Brine). El residuo orgánico secado sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro fue purificado mediante cromatografía en columna flash sobre sílica gel usando Hex: AcOEt 7:3 como fase móvil para obtener el compuesto **34** (38 mg, 0.12 mmol, rendimiento 35%).

(1*R*,3*E*,7*E*,11*S*)-13-ceto-16-hidroxi-dolabela-3,7,12(18)-trieno (Compuesto **34**): Sólido Blanco.  $[\alpha]^{20}_D = +6.6^\circ$  (c 0.04, CHCl<sub>3</sub>) **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta_H$  4.29 (d,  $J=11.2$  Hz, 1H), 3.99 (d,  $J=11.2$  Hz, 1H), 2.21 (s,  $J=6.0$  Hz, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.22 (s,  $J=9.4$  Hz, 3H). **RMN <sup>13</sup>C** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_C$  134.9, 125.1, 59.6, 54.7, 41.56, 40.0, 39.6, 28.2, 24.5, 23.8, 23.1, 21.4, 15.5

### 4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

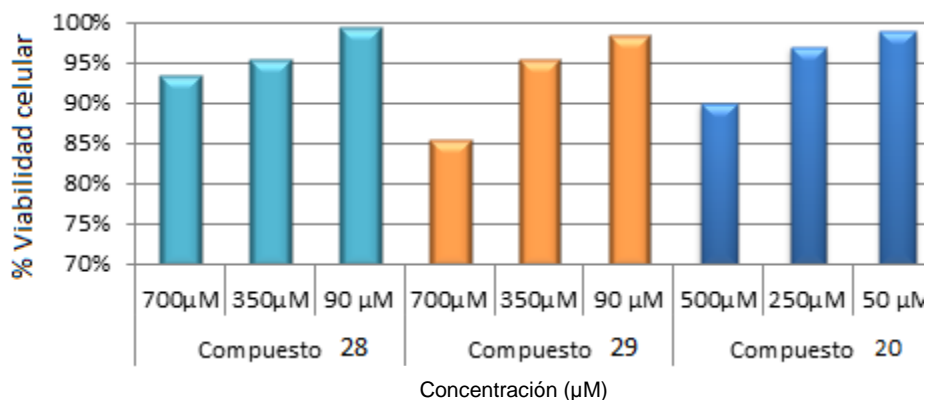
Estudios químicos previos del octocoral *Eunicea laciniata* determinaron que este organismo es fuente de una gran variedad de dolabellanos,[24] algunos de los cuales resultaron activos frente al parásito *Plasmodium falciparum* [25] y otros tienen propiedades como antifoulants; [18] sin embargo, no se les ha determinado el potencial antiviral frente al virus VIH-1, por lo cual se decidió evaluarlo en este trabajo. La comparación de los datos espectroscópicos y del valor de la rotación óptica con los publicados en la literatura permitió identificar a **28** como el (1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*)13-ceto-dolabela-3,7,12(18)-trieno (figura 4.2).[24] Este compuesto fue obtenido por síntesis total por Corey y Kania, lo que permitió establecer la estereoquímica absoluta del compuesto **28** como 1*R* y 11*S* [20]; lo que está en contravía con lo inicialmente publicado por Look y Fenical durante su aislamiento.[28] Lo anterior nos permitió confirmar la estereoquímica absoluta de **28** como 1*R* y 11*S*. Así mismo, la comparación de los datos espectroscópicos y el valor de la rotación óptica permitió identificar al compuesto **29** como el β-Araneoseno, aislado previamente de este mismo organismo [24] y cuya estereoquímica absoluta fue confirmada por síntesis total como 1*S* y 11*S*. [21]



**Figura 4.2.** Dolabellanos **28** y **29** aislados del octocoral *Eunicea laciniata*.

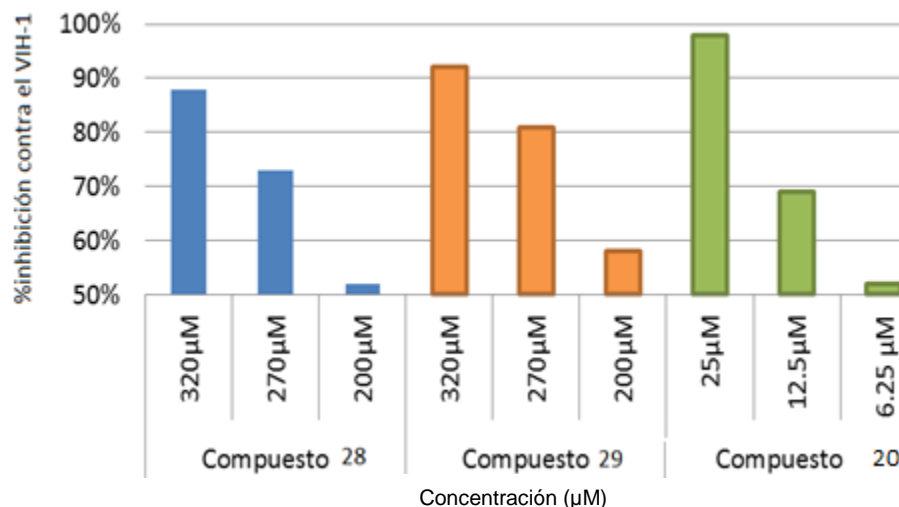
Con los compuestos **28** y **29** purificados se procedió a evaluar su citotoxicidad frente a las líneas celulares MT-2, ya que un compuesto con potencial anti-VIH-1 debe presentar una alta actividad antiviral y una baja toxicidad frente a células humanas. Así, el compuesto **28** presentó una concentración citotóxica 90 CC<sub>90</sub> mayor a 700 μM (figura 4.3), mientras que el compuesto **29** mostró una CC<sub>90</sub> de 530 μM (figura 4.3), lo que indica en ambos casos una muy baja actividad citotóxica. Al comparar estos datos con la citotoxicidad del dolabentriol **20** (CC<sub>90</sub> 500 μM), aislado en este trabajo del alga *D. paffii*, se observa que **29** tiene una toxicidad muy parecida a **20**; mientras **28** es mucho menos tóxico frente a células MT-2 que el compuesto **20**. Este resultado es muy alentador ya que estudios previos de toxicidad

aguda con ratones mostraron que una dosis de 50 mg/kg del compuesto **20** no es letal ni presenta cambios fisiológicos en el ratón,[29] por lo que se esperaría un comportamiento similar para **28** y **29**, es decir, una muy baja toxicidad en ensayos *in vivo*. Así, los compuestos **28** y **29** son buenos candidatos para continuar con las pruebas anti-VIH-1.



**Figura 4.3.** Evaluación de la viabilidad de las células MT-2 tratadas con los compuestos **20**, **28** y **29**

La actividad antiviral de compuestos **28** y **29** (figura 4.4) fue evaluada frente al virus del VIH-1 III<sub>B</sub>, encontrando que los dos tienen una concentración efectiva 90 EC<sub>90</sub> similar, y cercana a 320 µM. Al comparar estos resultados con el valor de EC<sub>90</sub> para **20** (20 µM) y el control positivo la Nevirapina (EC<sub>90</sub> 2.2 µM) se puede afirmar que la actividad antiviral de los dolabellanos naturales **28** y **29** es significativamente menor que la de los dos compuestos de referencia (el triol **20** y la Nevirapina), e incluso se podrían clasificar como no activos frente VIH-1 III<sub>B</sub>, que es la cepa más difundida en los países de Latinoamérica. Ahora bien, aunque la actividad de estos compuestos obtenidos de *E. laciniata* no fuera importante, su baja toxicidad frente a células MT-2, y el hecho de que **28** se puede aislar a nivel de multigramos nos llevó a proponer la realización de modificaciones estructurales sobre **28** para mejorar la actividad antiviral.

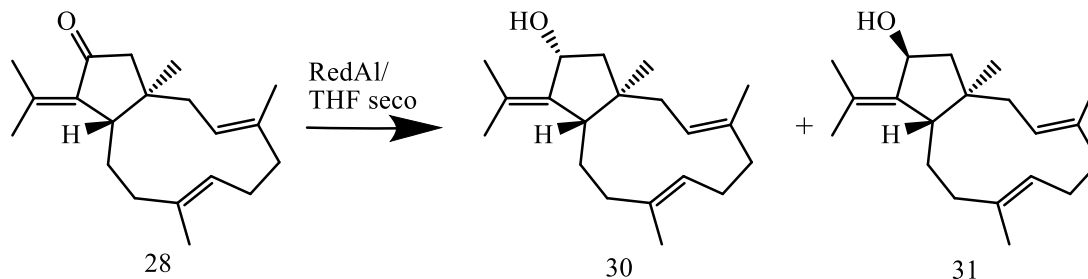


**Figura 4.4.** Evaluación de la actividad antiviral frente a VIH-1 III<sub>B</sub> de los dolabellanos **28** y **29**, aislados del octocoral *E. laciniata*, y del triol **20** aislado del alga *D. pfaflfii*. Se destaca que las concentraciones ensayadas para **28** y **29** son mucho mayores que las ensayadas para **20**.

Para determinar cuáles modificaciones estructurales generarían incremento en la actividad antiviral, se analizaron los resultados antivirales obtenidos para los dolabellanos aislados de algas del género *Dictyota*. Encontrando que dolabellanos con función epóxido, como el compuesto **27**, poseen una fuerte actividad antiviral frente al virus de la influenza en ensayos *in vitro*. [13] Del mismo modo, la serie de compuestos **18-20**, que corresponden a compuestos mono, di y tri- hidroxilados respectivamente, obtenidos a partir del alga parda *Dictyota pfaflfii*, resultaron activos frente al Virus del Herpes Simplex-1 (VHS-1), pero solo **20** presentó actividad frente a la transcriptasa reversa del VIH-1, lo que permitió inferir que al aumentar el número de hidroxilos libres en el dolabellano aumenta la actividad frente al virus del VIH-1. Adicionalmente, nuestros datos antivirales demostraron que un dolabellano no oxigenado como **29** es muy poco activo frente al VIH-1 III<sub>B</sub>.

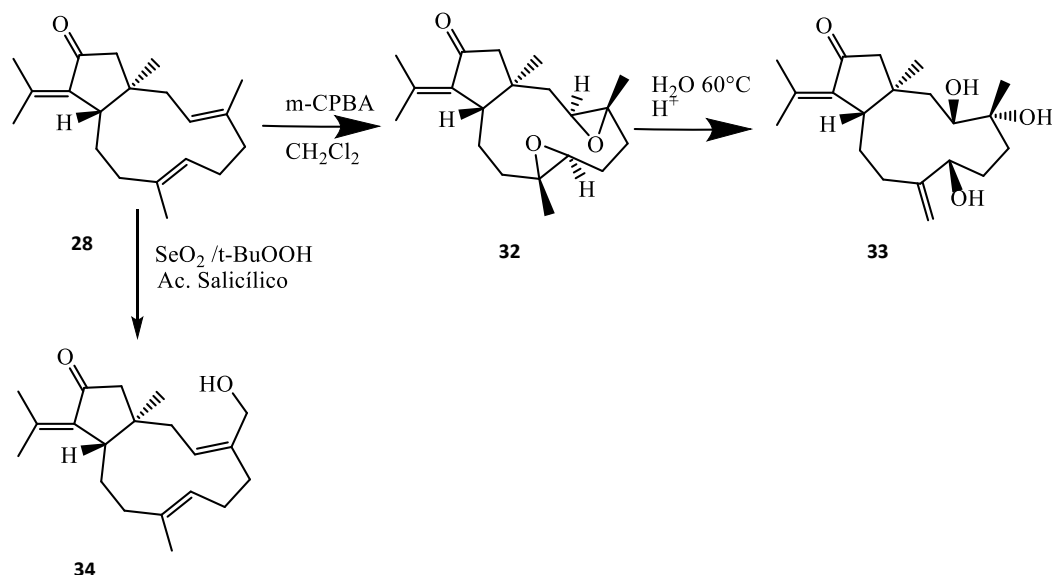
De acuerdo a lo anterior, hay una relación directa entre el grado de oxigenación de un compuesto tipo dolabellano, con su actividad antiviral. Por esta razón se realizaron reacciones como reducciones al carbonilo (compuesto **30** y **31**); epoxidaciones (compuesto **32**), apertura de epóxidos (compuesto **33**), y oxidaciones alílicas (compuesto **34**) buscando incrementar la actividad de **28**. Es importante resaltar que en este trabajo se evaluaron dolabellanos de dos fuentes diferentes, algas (**18**) y octocorales (**28** y **29**) para los cuales se ha reportado que la estereoquímica absoluta en las posiciones 1 y 11 son opuestas, por lo que no necesariamente se deberían obtener compuestos antivirales a partir de los

dolabellanos obtenidos de animales (corales) dada la clara dependencia de la estereoquímica y la actividad biológica, pues en vegetales (algas) es donde nosotros encontramos dicha actividad. [4]



**Figura 4.5.** Reducción del compuesto **28** para obtener **30** y **31**.

La primera reacción realizada fue la reducción del carbonilo de la posición 13 del compuesto **28**, mediante el uso de un reductor como el RED-Al, en condiciones anhidras y atmósfera inerte. De esta reacción se obtuvieron dos compuestos (**30** y **31**). Para el compuesto **30** el espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró la aparición de una nueva señal en  $\delta_{\text{H}}$  4.65 (1H, br d,  $J=5.7$ , H-13) que es típica de protón carbinólico; adicionalmente en los espectros RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 se observan 20 señales, donde se destaca la desaparición de la señal del carbonilo en  $\delta$  207.4, y la aparición de un carbono metino en 71.7. Estas señales sugieren que la reacción de reducción se llevó a cabo con éxito obteniendo el compuesto (1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*, 13*R*) 13-hidroxi-dolabela-7,12(18)-trieno (**30**) reportado anteriormente por Shin y Fenical.[24] De manera análoga se identificó a **31**, epímero de **30** en la posición 13, como el (1*R*, 3*E*, 7*E*, 11*S*, 13*S*) 13-hidroxi-dolabela-7,12(18)-trieno (Compuesto **31**) reportado anteriormente por Shin y Fenical.[24]



**Figura 4.6.** Oxidaciones del compuesto **28** para obtener **32-34**.

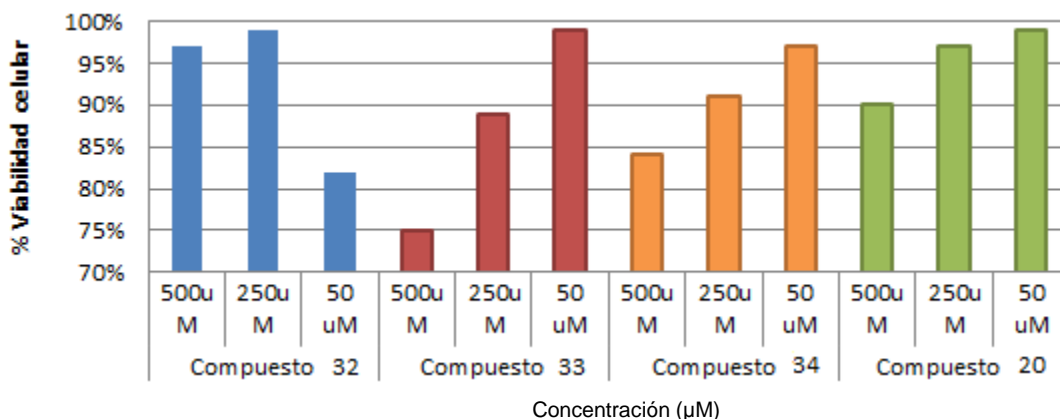
La síntesis del epóxido se llevó a cabo mediante el tratamiento de **28** con *m*-CPBA a temperatura ambiente (figura 4.6). A partir de la reacción se obtuvo el compuesto **32** que en su espectro de RMN <sup>1</sup>H presenta la desaparición de dos señales correspondientes a los hidrógenos olefínicos en  $\delta_H$  5.24 (1H, dd  $J=11.6$ , 4.5 Hz, H-7) y 4.93 (1H, bd  $J=10.3$  Hz, H-3), así mismo se observa la aparición de dos señales en  $\delta_H$  3.04 (1H, dd  $J=11.2$ , 2.6 Hz, H-3) y 2.94 (1H, d  $J=7.8$  Hz, H-7) típicas de hidrógenos en anillo de epóxido (oxirano). En el espectro APT se observan 20 señales; destacándose la desaparición de las cuatro señales entre 135 y 124 ppm (2 metinos y 2 C cuaternarios), correspondientes a los carbonos de las dos insaturaciones de la molécula, y la aparición de 4 señales (2 metinos y 2 C cuaternarios) entre 60 y 64 ppm típicas de carbonos de anillo oxirano. El análisis de estos datos permitió concluir que se obtuvo el compuesto diepoxidado (1*R*,11*S*,3*S*,4*S*,7*S*,8*S*)13-ceto-di-3,4:7,8-epoxi-dolabela-12(18)-eno (**32**). La estereoquímica se asignó por comparación con los datos de este compuesto sintetizado con los reportados para el mismo, durante su aislamiento del octocoral *E. laciniata* por Wei y colaboradores.[25]

La apertura del epóxido se llevó a cabo sometiendo **32** a calentamiento (60°C) en medio acuoso (figura 4.6). En el espectro RMN <sup>1</sup>H de **33** se observa la desaparición de las señales en  $\delta_H$  3.04 (1H, dd  $J=11.2$ , 2.6 Hz, H-3) y 2.94 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-7) que correspondían a los hidrógenos de los anillos de epóxido. Adicionalmente, se observa la aparición de señales de protones olefínicos en  $\delta_H$  5.18 (s, 1H) y 5.02 (s, 1H), que son típicos de un doble enlace exocíclico; así como la aparición de dos señales de protón carbinólico en  $\delta_H$  3.70 (d

$J=4.9$  Hz, 1H) y 3.28 (d  $J=11.4$  Hz, 1H). En el espectro APT se observa desaparición de los dos metinos pertenecientes a los epóxidos en  $\delta_C$  63.9 y 63.2 y la aparición de un metileno olefínico en  $\delta_C$  116.3, y dos metinos carbinólicos en  $\delta_C$  85.0 y 72.1. Estas señales sugieren que efectivamente se obtuvo la apertura de los dos epóxidos, en un caso seguido de una deshidratación en el carbono 8 formando un doble enlace exocíclico con un hidroxilo alílico, mientras en el otro se obtuvo un trasndiol. Lo anterior nos permitió concluir que se obtuvo el 13-ceto-3,4,7-trihidroxi-dolabela-8(17),12(18)-dieno (Compuesto **33**). Un mecanismo tipo  $S_N1$  justificaría la obtención de **33** a partir de **32**, por lo que los centros asimétricos deben ser 1*R*, 3*R*, 4*R*, 7*S* y 11*S*. Es importante resaltar que para esta reacción se obtuvo una mezcla de otros 4 compuestos adicionales, los cuales no fueron analizados por su baja proporción en la mezcla de reacción, y que seguramente corresponde a isómeros de **33**.

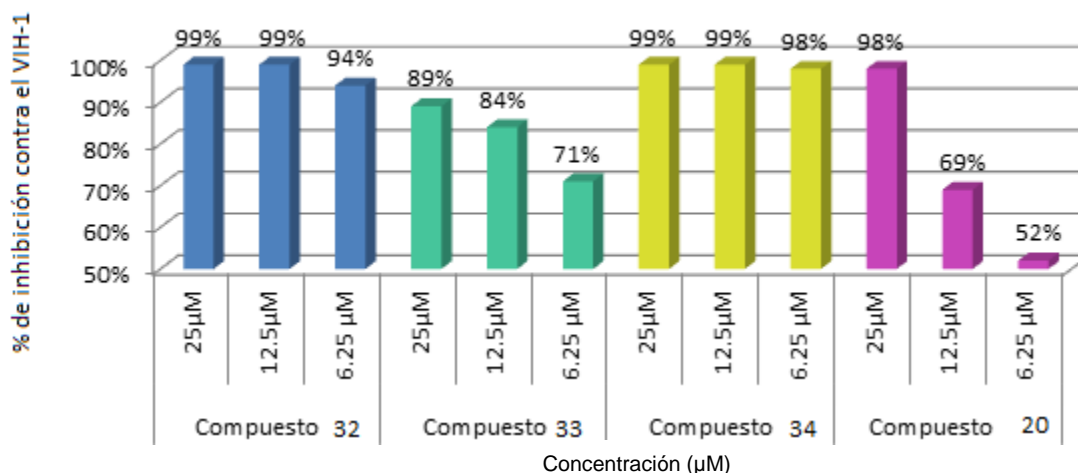
La oxidación alílica se llevó a cabo mediante la oxidación de Riley por tratamiento de **28** con  $SeO_2$ , *t*-BuOOH y ácido salicílico. A partir de este procedimiento se obtuvo el compuesto **34**, un sólido blanco que presentaba en su espectro RMN  $^1H$  la desaparición de la señal del metilo H<sub>3</sub>-16 en  $\delta_H$  1.64 (3H, s, H-16) y la aparición de dos señales en  $\delta_H$  4.29 (1H, d  $J=11.2$  Hz, H-16a) y en 3.99 (1H, d  $J=11.2$  Hz, H16b) correspondientes a protones alílicos sobre un carbono oxigenado. Adicionalmente, mediante el espectro de RMN  $^{13}C$  y el experimento DEPT 135 se confirmó la presencia de 20 carbonos, la desaparición de un metilo en  $\delta_C$  16.1 (CH<sub>3</sub>-16) y la aparición de un metileno oxigenado en  $\delta_C$  59.6. Estas señales sugieren que hubo una oxidación alílica en la posición 16 del dolabellano para obtener el (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*)-13-ceto-16-hidroxi-dolabela-3,7,12(18)- trieno (Compuesto **34**).





**Figura 4.7.** Evaluación de la viabilidad celular de los compuestos semisintéticos **32-34** comparados con el dolabentriol **20** aislado del alga *D. paffii*

De manera análoga con los compuestos **28** y **29**, primero se evaluó el efecto de los derivados **32-34**<sup>1</sup> sobre la viabilidad celular de MT-2 y se comparó con los resultados encontrados para el compuestos de referencia el dollabentriol **20**, así para los compuestos **32-34** no se observa toxicidad sobre células MT-2 y son candidatos para los test antivirales. Aunque cabe resaltar que todos los compuestos semisintéticos presentaban una toxicidad mayor que el compuesto natural **28**.



**Figura 4.8.** Evaluación de la actividad antiviral de los semisintéticos **32-34** comparados con el dolabentriol **20** aislado del alga *D. paffii*

<sup>1</sup> Infortunadamente los compuestos **30** y **31** se encontraban descompuestos al momento del ensayo antiviral, por lo que no se presentan los datos de viabilidad e inhibición viral para estos compuestos, sin embargo se planea realizar nuevamente la síntesis y evaluación de estos compuestos.

**Tabla 4.1** Valores de actividad antiviral y citotoxicidad de compuestos **32-34** semisintéticos comparados con el dolabentriol **20** aislado del alga *D. pfaffii*

Compuesto	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	CC <sub>50</sub>
<b>20</b>	6.16 µM	20 µM-	1.135 mM
<b>32</b>	0.73 µM	2.9 µM	1.693 mM
<b>33</b>	3.9 µM	27 µM	920 µM
<b>34</b>	<0.73µM	< 2.9µM	985 µM
<b>Nevirapina</b>	0.25 µM	2.2µM	325 µM

Los resultados antivirales (tabla 4.1) muestran que efectivamente al aumentar la oxigenación aumenta la actividad antiviral. Tanto la presencia de hidroxilos alílicos como epóxidos aumentan la actividad sin llegar a aumentar de manera drástica la toxicidad sobre células MT-2. También es importante resaltar que los compuestos tipo dolabellano aislados de algas, que poseen una configuración absoluta opuesta a la reportada para los octocorales también presentaron una destacada actividad antiviral cuando se le aumenta el patrón de oxigenación.

Este trabajo muestra que estas modificaciones estructurales lograron aumentar significativamente la actividad antiviral hasta 100 veces, siendo los compuestos **32** y **34** los más activos frente al VIH-1. Su alta actividad antiviral y baja toxicidad frente a células MT-2 hacen de estos compuestos promisorias moléculas para el desarrollo de medicamentos antivirales.

## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que se ha encontrado que los dolabellanos oxigenados han mostrado una fuerte actividad anti-VIH-1, se buscó mejorar la actividad antiviral del Compuesto **28** realizando modificaciones estructurales por las cuales se logró la obtención de los Compuestos **30**, **31**, **32**, **33** y **34**. Dichas modificaciones lograron aumentar de manera significativa la actividad antiviral de **28**, encontrándose que **32** y **34** resultan ser compuestos con alto potencial para el desarrollo de medicamentos antivirales dada su alta actividad frente al VIH-1 (EC<sub>90</sub> < 2.9µM) y baja toxicidad frente a la línea celular MT-2.

La ausencia de grupos voluminosos como el acetato en los dolabellanos, así como la presencia de hidroxilos está directamente relacionado con la actividad antiviral de estos.

### Bibliografía

1. Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M., Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl)thymine<sup>1,2</sup>. *The Journal of Organic Chemistry* **1964**, 29, (7), 2076-2078.
2. Privatdegarilhe, M.; De Rudder, J., Effect of 2 arabinose nucleosides on the multiplication of herpes virus and vaccine in cell culture. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* **1964**, 259, 2725-2728.
3. Zhou, X.; Liu, J.; Yang, B.; Lin, X.; Yang, X. W.; Liu, Y., Marine natural products with anti-HIV activities in the last decade. *Current medicinal chemistry* **2013**, 20, (7), 953-73.
4. Rodríguez, A. D.; González, E.; Ramírez, C., The structural chemistry, reactivity, and total synthesis of dolabellane diterpenes. *Tetrahedron* **1998**, 54, (39), 11683-11729.
5. Mulzer, J.; Bach, T.; Bandichhor, R.; Basler, B.; Brandes, S.; Hiersemann, M.; Helmboldt, H.; Nosse, B.; Reiser, O.; Ruijter, E.; Sefkow, E.; Spiegel, A.; Wessjohann, L. A., Natural Product Synthesis I: Targets, Methods, Concepts. In *Topics in Current Chemistry*, Mulzer, J., Ed. Springer: Germany, 2005; pp 78-83.
6. Mori, K.; Iguchi, K.; Yamada, N.; Yamada, Y.; Inouye, Y., Stolonidiol, a new marine diterpenoid with a strong cytotoxic activity from the Japanese soft coral. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, (46), 5673-5676.
7. Iwashima, M.; Matsumoto, Y.; Takenaka, Y.; Iguchi, K.; Yamori, T., New Marine Diterpenoids from the Okinawan Soft Coral *Clavularia koellikeri*. *Journal of Natural Products* **2002**, 65, (10), 1441-1446.
8. Tringali, C.; Oriente, G.; Piattelli, M.; Nicolosi, G., Structure and Conformation of Two New Dolabellane-Based Diterpenes from *Dictyota* Sp. *Journal of Natural Products* **1984**, 47, (4), 615-619.
9. Matsuo, A.; Kamio, K.-i.; Uohama, K.; Yoshida, K.-i.; Connolly, J. D.; Sim, G. A., Dolabellane diterpenoids from the liverwort *Odontoschisma denudatum*. *Phytochemistry* **1988**, 27, (4), 1153-1159.
10. Ayyad, S.-E. N.; Makki, M. S.; Al-kayal, N. S.; Basaif, S. A.; El-Foty, K. O.; Asiri, A. M.; Alarif, W. M.; Badria, F. A., Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, (1), 175-182.
11. Barbosa, J. P.; Pereira, R. C.; Abrantes, J. L.; Cirne dos Santos, C. C.; Rebello, M. A.; Frugulhetti, I. C.; Teixeira, V. L., In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota pfaaffii*. *Planta medica* **2004**, 70, (9), 856-60.
12. Piattelli, M.; Tringali, C.; Neri, P.; Rocco, C., Stereochemistry and Conformation of Dolabellane Diterpenes: An Nmr and Molecular Mechanics Study. *Journal of Natural Products* **1995**, 58, (5), 697-704.
13. Tringali, C., *Modern Methods of Plant Analysis, New Series*. Springer-Verlag: Berlín, 1991; Vol. 12, p 253-254.
14. Cirne-Santos, C. C.; Teixeira, V. L.; Castello-Branco, L. R.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota pfaaffii*. *Planta medica* **2006**, 72, (4), 295-9.

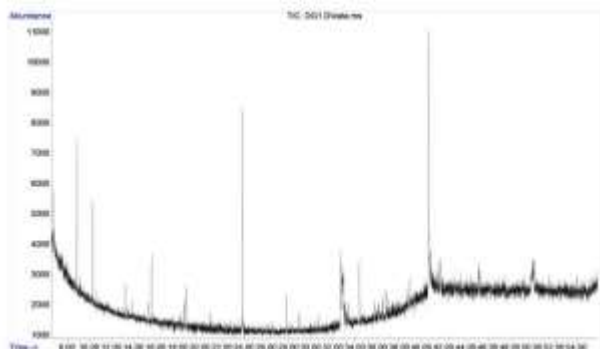
15. Miceli, L. A.; Souza, A. M. T. d.; Rodrigues, C. R.; Paixão, I. C. N. P.; Teixeira, V. L.; Castro, H. C., HIV-1 Reverse Transcriptase: a potential target for marine products. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2012**, *22*, 881-888.
16. Cirne-Santos, C. C.; Souza, T. M.; Teixeira, V. L.; Fontes, C. F.; Rebello, M. A.; Castello-Branco, L. R.; Abreu, C. M.; Tanuri, A.; Frugulhetti, I. C.; Bou-Habib, D. C., The dolabellane diterpene Dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. *Antiviral Research* **2008**, *77*, (1), 64-71.
17. In the news. *Nature Reviews Microbiology* **2007**, *5*, (3), 172-173.
18. Cuadrado, C. T.; Castellanos, L.; Osorno, O. E. O.; Ramos, F. A.; Duque, C.; Puyana, M., Estudio químico y evaluación de la actividad antifouling del octocoral caribeño *Eunicea laciniata*. *Química Nova* **2010**, *33*, 656-661.
19. Abrantes, J. L.; Barbosa, J.; Cavalcanti, D.; Pereira, R. C.; Frederico Fontes, C. L.; Teixeira, V. L.; Moreno Souza, T. L.; Paixao, I. C., The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota paffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. *Planta medica* **2010**, *76*, (4), 339-44.
20. Corey, E. J.; Kania, R. S., First Enantioselective Total Synthesis of a Naturally Occurring Dolabellane. Revision of Absolute Configuration. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, (5), 1229-1230.
21. Kingsbury, J. S.; Corey, E. J., Enantioselective Total Synthesis of Isoedunol and  $\beta$ -Araneosene Featuring Unconventional Strategy and Methodology. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, (40), 13813-13815.
22. Pereira, H. S.; Leão-Ferreira, L. R.; Moussatché, N.; Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; Costa, L. J.; Diaz, R.; Frugulhetti, I. C. P. P., Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* **2004**, *64*, (1), 69-76.
23. Cirne-Santos, C. C.; Teixeira, V. L.; Castello-Branco, L. R.; Frugulhetti, I. C. P. P.; Bou-Habib, D. C., Inhibition of HIV-1 Replication in Human Primary Cells by a Dolabellane Diterpene Isolated from the Marine Algae *Dictyota paffii*. *Planta medica* **2006**, *72*, (EFirst), 295-299.
24. Shin, J.; Fenical, W., Structures and reactivities of new dolabellane diterpenoids from the Caribbean gorgonian *Eunicea laciniata*. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, (10), 3392-3398.
25. Wei, X.; Rodríguez, A. D.; Baran, P.; Raptis, R. G., Dolabellane-Type Diterpenoids with Antiprotozoan Activity from a Southwestern Caribbean Gorgonian Octocoral of the Genus *Eunicea*. *Journal of Natural Products* **2010**, *73*, (5), 925-934.
26. Wang, Z.; Cui, Y.-T.; Xu, Z.-B.; Qu, J., Hot Water-Promoted Ring-Opening of Epoxides and Aziridines by Water and Other Nucleophiles. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, (6), 2270-2274.
27. Umbreit, M. A.; Sharpless, K. B., Allylic oxidation of olefins by catalytic and stoichiometric selenium dioxide with tert-butyl hydroperoxide. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, (16), 5526-5528.
28. Look, S. A.; Fenical, W., New bicyclic diterpenoids from the Caribbean gorgonian octocoral *Eunicea calyculata*. *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, (21), 4129-4134.
29. Garrido, V.; Teixeira, G. A. P. B.; Teixeira, V. L.; Ocampo, P.; Ferreira, W. J.; Cavalcanti, D. N.; Campos, S. M. N.; Pedruzzi, M. d. M. B.; Olaya, P.; Santos, C. C. C. d.; Giongo, V.; Paixão, I. C. P., Evaluation of the acute toxicity of dolabelladienetriol, a potential antiviral from the brown alga *Dictyota paffii*, in BALB/c mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 209-215.

**ANEXOS**

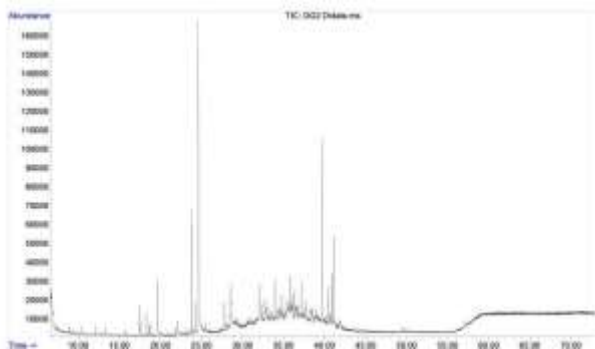
## CAPITULO 2- Cromatogramas ordenados de acuerdo al clado al que pertenecen

### Clado A.

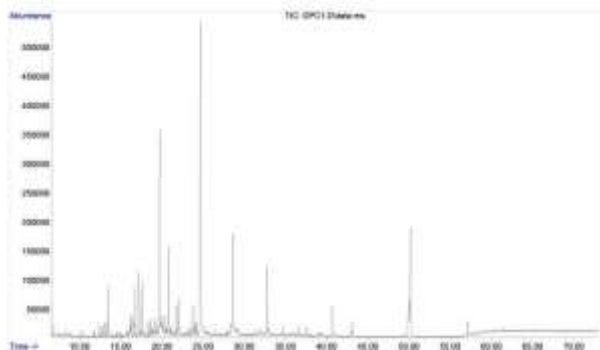
DG1



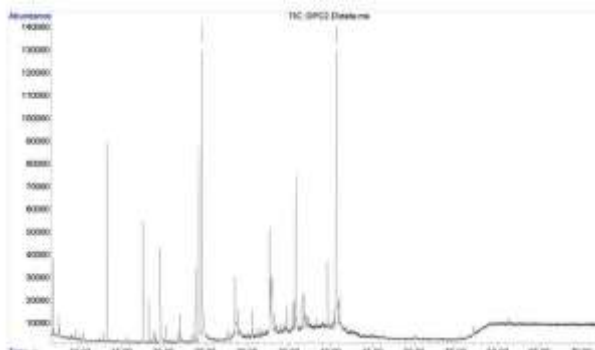
DG2



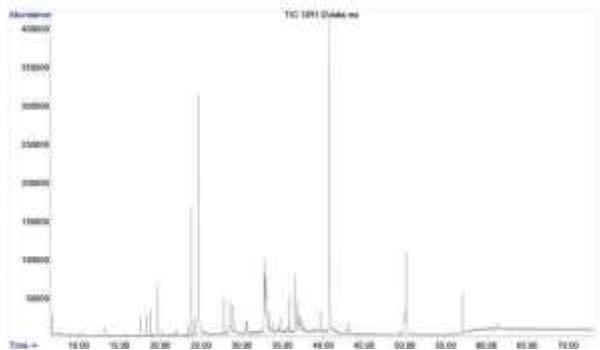
DPC1



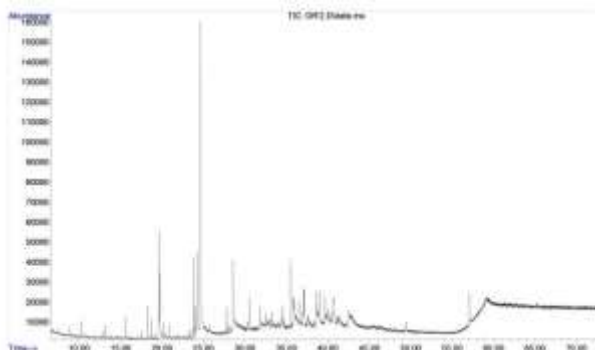
DPC2



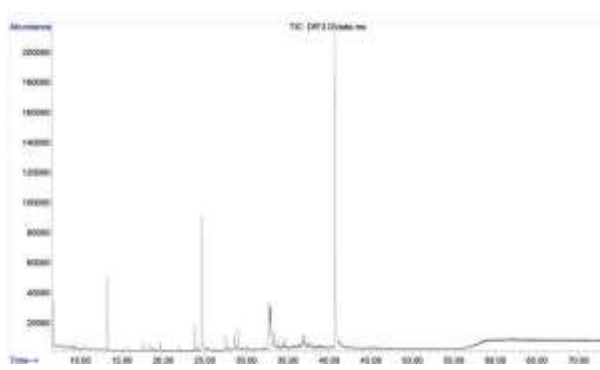
DR'1



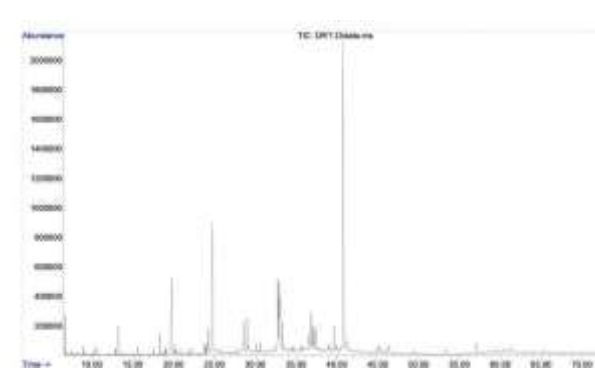
DR'2



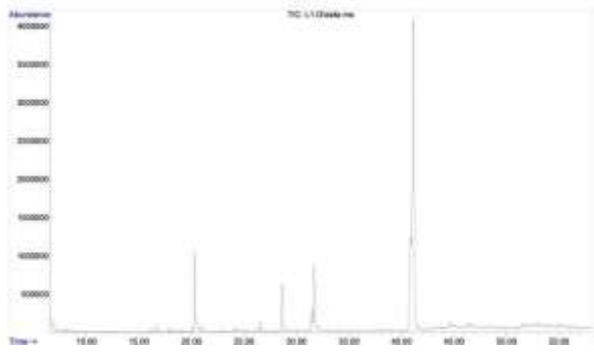
DR'3



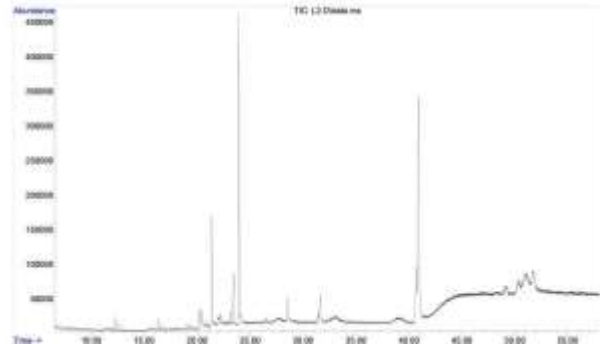
DR1



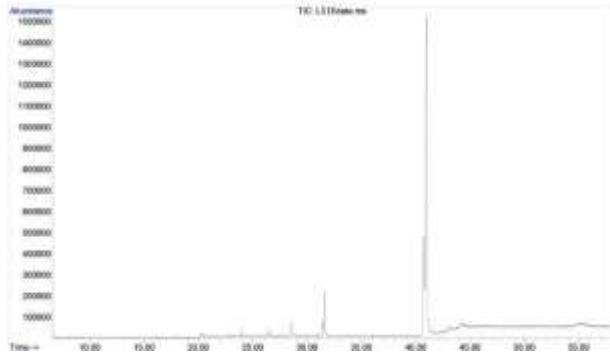
DR8



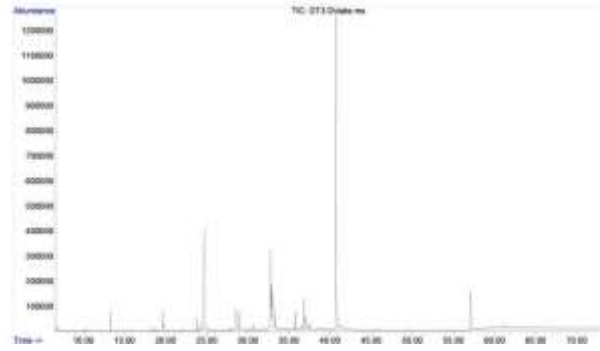
DR9



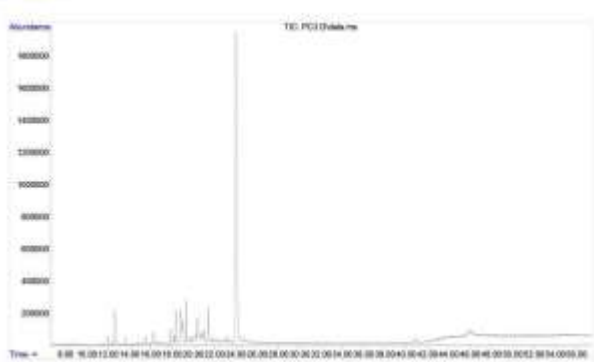
DR10



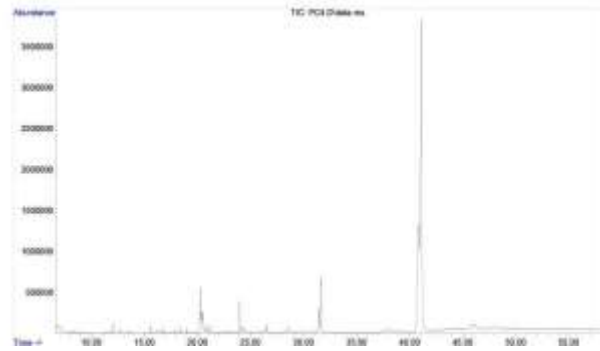
DT3



PC3

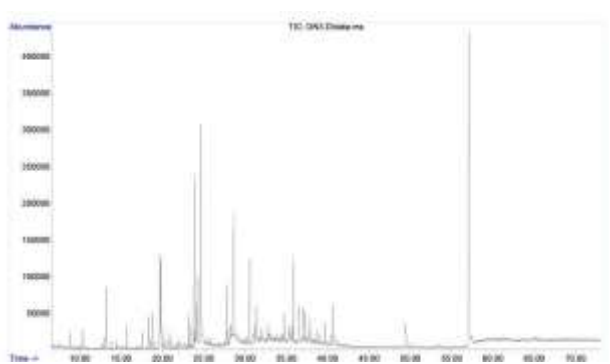


PC4

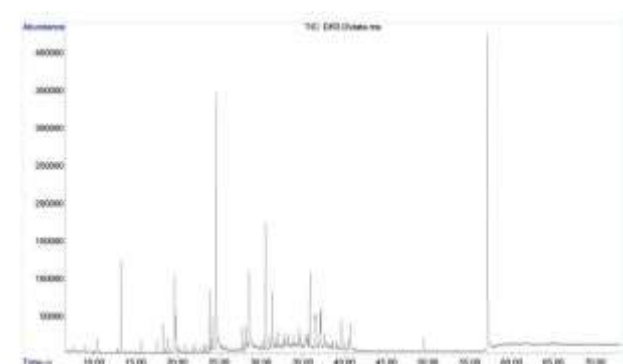


Clado B

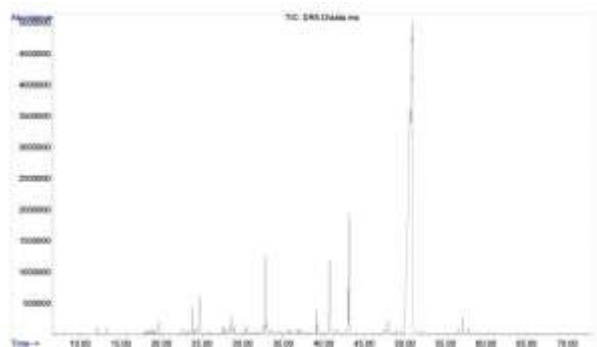
DN3



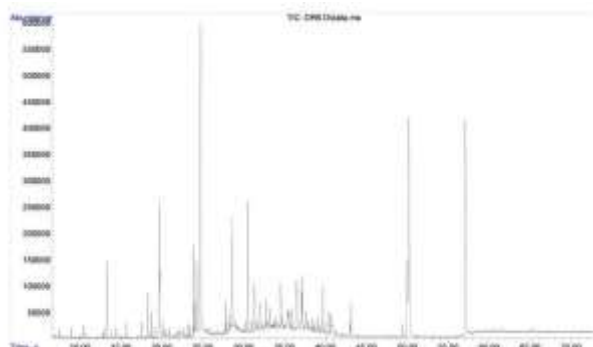
DR3



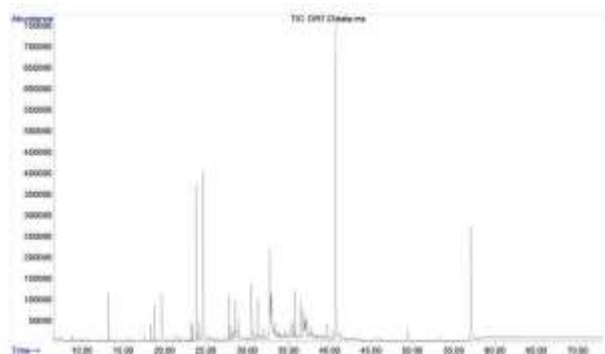
DR5



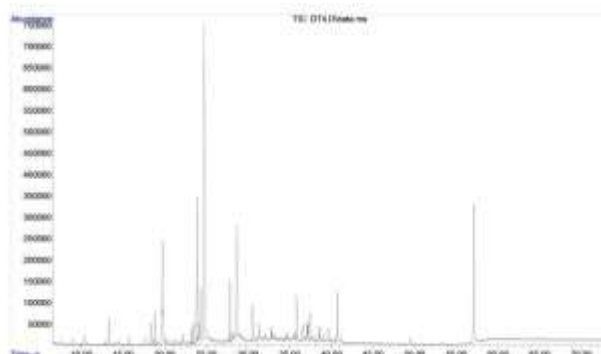
DR6



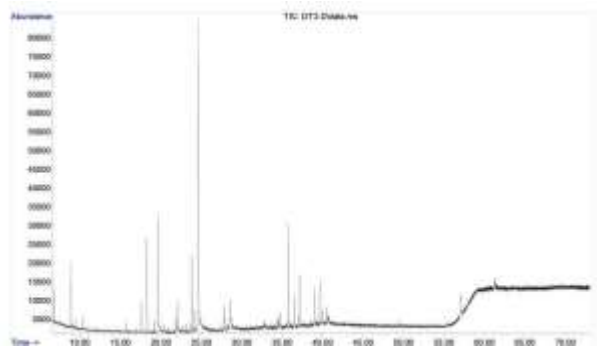
DR7



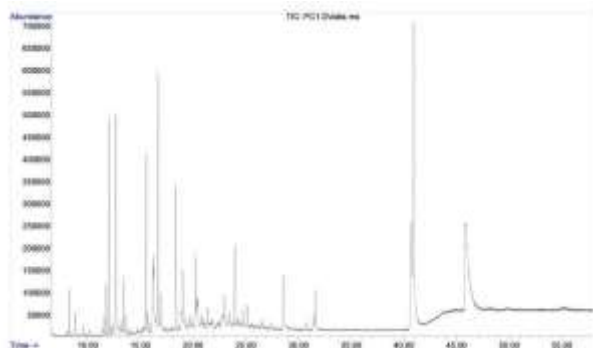
DT4



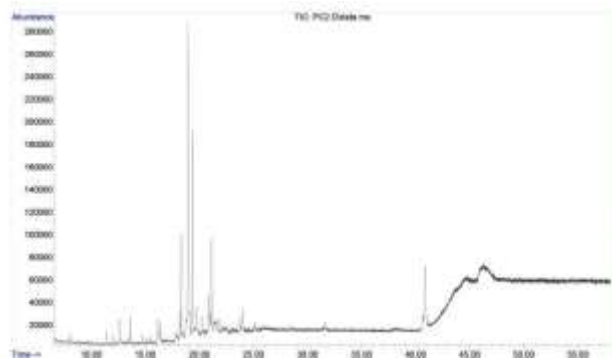
DT'2



PC1



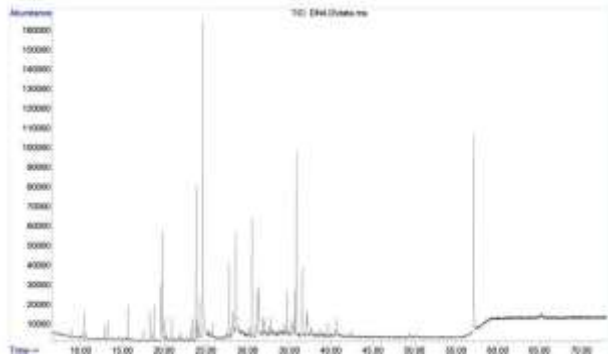
PC2



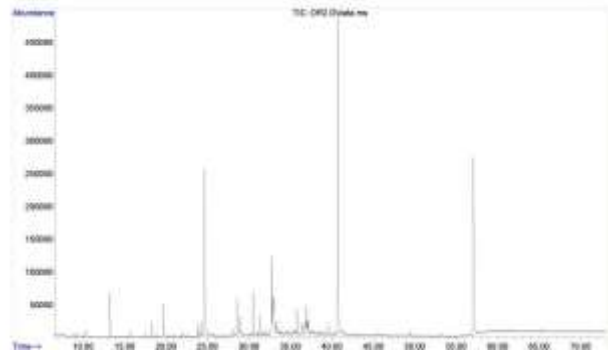


## Clado C.

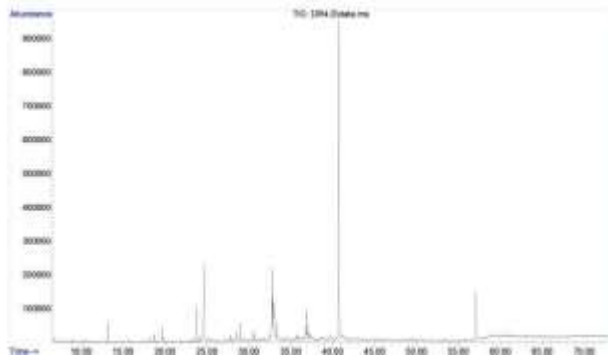
DN4



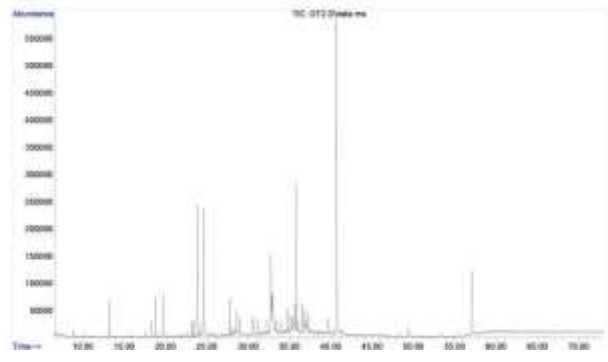
DR2



DR4

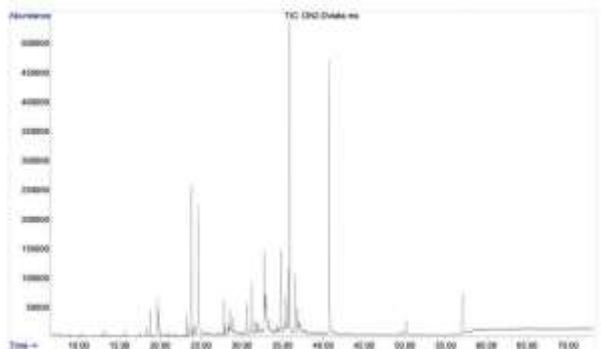


DT2

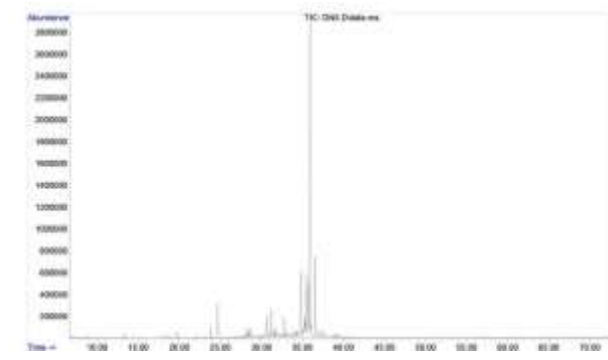


## Clado D.

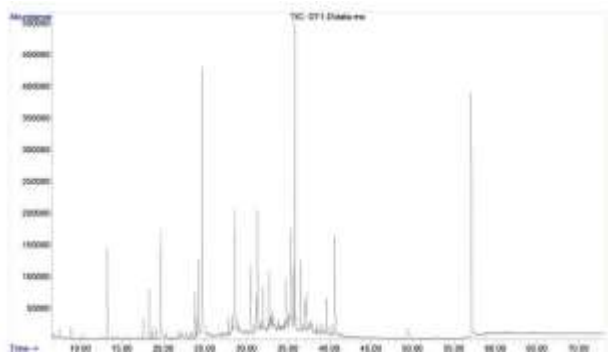
DN2



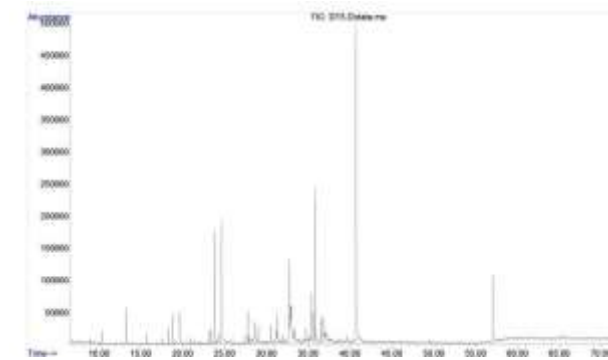
DN5



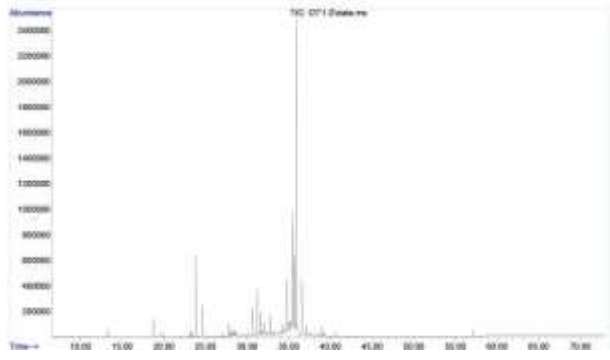
DT1



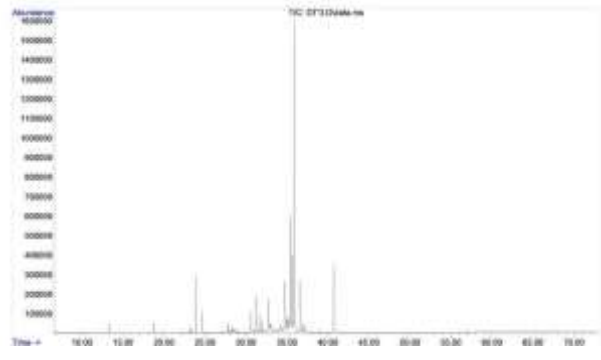
DT5



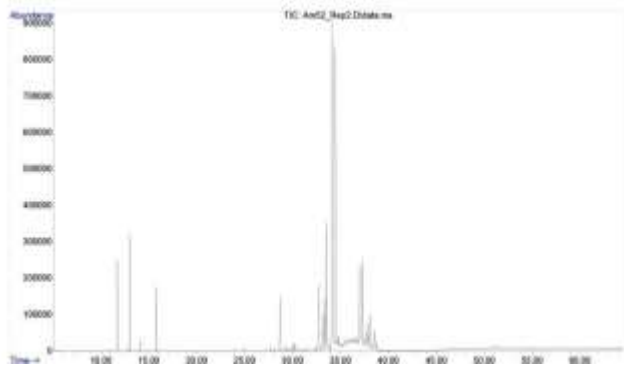
DT'1



DT'3

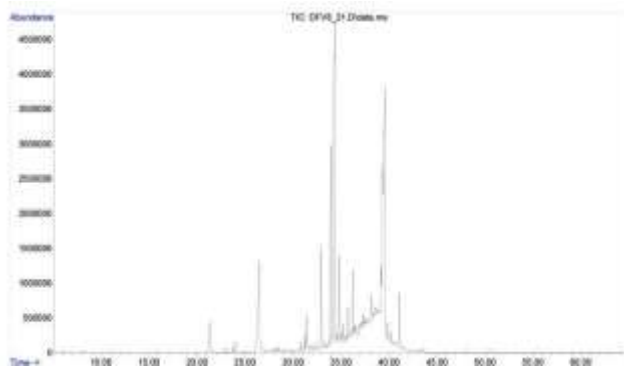


EF1



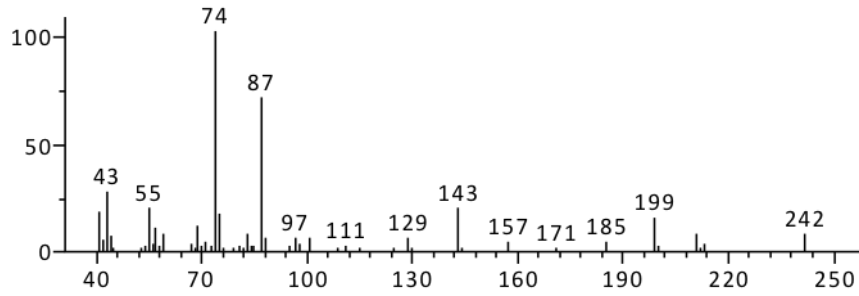
Clado E

ADR1

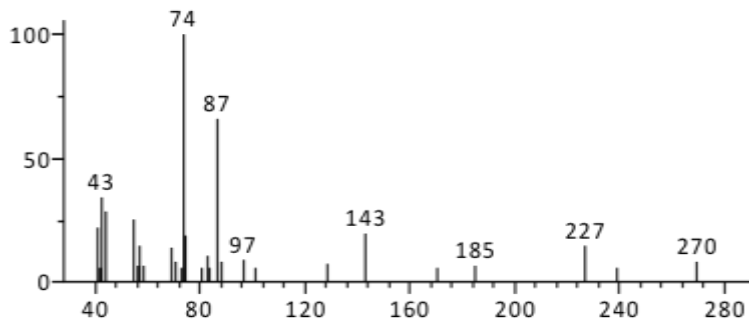


## Espectros de Masas para los compuestos identificados 1-20

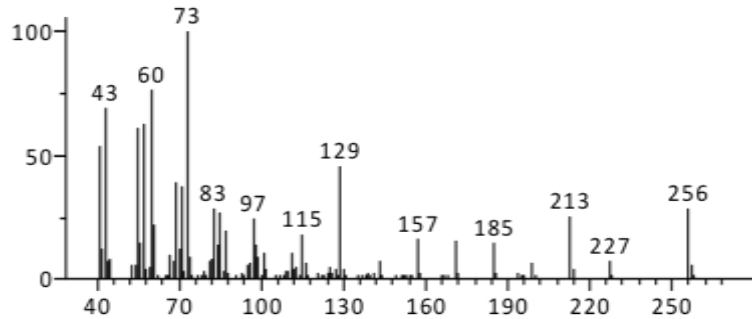
Ester metílico del ácido mirístico (1) 20.75 min (IK 1743):



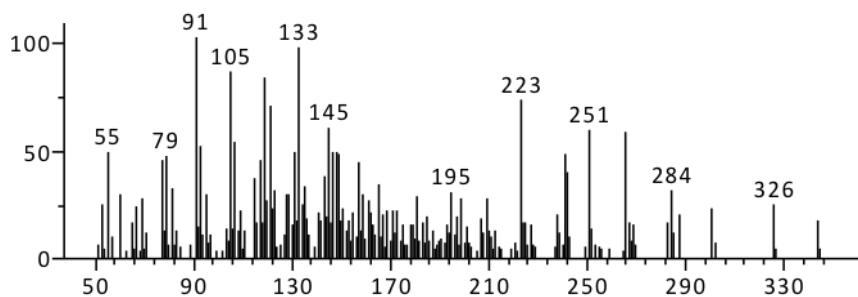
Ester metílico del ácido palmítico (2) 25.79 min (IK 1907):



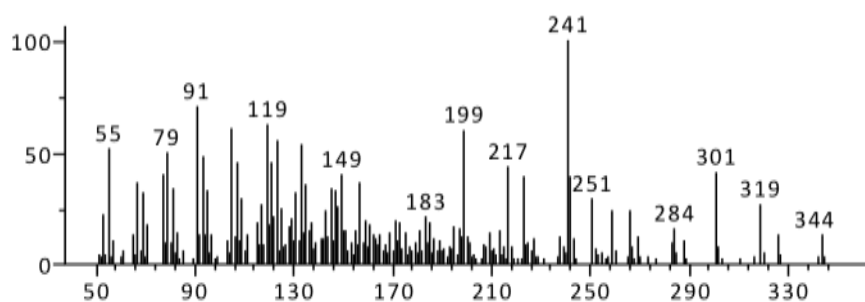
Ácido palmítico (3) 26.59 min (IK 1943):



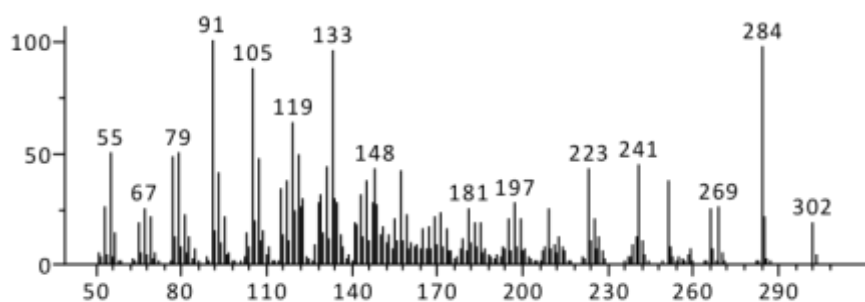
4,9,14-trihidroxi-1,9-dolastadieno (4) 37.40 min (IK 2470)



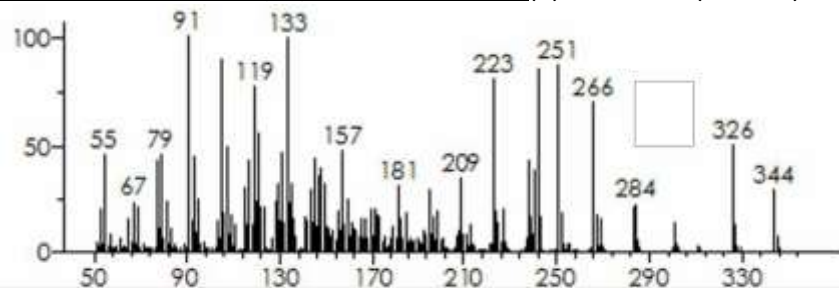
4-acetoxi-9,14-dihidroxi-1,9-dolastadieno (5) 37.92 min (IK 2502):



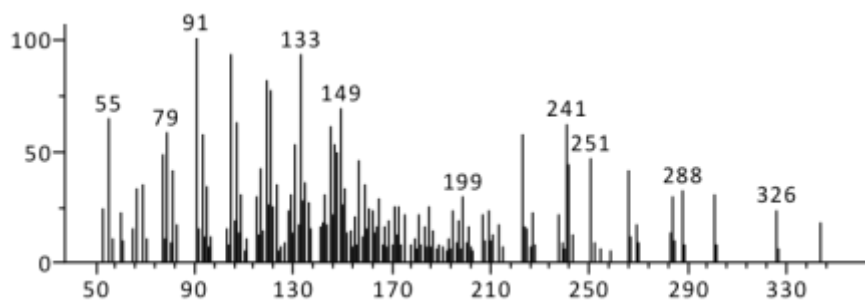
4,14-dihidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (6) 34.18 min (IK 2315):



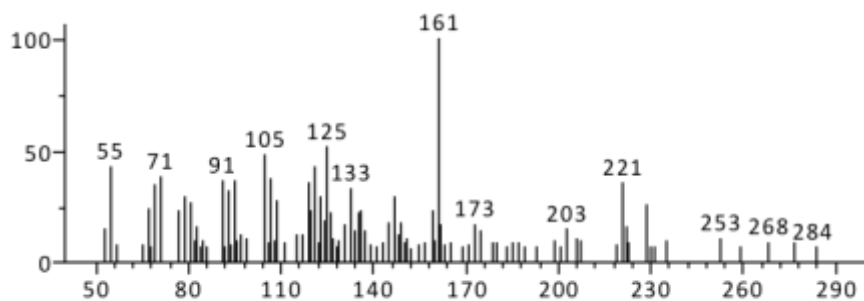
4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-dolastatrieno (7) 34.56 min (IK 2333):



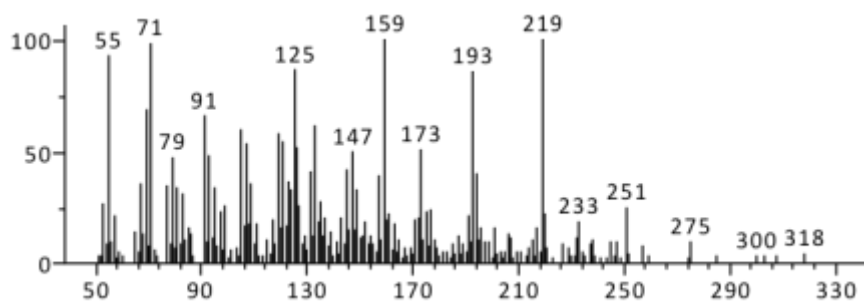
4-7-diacetoxi-14-hidroxi-1,9-dolastadieno (8) 37.26 min (IK 2470):



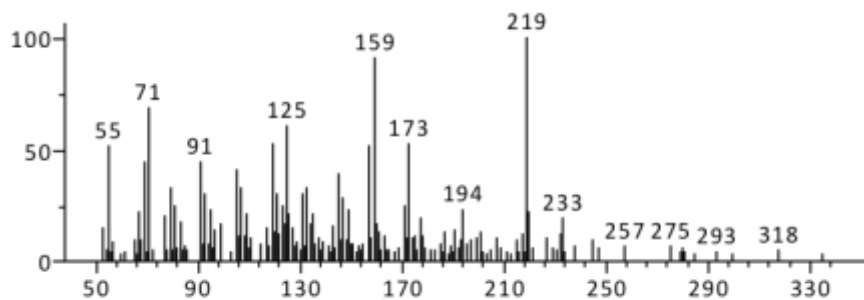
2-deoxy-isolinearol (9) 33.10 min (IK 2270)



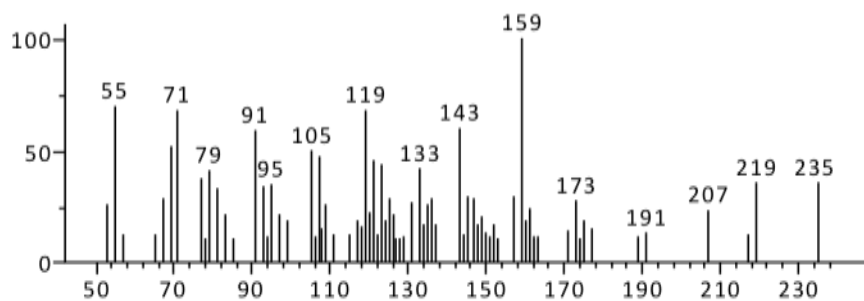
Isolinearol (10) 37.04min (IK 2457)



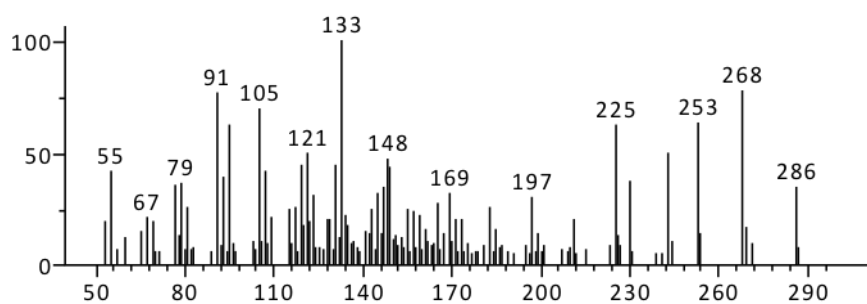
4-acetoxi-isolinearol (11) 38.54min (IK 2534)



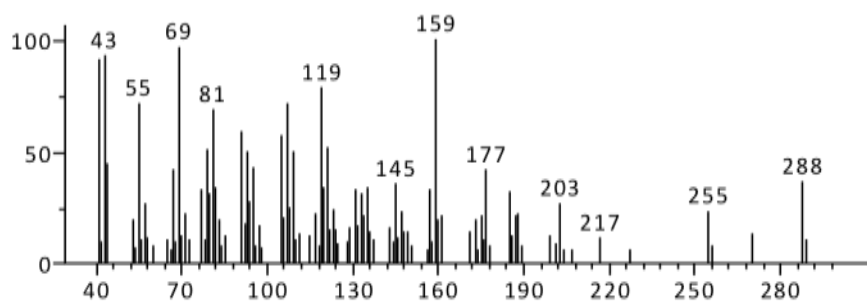
Linearol (12) 38.54min (IK 2534)



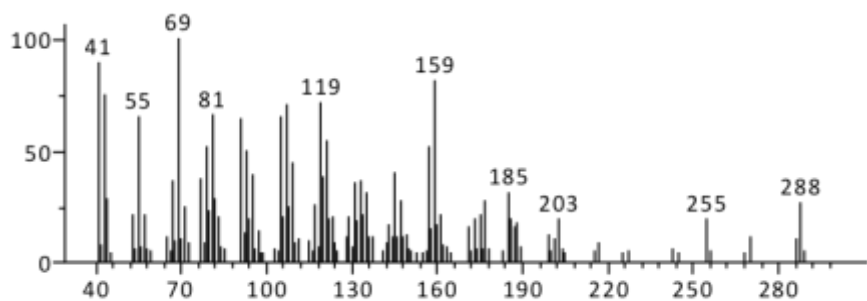
4,14-dihidroxi-1(15),8-dolastadieno (13) 33.20min (IK 2273)



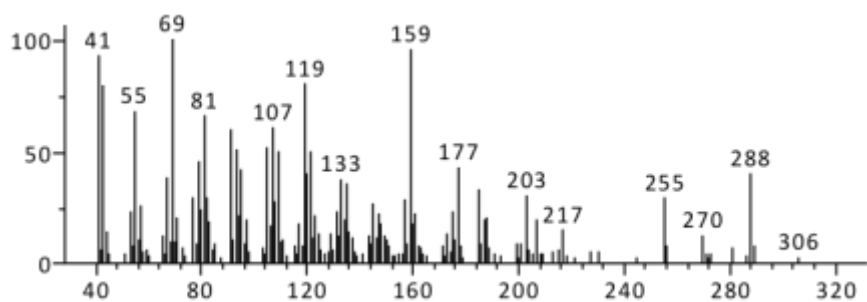
Pachydictyol A (14) 33.31 min (IK 2281):



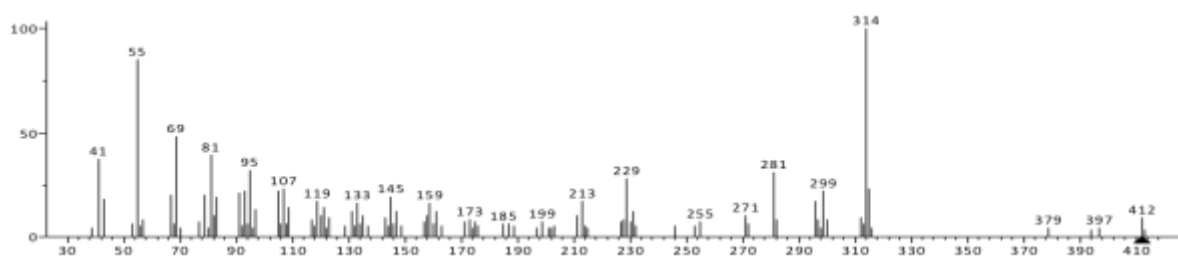
Isopachydictyol A (15) 33.30 min (IK 2282):



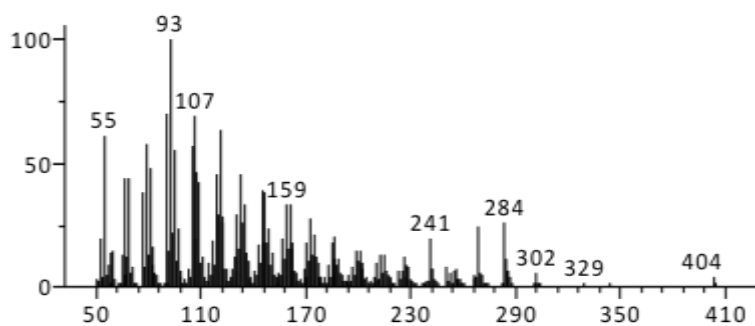
Dictyol C: (16) 35.55min (IK 2386):



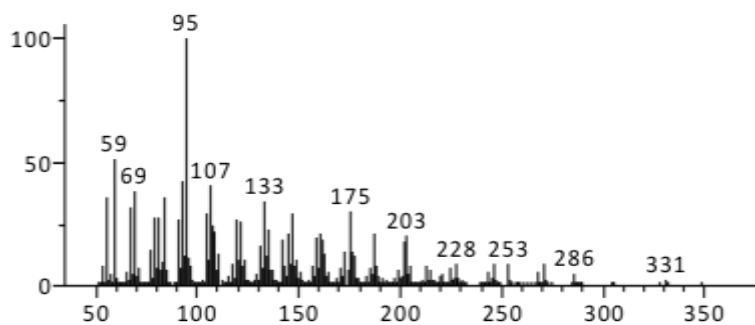
Fucosterol (17) 57.07 min (IK 3598)



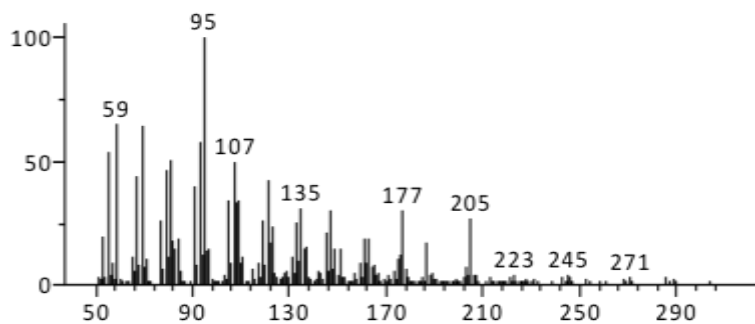
10,18-Diacetoxi-8-hidroxi-2,6-dolabelladieno (18) 37.31 min (IK 2475)



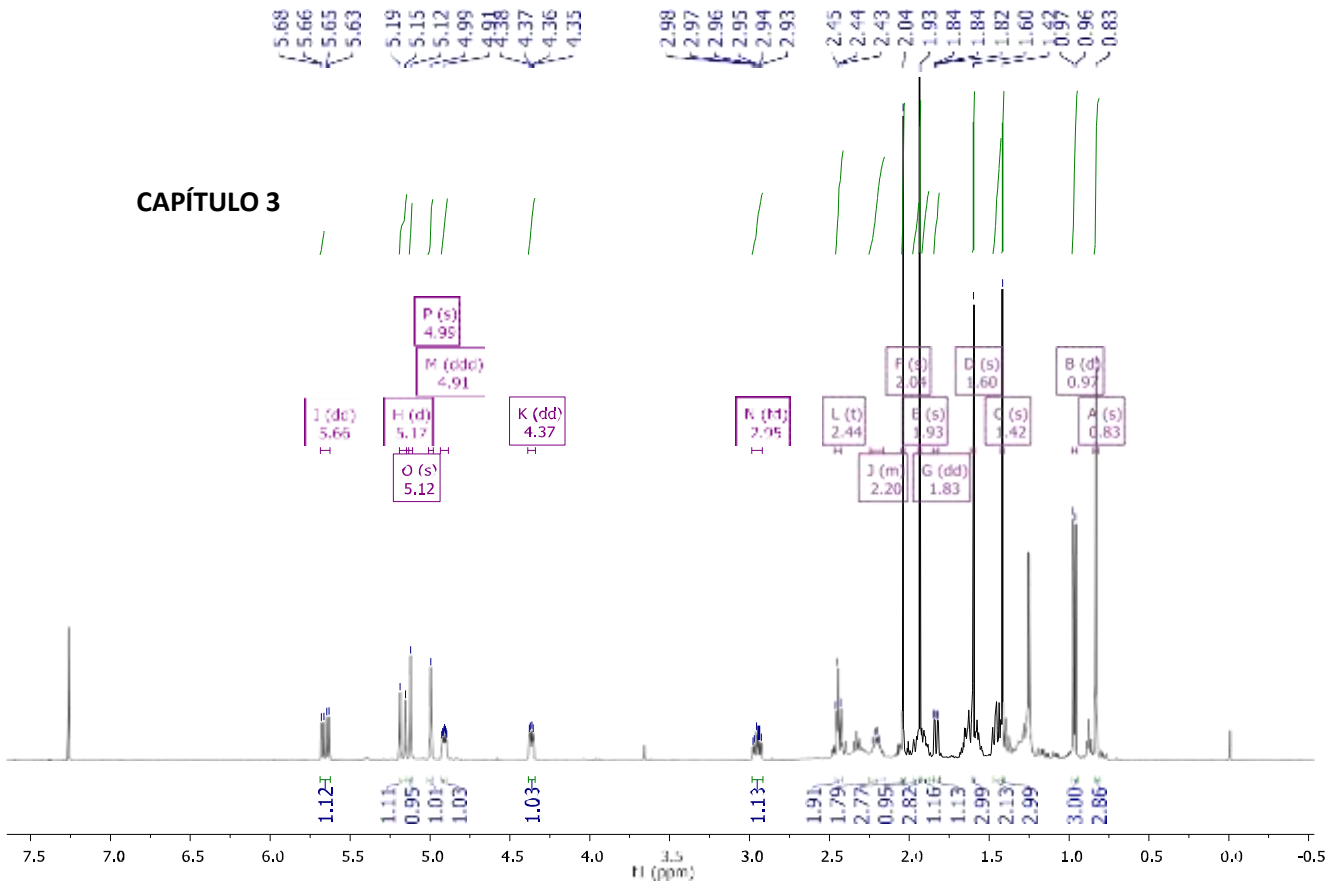
10-Acetoxi-8,18-dihidroxi- 2,6-dolabelladieno (19) 34.06 (IK 2314)



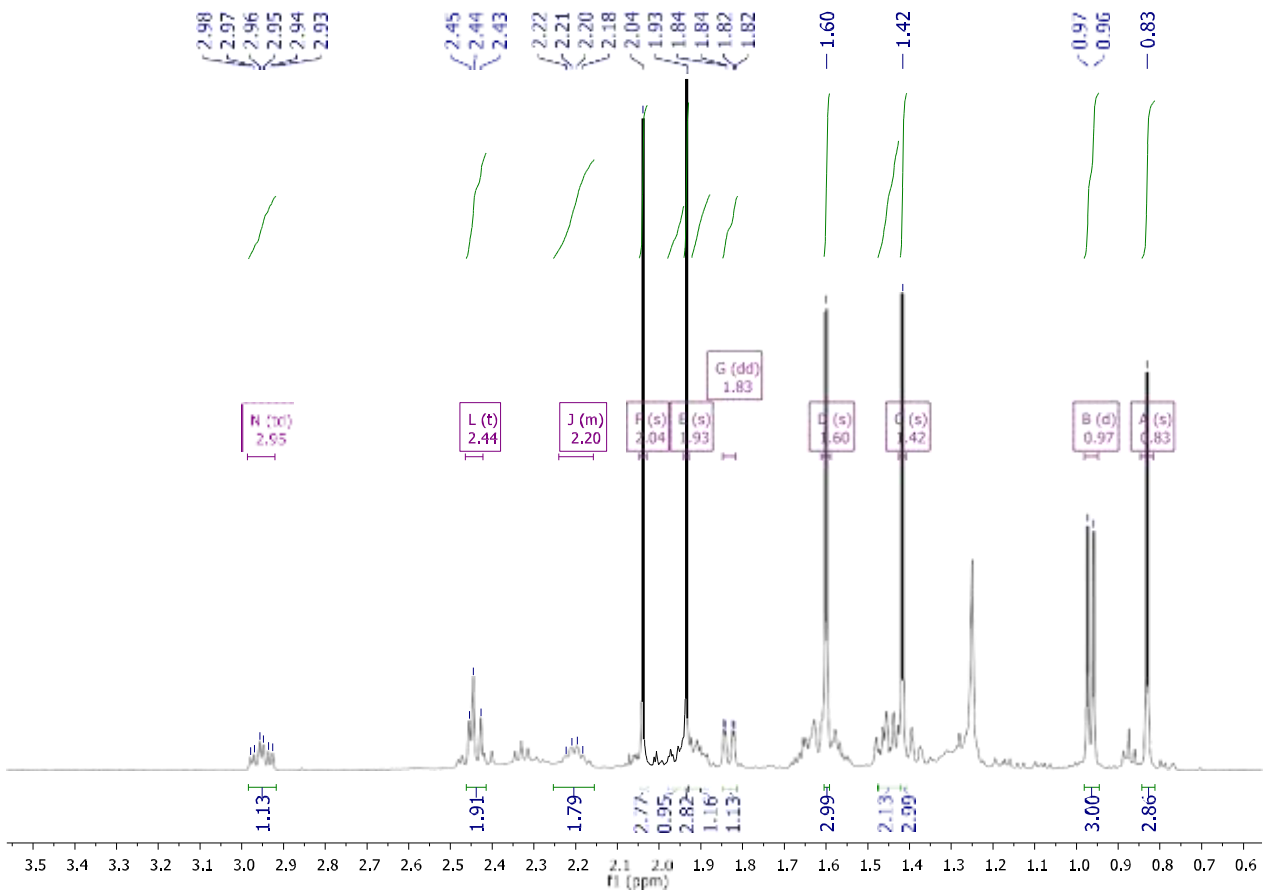
8,10,18-trihidroxi- 2,6-dolabelladieno (20) 32.86 min (IK 2257)



### CAPÍTULO 3

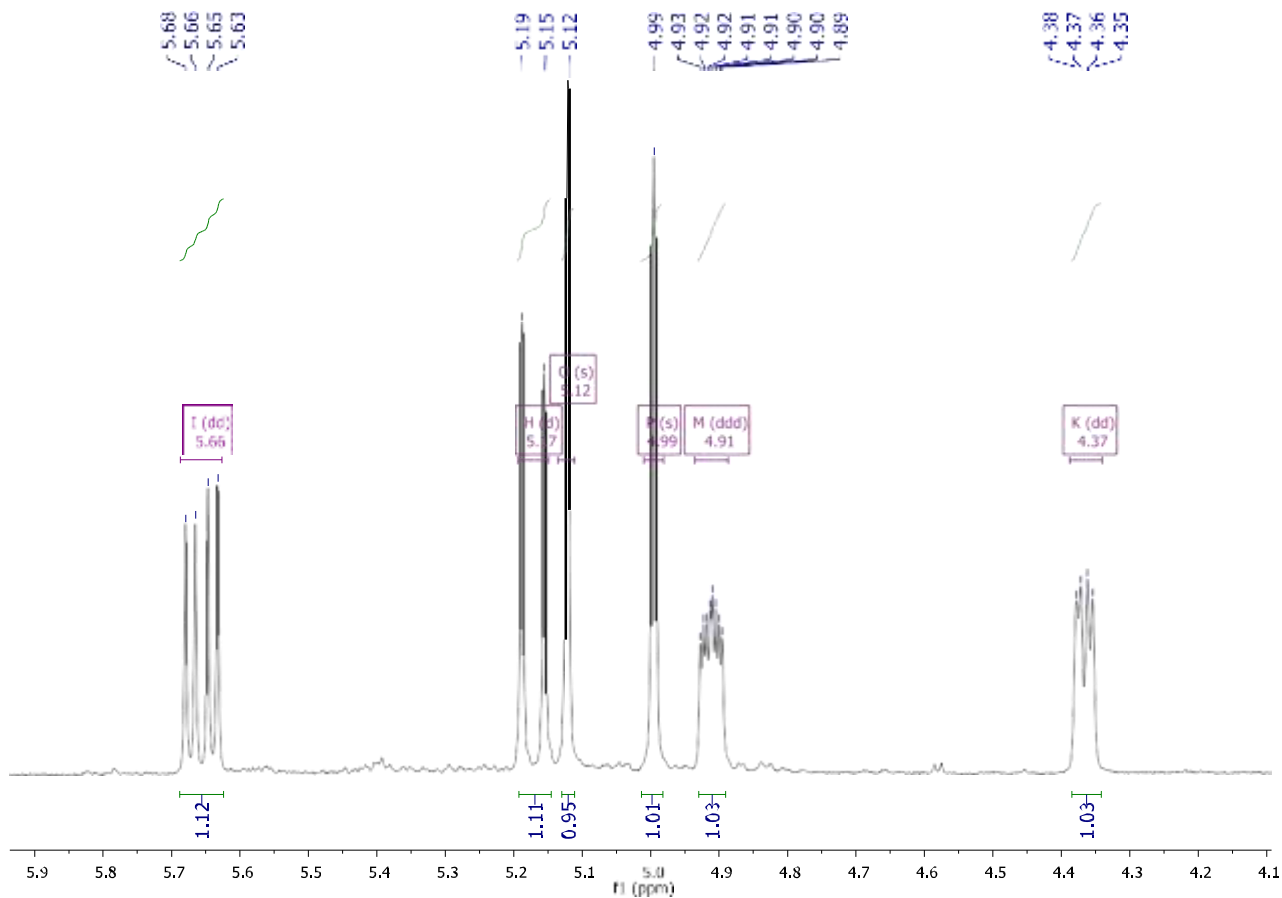


Anexo Espectro de RMN <sup>1</sup>H para el compuesto **24** (500 Mhz en CDCl<sub>3</sub>)

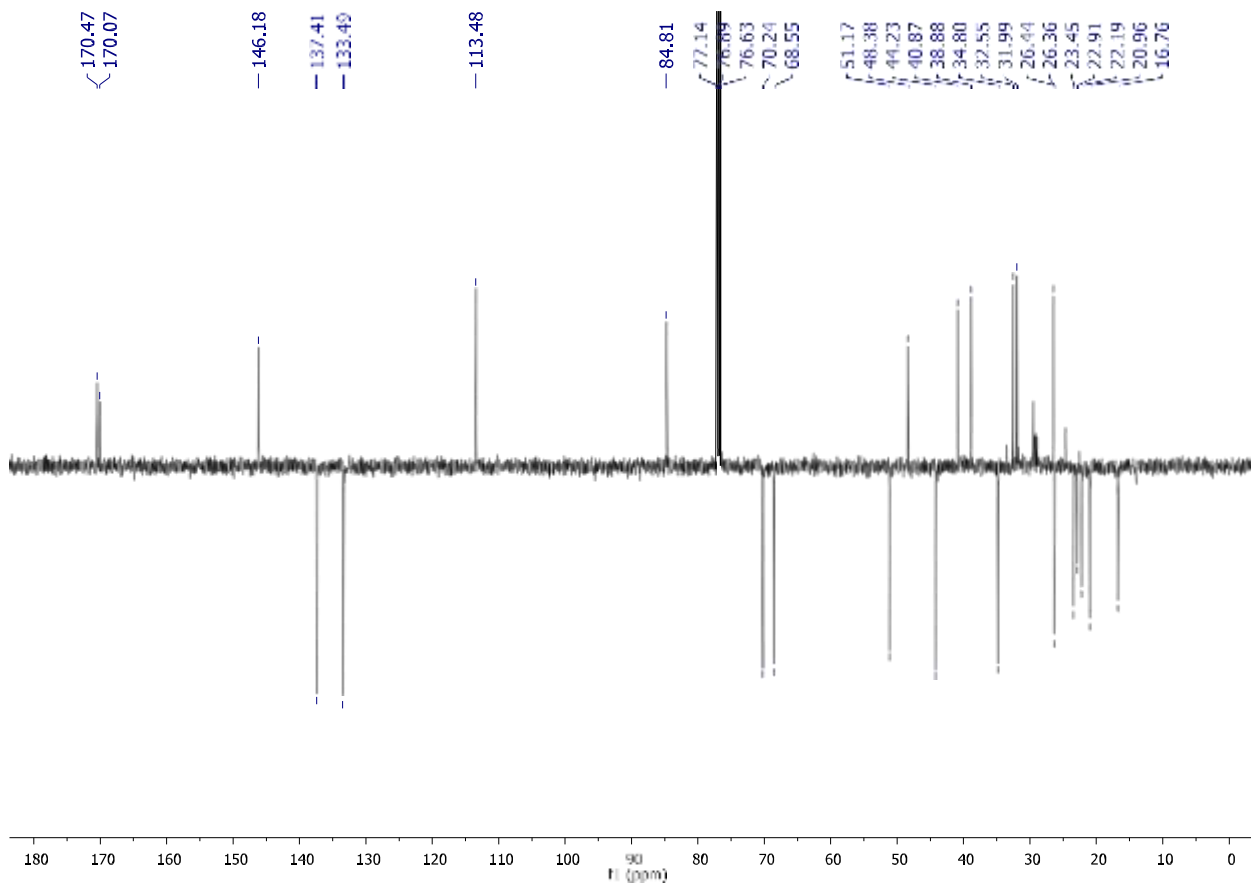


Anexo :Ampliación Espectro de RMN <sup>1</sup>H para el compuesto **24**(500 Mhz en CDCl<sub>3</sub>)

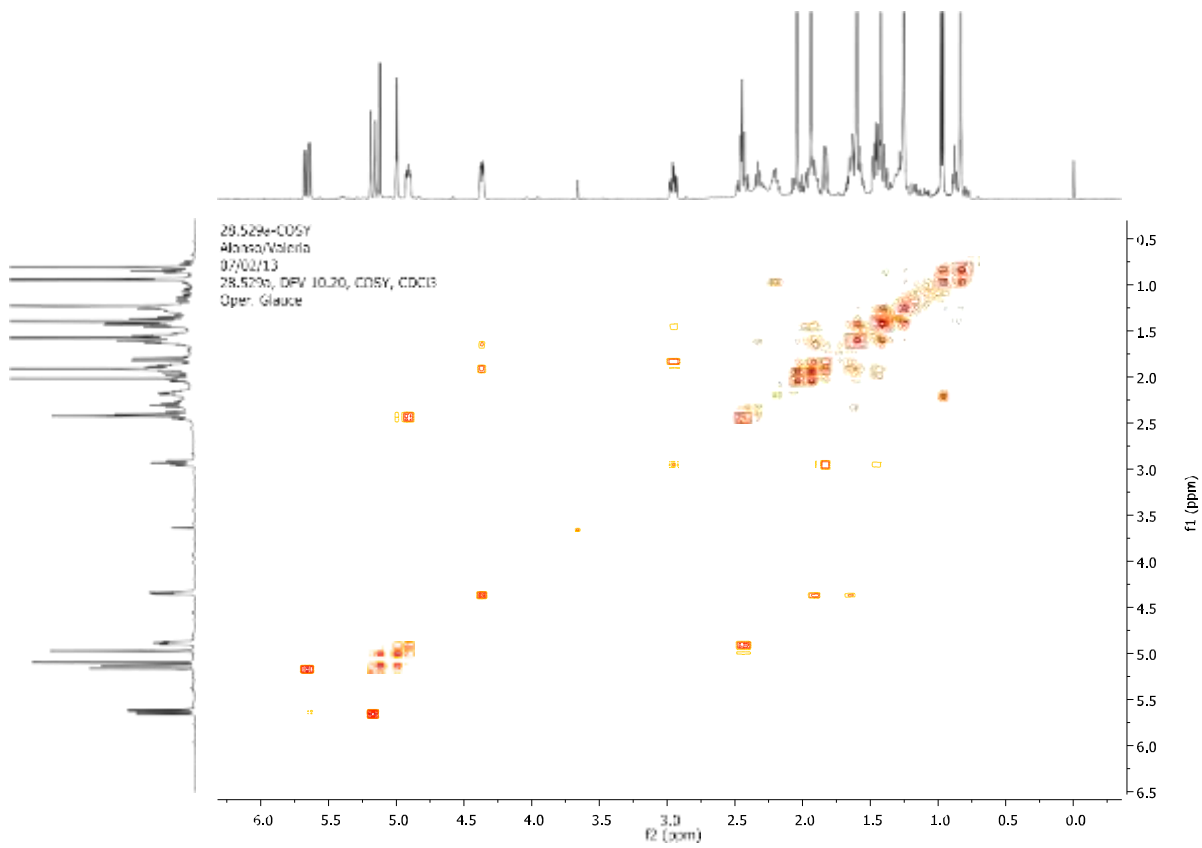




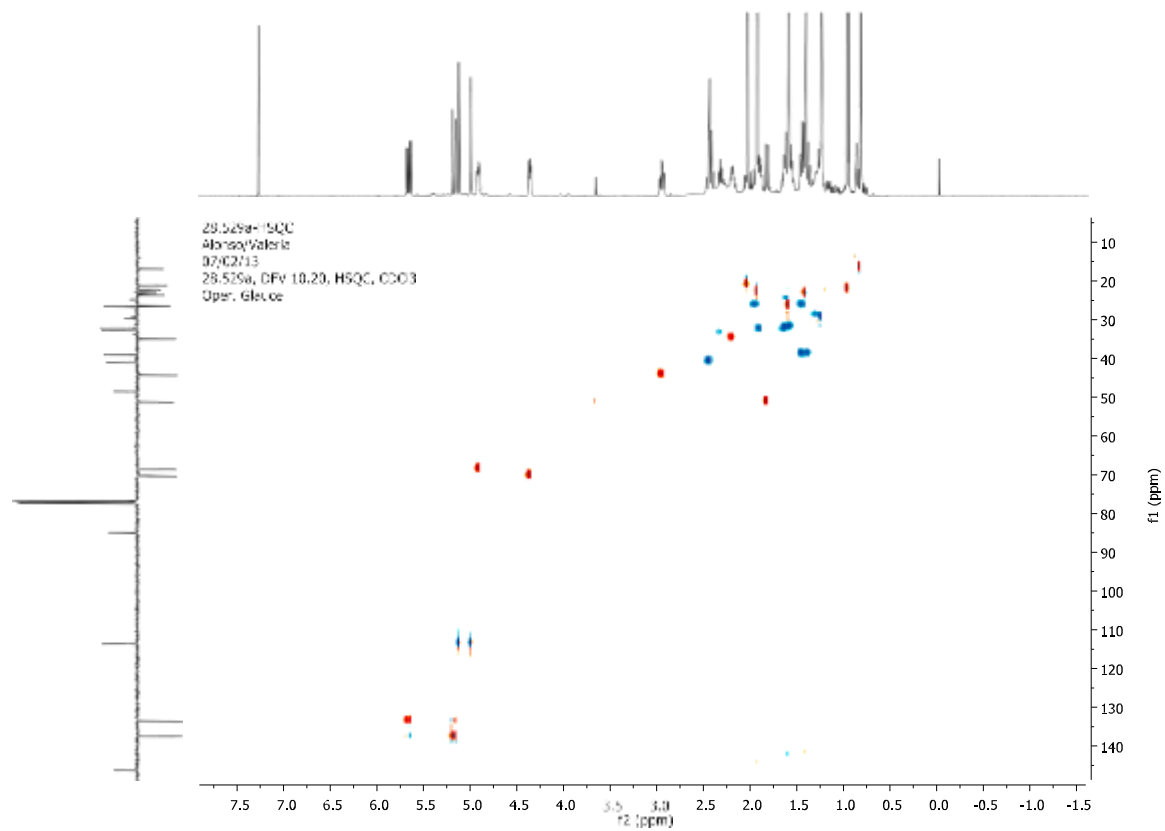
Anexo 3.3: Ampliación Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **24** (500 Mhz en  $\text{CDCl}_3$ )



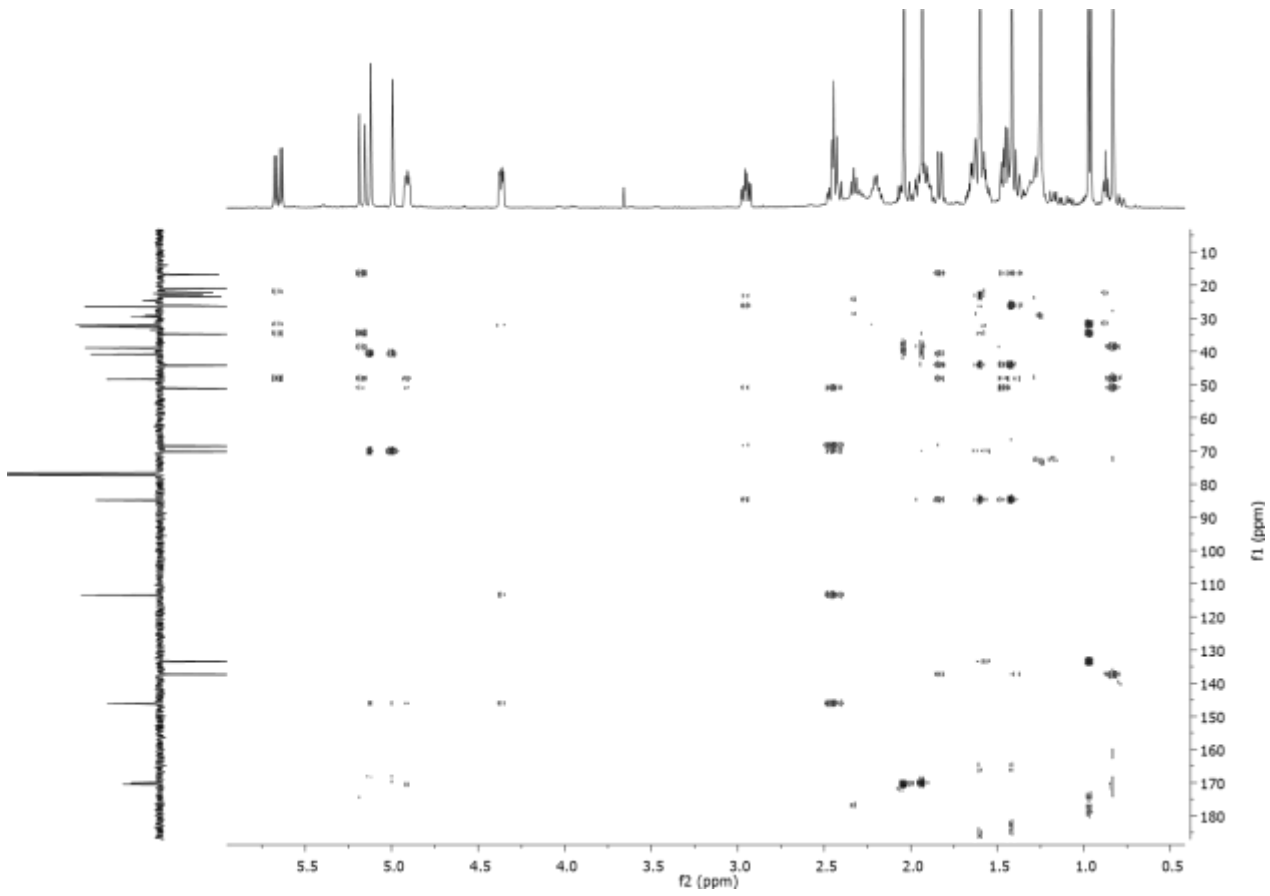
Anexo Espectro de RMN APT para el compuesto **24** (125 Mhz en  $\text{CDCl}_3$ )



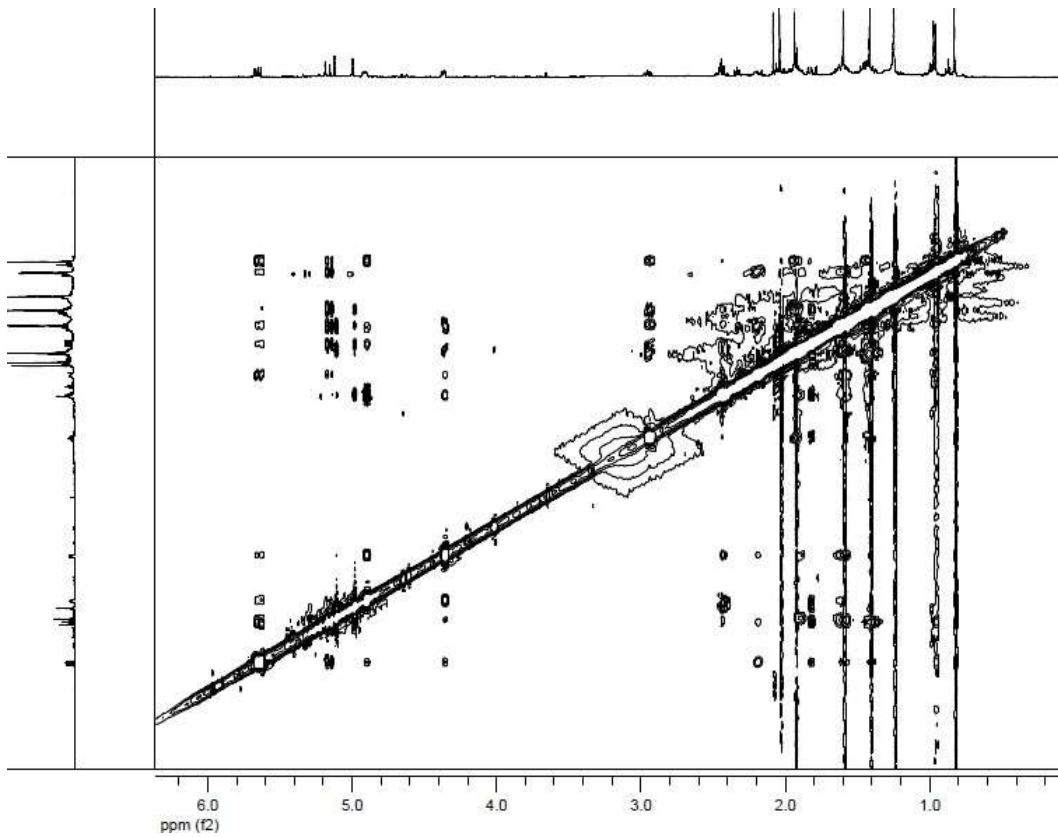
Anexo :Experimento COSY para el compuesto **24** en CDCl<sub>3</sub>



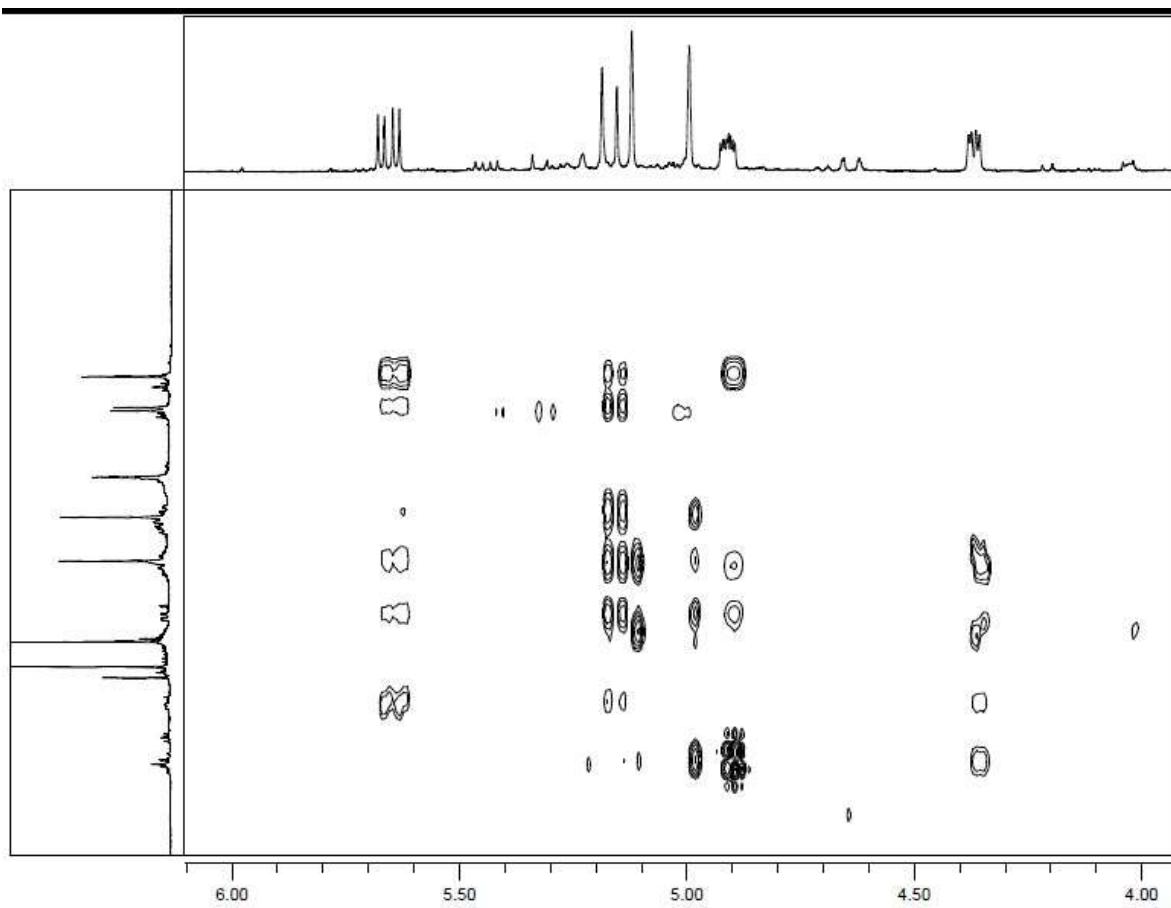
Anexo Experimento HSQC para el compuesto **24** en CDCl<sub>3</sub>



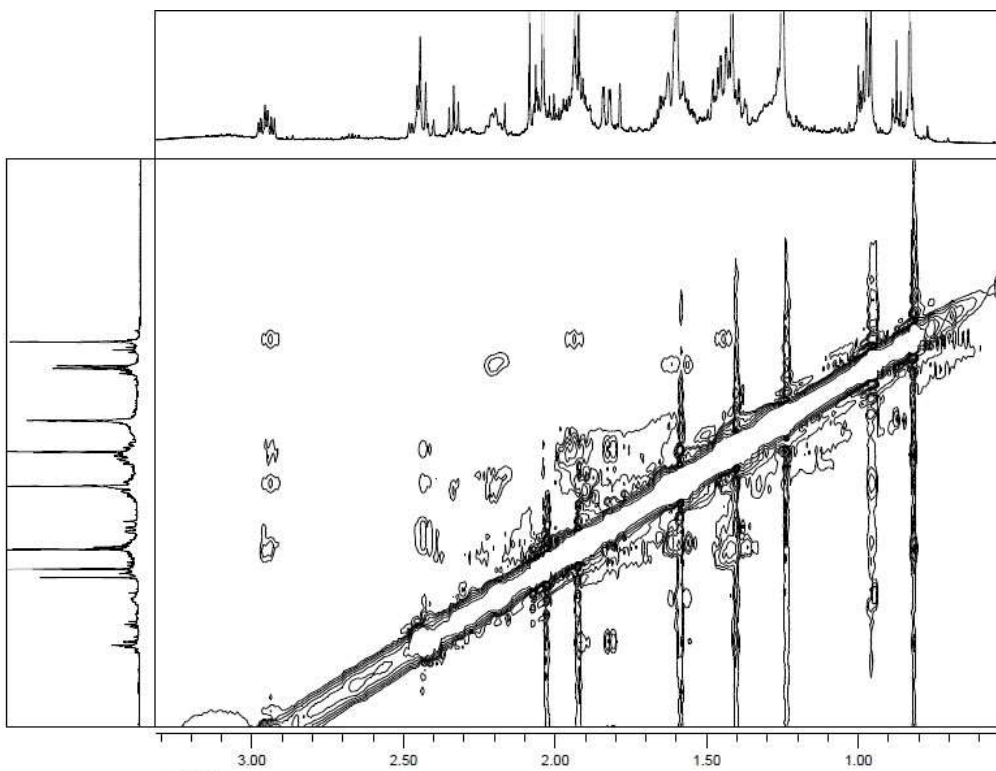
Anexo :Experimento HMBC para el compuesto **24** en  $\text{CDCl}_3$



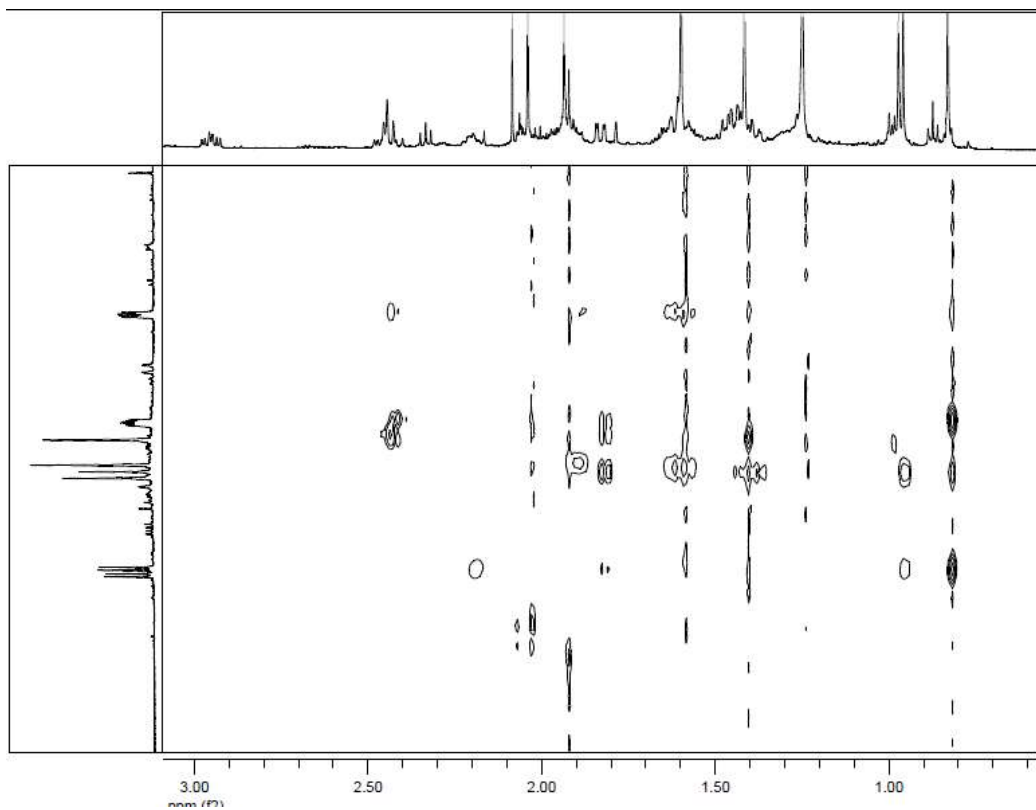
Anexo :Experimento NOESY para el compuesto **24** en  $\text{CDCl}_3$



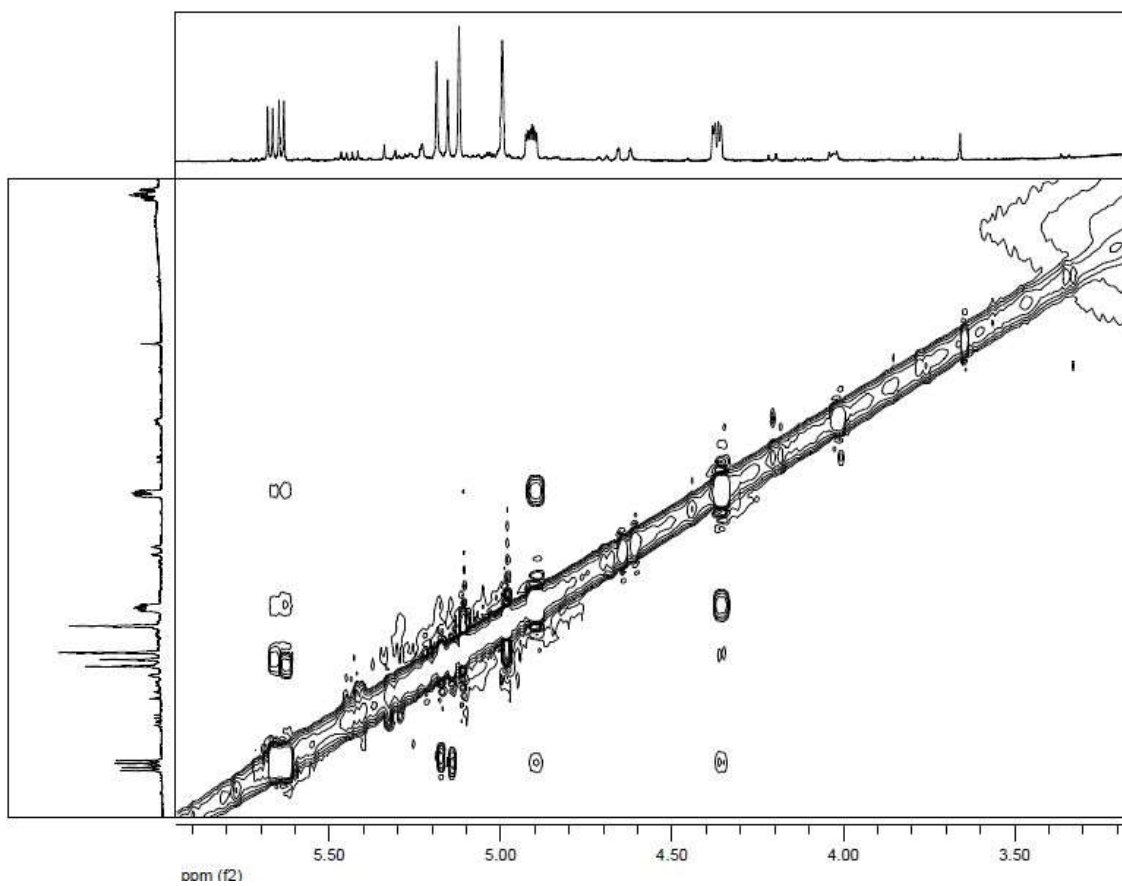
Anexo:Ampliación del experimento NOESY para el compuesto **24** en  $\text{CDCl}_3$



Anexo :Ampliación del experimento NOESY para el compuesto **24** en  $\text{CDCl}_3$

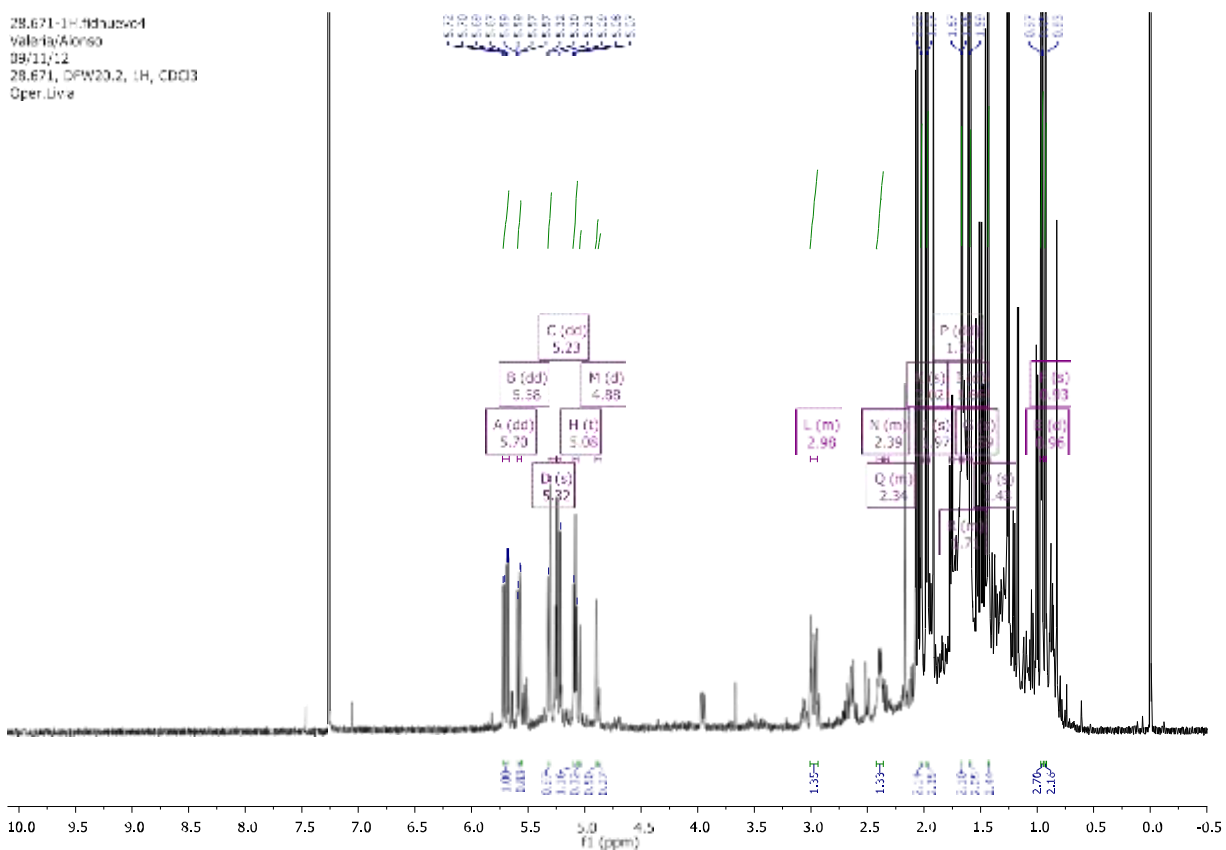


Anexo :Ampliación del experimento NOESY para el compuesto **24** en  $\text{CDCl}_3$

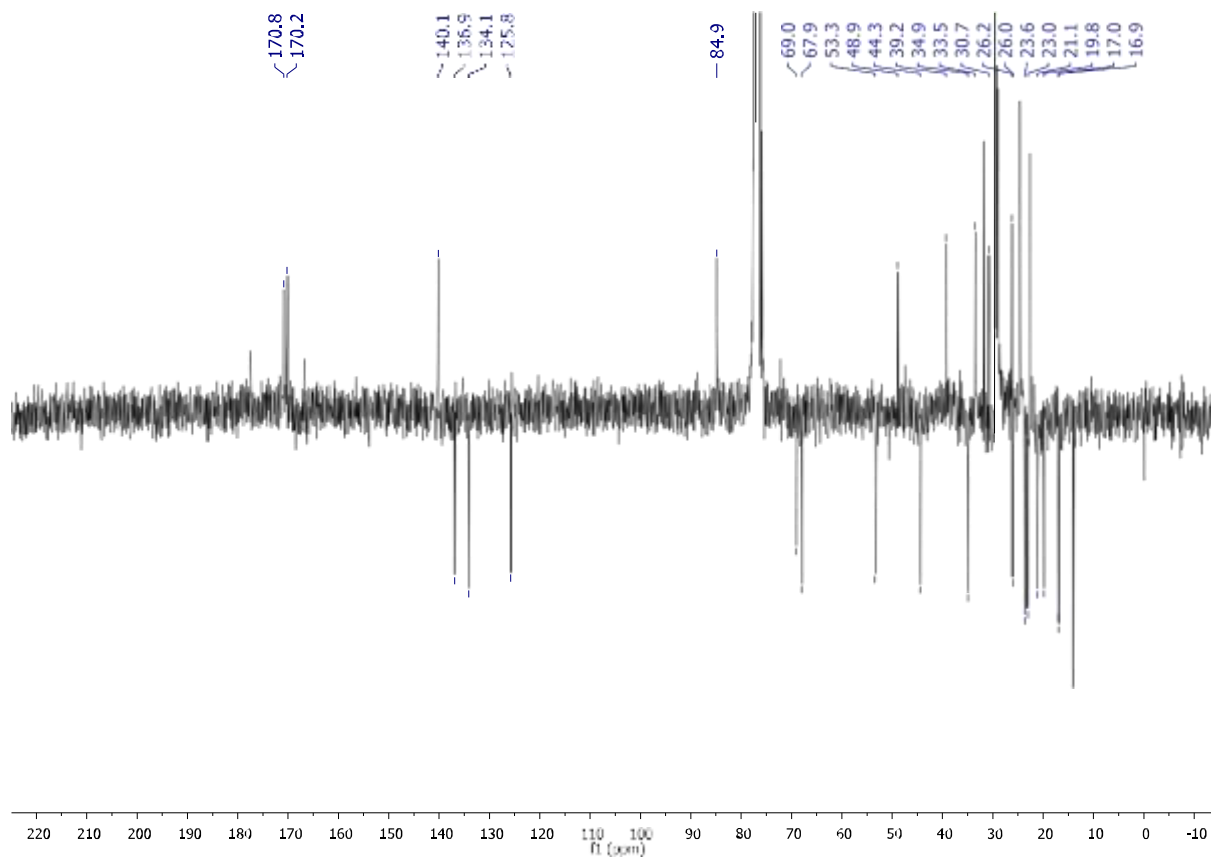


Anexo:Ampliación del experimento NOESY para el compuesto **24** en  $\text{CDCl}_3$

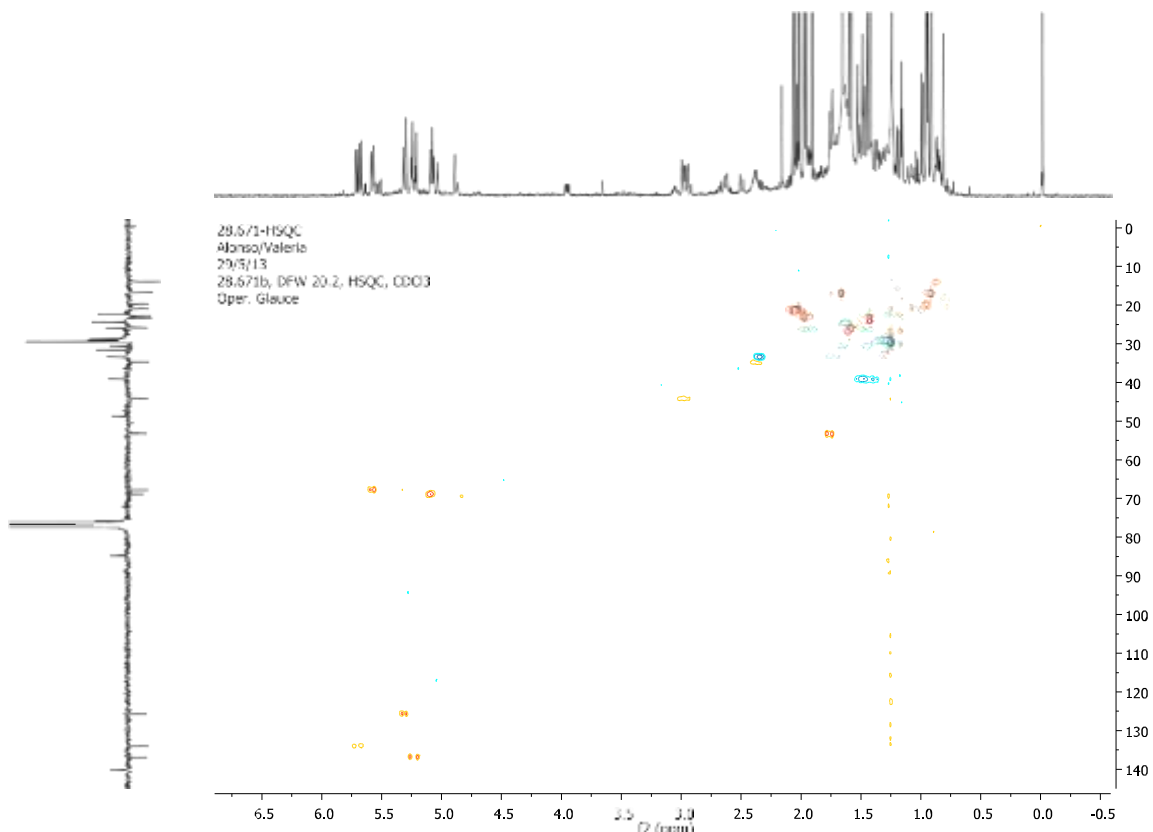
28.671-1H.fidhuave4  
Valeria Alonso  
09/11/12  
28.671, DPW20.2, 1H, CDCl3  
Qper.Live



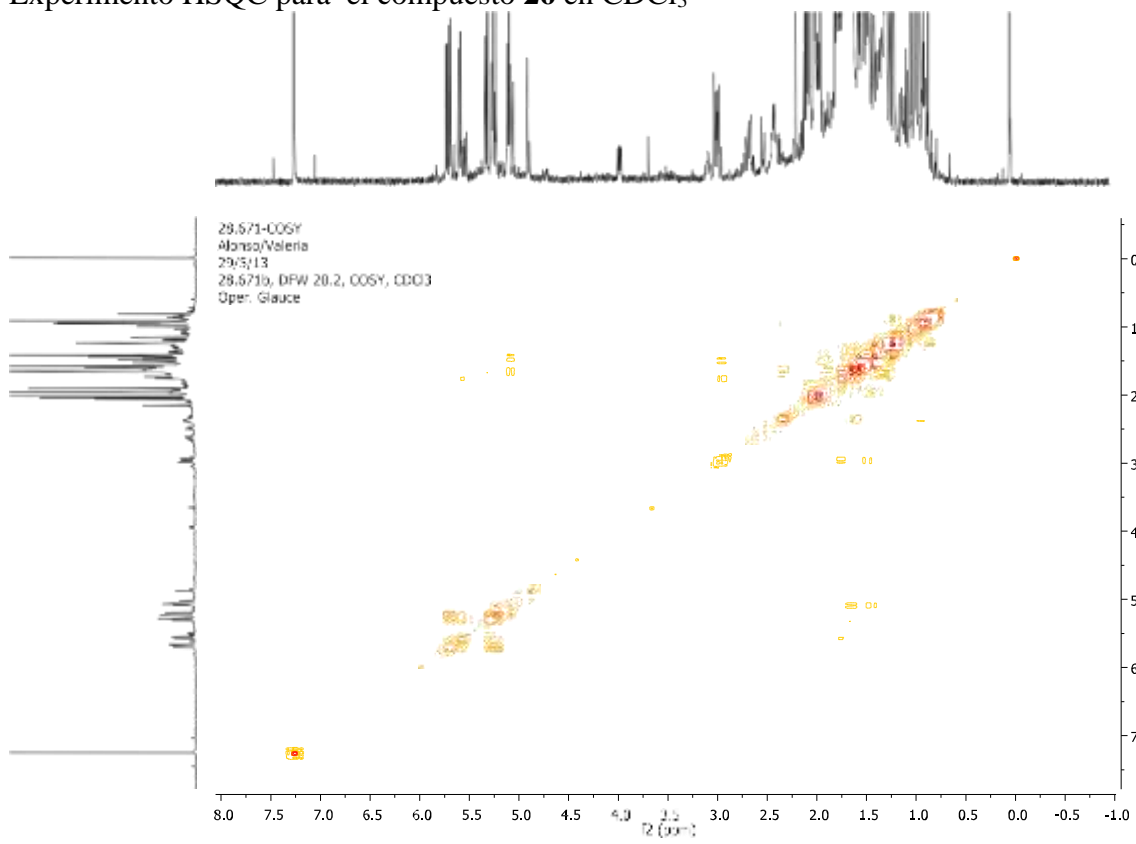
Anexo Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto **26** (500 Mhz en  $\text{CDCl}_3$ )



Espectro de RMN APT para el compuesto **26** (125 Mhz en CDCl<sub>3</sub>)

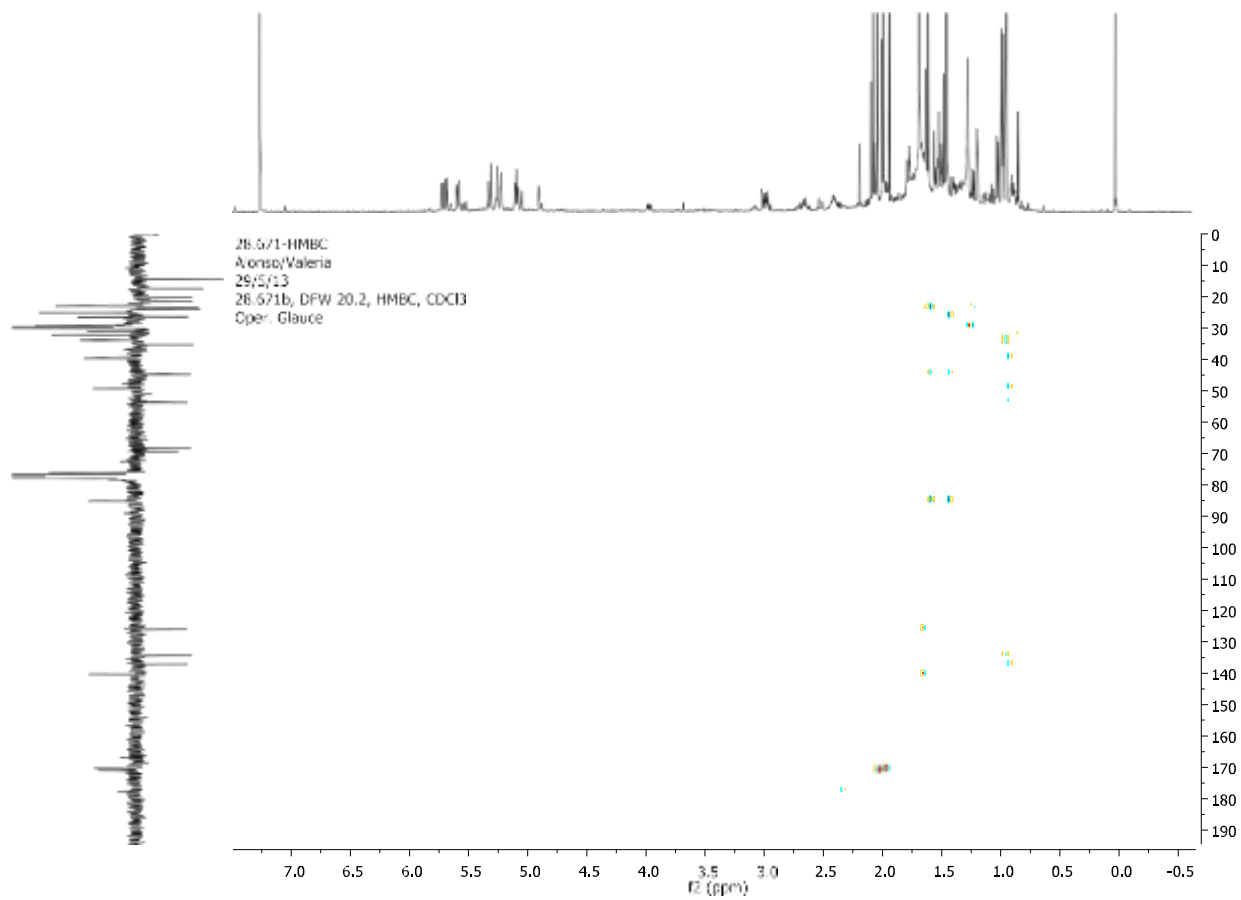


Experimento HSQC para el compuesto **26** en  $\text{CDCl}_3$





Experimento COSY para el compuesto **26** en  $\text{CDCl}_3$



Experimento HMBC para el compuesto **26** en  $\text{CDCl}_3$