

***PSEUDOPTEROGORGIA ELISABETHAE* DE SAN ANDRÉS Y PROVIDENCIA, UNA PLUMA DE MAR CON EXCELENTE POTENCIAL COMO FUENTE DE PRODUCTOS NATURALES CON APLICACIÓN INDUSTRIAL**

Por

Carmenza Duque^{1,2}

Resumen

Duque, Carmenza: *Pseudopterogorgia Elisabethae* de San Andrés y Providencia, una pluma de mar con excelente potencial como fuente de productos naturales con aplicación industrial. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **34** (130): 89-103, 2010. ISSN 0370-3908.

Pseudopterogorgia elisabethae una interesante pluma de mar que crece en las islas de San Andrés y Providencia (Caribe Colombiano nor-occidental), ha sido sujeto de estudios bioprospectivos por nosotros durante los últimos 7 años. En la primera etapa de la investigación se recolectaron fragmentos de colonias individuales en varios sitios y a diferentes profundidades alrededor de las Islas de San Andrés y Providencia. Luego de preparar extractos con CH₂Cl₂/MeOH y de someterlos a Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas se establecieron según la composición mostrada por el perfil cromatográfico dos quimiotipos diferentes para *Pseudopterogorgia elisabethae*, el quimiotipo 1 para especímenes provenientes de la Isla de Providencia y el quimiotipo 2 para colonias establecidas en la Isla de San Andrés. El quimiotipo 1 fué característico y exclusivo de los animales recolectados en Providencia, pero el quimiotipo 2 aunque muy abundante en los animales recolectados en San Andrés, ocasionalmente fue encontrado en animales de la Isla de Providencia.

Aplicando métodos cromatográficos, espectroscópicos y de transformaciones químicas a los dos conjuntos de extractos reunidos de cada quimiotipo, se logró establecer que el quimiotipo 1 presentó como constituyentes mayoritarios una mezcla compleja (4-16%) de aproximadamente trece compuestos tipo pseudopterosinas, *seco*-pseudopterosinas y amflectosinas. Estos compuestos se

1 Miembro Correspondiente Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Apartado 44763, Bogotá, D. C., Colombia. Correo Electrónico: cduqueb@etb.net.co

2 Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, Bogotá, Colombia. Correo Electrónico: cduqueb@unal.edu.co

aislaron e identificaron como sigue: ocho con estructura no reportada anteriormente, las pseudopterosinas P-S, glicosidadas en el C-10 con L-fucosa libre y acetiladas en los C-4', C-3' y C-2' respectivamente, las pseudopterosinas T-V glicosidadas en el C-10 con D-arabinosa libre y acetiladas en los C-4' y C-3', respectivamente y la *seco*-pseudopterosina K, glicosidada en el C-7 con L-fucosa libre, y cinco de estructura conocida las pseudopterosinas G y K, la *seco*-pseudopterosina J y las amfilectosinas A y B.

El quimiotipo 2 se caracterizó por tener bajas concentraciones (2-4%) de las mismas pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas mencionadas anteriormente, pero en contraste sus constituyentes mayoritarios fueron una mezcla en equilibrio de diterpenos no glicosidados (MEDNG) tipo amfilectano denominados 10-acetoxi-9-hidroxi—amfilecta-8,10,12,14 tetraeno y 9-acetoxi-10-hidroxi-amfilecta-8,10,12,14 tetraeno, junto con dos componentes minoritarios el elisabetatrienol y la amfilecta-8(13),11,14-trieno-9,10-diona.

Paso seguido los extractos crudos de los dos quimiotipos fueron sometidos a evaluación de sus propiedades antiinflamatorias en bioensayos *in vivo* usando el modelo clásico de inflamación aguda (edema en oreja de ratón) y la inhibición del mediador de inflamación MPO liberado en el edema formado. Los resultados mostraron para los extractos, bajos niveles de inhibición de la inflamación en el edema auricular comparados con el estándar de indometacina utilizado, en contraste los dos extractos mostraron una marcada inhibición del mediador de inflamación MPO, inclusive superior a la indometacina. Adicionalmente, en el ensayo de inhibición de MPO *in vitro*, los compuestos MEDNG, PsQ, PsS, PsT y PsU mostraron niveles mas altos de inhibición de la inflamación que los exhibidos por los estándares dexametasona e indometacina. En los ensayos de liberación de NO *in vitro*, los tratamientos mas potentes fueron los compuestos MEDNG, la PsP y la PsT. Por otro lado las PsQ, PsS y PsU fueron potentes agentes captadores de NO, y como las PsG, PsP y *seco*-PsK no tuvieron actividad captadora de NO, suponemos que ellos deben estar inhibiendo la sintasa de NO (iNOS) u otras rutas que influyen la producción de esta enzima.

En los estudios de citotoxicidad usando el ensayo de MTT con cinco líneas tumorales: HEp-2 (carcinoma de laringe), MKN-45 (carcinoma de estomago), HT-29 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cervix) y dos cultivos de fibroblastos normales Fib 04 (epitelio bucal humano) y Fib 05 (tejido de cordón umbilical humano), los resultados mostraron que ambos extractos tanto el del quimiotipo 1 como el del quimiotipo 2, presentaron una actividad citotóxica promisoriosa sobre las líneas tumorales empleadas, observándose una reducción de la supervivencia en todas las líneas celulares usadas. Sin embargo, el extracto del quimiotipo 1 fue mas potente en citotoxicidad que el del quimiotipo 2.

En los ensayos de actividad antimicrobiana, los resultados demostraron que todas las pseudopterosinas, *seco*-pseudopterosinas y MEDGN aislados de *P. elisabethae*, tienen actividad selectiva contra bacterias marinas *gram* positivas y contra bacterias terrestres patógenas *gram* positivas (con valores de IC₅₀ entre 1.4 y 17 µg/ml), pero no tienen actividad contra el hongo evaluado.

Finalmente, en los ensayos antifouling realizados (usando organismos representantes del *microfouling* y del *macrofouling*) los resultados mostraron que el quimiotipo 1 (fracciones que contienen pseudopterosinas) y las PsQ y U (las demás pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas aisladas de los ejemplares de Providencia y San Andrés, están aún en fase de valoración) tienen propiedades *antifouling* en concentraciones promedio de 1 mg/ml contra los organismos ensayados, lo que hace estos compuestos muy atractivos para posteriores valoraciones en campo como agentes ambientalmente amigables.

En conclusión los resultados aquí presentados demuestran que los compuestos aislados de esta pluma de mar *P. elisabethae* de San Andrés y Providencia son moléculas promisorias con un perfil de actividad antiinflamatoria, citotóxica, antibacteriana y antifouling muy interesante, lo cual hace de este recurso una fuente muy atractiva de compuestos que pueden ser utilizados industrialmente.

Palabras clave: biodiversidad marina, bioprospección, plumas de mar, *Pseudopterogorgia elisabethae*, pseudopterosinas, *seco*-pseudopterosinas, compuestos antiinflamatorios, compuestos citotóxicos, compuestos antimicrobianos, compuestos *antifouling*.

Abstract

Pseudopterogorgia elisabethae an interesting sea feather found in the islands of San Andres and Providencia (SW Colombian Caribbean), has been the subject of our research studies for the last 7 years. In the first step of the studies here presented we collected fragments of individual colonies at various sites and depth ranges around the islands. Collected samples were extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ and then subjected to HPLC-MS. Chromatographic profiles of the extracts, allowed us to recognize two different chemotypes for *P. elisabethae*. Chemotype 1 characterized samples from Providencia whereas chemotype 2 characterized samples from San Andres. Chemotype 1 was characteristic and exclusive of samples collected at Providencia. Chemotype 2 was characteristic but not exclusive to samples collected at San Andres, occasionally was found in samples from Providencia.

Each extract from the both chemotypes was fractionated by chromatographic means and the pure isolated compounds thus obtained were carefully identified by spectroscopic and chemical methods. A complex mixture (4-16%) of 13 compounds (pseudopterosins, *seco*-pseudopterosins and amphilectosins) characterized chemotype 1. Those were identified as follows: eight new compounds in nature, PsP, Q, R, and S glycosylated at C-10 with free and acetylated at C-4', C-3' and C-2' L-fucose, respectively, PsT, U and V glycosylated with D-arabinose free and acetylated at C-4' and C-3', respectively and the *seco*-PsK, glycosylated at C-7 with free L-fucose and five known compounds, PsG, K, *seco*-PsJ and amphilectosins A and B.

Chemotype 2 contained lesser amounts (2-4%) of the compounds mentioned above. In contrast it showed as major constituents an interconverting 1:1 mixture of non glycosylated amphilectane type diterpenes (IMNGD) (10-acetoxi-9-hydroxy-amphilecta-8,10,12,14 tetraene and 9-acetoxi-10-hydroxy-amphilecta-8,10,12,14 tetraene) and minor amounts of elisabethatrienol and amphilecta-8(13),11,14-triene-9,10-dione.

7

Subsequently, the evaluation of the anti-inflammatory properties *in vivo* of extracts (chemotype 1 and chemotype 2) was carried out by using the TPA-induced ear oedema model, classical experiment of acute inflammation and by inhibiting the MPA mediator released to the oedema tissues. The results showed relatively low levels of inflammation inhibition, when compared to the activity showed by the anti-inflammatory commercial drug indomethacin. In contrast, we found marked inhibition of MPO levels by both extracts, even superior to the inhibition shown by indomethacin. Additionally, in the *in vitro* MPO assay IMNGD, PsQ, PsS, PsT and PsU exhibited higher levels of inhibition compared with indomethacin and dexamethasone. In the NO release *in vitro*, IMNGD, PsP and PsT were the most potent treatments. On the other hand, PsQ, PsS and PsU did show NO scavenger activity but PsG, PsP and *seco*-PsK did not exhibit any scavenger activity. The latter compounds should inhibit the inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) or other routes that influence this enzyme.

The cytotoxicity activity of the compounds isolated from *P. elisabethae* was studied by the MTT assay, using the following cell lines: HEp-2 (carcinoma of the larynx), MKN-45 (stomach cancer), HT-29 (adenocarcinoma of the colon), MCF-7 (breast cancer) y HeLa (cervix cancer) and two fibroblast culture of normal cells. The results showed that both the chemotype 1 as the chemotype 2 presented promising activity against all cancer cell lines used. However, the extract of chemotype 1 was more potent than that of the chemotype 2.

In the antimicrobial assays all pseudopterosins, *seco*-pseudopterosins and the IMNGD isolated from *P. elisabethae* exhibited selective activity against marine and pathogenic terrestrial *gram* positive bacteria (IC_{50} values between 1.4-17 $\mu\text{g/ml}$) but they did not show any activity against *Candida albicans*.

Finally, in regard to the marine antifouling laboratory bioassays used to evaluate the antifouling properties of the compounds isolated during this work from the chemotype 1 of *P. elisabethae*, against marine organisms representative of micro- and macrofouling, the results showed that the crude extract, fractions containing pseudopectosins, *seco*-pseudopectosins and amphilectosins, and PsQ and PsU had promising antifouling power in concentrations about 1 µg/ml. The research in this direction still continues in our laboratory.

In conclusion, all results presented here contribute to demonstrate that the compounds isolated from the sea *P. elisabethae* are promising molecules having an interesting anti-inflammatory, cytotoxic, antibacterial and antifouling activity profile. This fact makes this marine organism an attractive source of compounds which could be used in the industry.

Key words: marine biodiversity, bioprospection, sea feathers, *Pseudopterogorgia elisabethae*, pseudopectosins, *seco*-pseudopectosins, anti-inflammatory compounds, cytotoxic compounds, antimicrobial compounds, antifouling compounds.

Introducción

Los productos naturales marinos han venido jugando desde hace unos 40 años un papel muy importante en el descubrimiento de sustancias con estructuras químicas la mayoría de las veces sin contraparte terrestre, las cuales se han venido convirtiendo en prototipos para el desarrollo de nuevas drogas o son sustancias importantes para otros fines industriales (Faulkner, 2002; Blunt *et al.*, 2009). Por esta razón es sin duda ninguna muy importante identificar los organismos que producen estos compuestos novedosos y determinar su actividad biológica aprovechable por el hombre.

En este sentido los octocorales (gorgónidos) también llamados plumas, abanicos y látigos de mar, cuyas poblaciones ocupan el segundo lugar en abundancia en los arrecifes coralinos del IndoPacífico y del Caribe, han mostrado desde el año 1990 que son una fuente extraordinaria de compuestos químicos, principalmente de diterpenos. En años recientes las especies de octocorales pertenecientes al género *Pseudopterogorgia* (plumas de mar), hasta ahora documentadas 15 especies en total, han sido el centro de atención de muchos científicos porque se ha descubierto que ellas contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios con un perfil farmacológico promisorio (Heckrodt & Mulzer, 2005). Durante el período comprendido entre 1970 hasta el 2008, se han venido publicando numerosos trabajos científicos (199 en total) sobre la química y farmacología de este género. La Figura 1 provee una descripción gráfica del número de publicaciones de las especies del género *Pseudopterogorgia* estudiadas. Es evidente de la gráfica mostrada que *Pseudopterogorgia elisabethae* es la especie más estudiada, seguida por *P. americana*, *P. sp*, *P. acerosa* y otras especies.

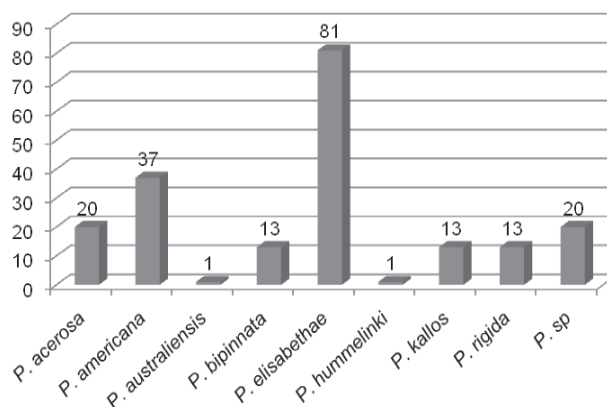


Figura 1. Número de publicaciones (1970- 2008, fuente Chemical Abstract Search) sobre la química y farmacología de especies de octocorales del género *Pseudopterogorgia*.

La especie *P. elisabethae* (Bayer, 1961) (Figura 2) vive en las aguas tropicales del Mar Caribe (Florida, Bahamas, Bermuda, Cuba, Jamaica, Honduras, Belice, México y San Andrés y Providencia, Colombia) (Heckrodt & Mulzer, 2005). Se distribuye moderadamente en los arrecifes coralinos entre 40-70 m bajo el nivel del mar, sin embargo, ocasionalmente puede encontrarse en aguas someras por ejemplo entre los 5-35 m (Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2009).

El interés de la comunidad científica en *P. elisabethae* parece deberse a su relativa abundancia en el Mar Caribe, al gran número de metabolitos encontrados en esta especie y a la actividad biológica encontrada para muchos de ellos por ej. anticáncer, antiinflamatoria, antiplasmódica, antimicrobiana, antiviral, antimalárica y antioxidante (Heckrodt & Mulzer, 2005). También se ha reportado para



Figura 2. *Pseudopterogorgia elisabethae*, pluma de mar.

los compuestos aislados de *P. elisabethae* actividad anti-alimentaria en peces (Thornton & Kerr, 2002).

La diversidad estructural de muchos de los compuestos aislados de esta especie es asombrosa, la mayoría de ellos diterpenos pertenecientes a 17 clases de las 40 existentes hoy en día (Berrue & Kerr, 2009). Se han encontrado compuestos diterpenos con esqueletos pseudopterano, elisabetano, nor-elisabetano, dinor-elisabetano, elisabano, amfilactano, serrulatano, sanandresano, colombiasano, elisapterano, trinor-amfilactano, tetrinor-amfilactano, cumbiano, *seco*-cumbiano, ileabetano, nor-amfilactano y caribenano (Berrue & Kerr, 2009).

Entre los compuestos diterpenos aislados de *P. elisabethae* se destacan las pseudopterinas y las *seco*-pseudopterinas, no solo por el novedoso tipo de esqueleto que poseen sino también por su excelente actividad biológica.

Las pseudopterinas, son diterpenos con esqueleto de tipo amfilactano glicosidados, las cuales se diferencian entre ellas principalmente en la posición de la glicosidación (C-9 ó C-10), el azúcar (generalmente con D-xilosa, D-arabinosa y L-fucosa), en la posición del sustituyente acetilo en el azúcar, cuando este existe, así como también en la estereoquímica de la aglicona (Figura 3). Las PsA-D fueron las primeras en ser identificadas hace aproximadamente 20 años en ejemplares recolectados en las Islas Bahamas (Look *et al.*, 1986; Fenical, 1987). Unos años más tarde las PsE-J fueron identificadas en ejemplares recolectados en la Isla Bermuda, y las PsK-L, en muestras provenientes de las Islas Bahamas (Roussis *et al.*, 1990). Recientemente, las PsM-O

se aislaron de especímenes de cayos de la Florida (Ata *et al.*, 2003), y las PsX-Y aisladas de especímenes recolectados en Bahamas (Ata *et al.*, 2004) (Figura 3).

Las *seco*-pseudopterinas, compuestos estructuralmente relacionados con las pseudopterinas, son diterpenos con esqueleto tipo serrulatano glicosidado, las cuales se diferencian entre ellas principalmente en la posición de la glicosidación (C-7 ó C-8), en el azúcar (arabinosa y fucosa) y en la posición del sustituyente acetilo en el azúcar cuando existe acetilación. Las *seco*-PsA-D fueron encontradas por primera vez en ejemplares de *Pseudopterogorgia kallos*, recolectados en los cayos de la Florida (Look & Fenical, 1987). En ejemplares de *P. elisabethae* del mismo sitio se identificaron las *seco*-PsE-G (Ata *et al.*, 2003) y la *seco*-PsJ (Ferns & Kerr, 2005) (Figura 3).

Las pseudopterinas y las *seco*-pseudopterinas aisladas de especímenes del norte del Mar Caribe, no solo son interesantes por su estructura novedosa, sino también (por lo menos las que han sido ensayadas farmacológicamente hasta el momento) porque presentan potentes propiedades antiinflamatorias y analgésicas en pruebas *in vitro* e *in vivo* convirtiéndolas en sustancias promisorias para el tratamiento de la inflamación crónica.

Las primeras pseudopterinas que fueron estudiadas desde el punto de vista de su actividad biológica, fueron las PsA-D, a las cuales se les determinó la actividad antimicrobiana sobre platos de agar y la citotoxicidad con el ensayo sobre huevos de erizo de mar; sin embargo, estas actividades fueron cuantitativamente menos importantes, con relación a la actividad antiinflamatoria y analgésica encontrada en pruebas *in vivo*, en las cuales se evaluó el bloqueo de la inflamación y la actividad analgésica en ratones (Look *et al.*, 1986). Los resultados mostraron que la PsA, fue 40 y 12 veces más potente que la Indometacina con respecto a la actividad antiinflamatoria y analgésica, respectivamente. Estas pseudopterinas, también fueron evaluadas en ensayos antiinflamatorios *in vitro*, evaluando la inhibición de la fosfolipasa A2 (PLA₂) pancreática, y la liberación de prostaglandina E₂ y leucotrieno B₄, encontrándose que la PsA inhibió la enzima PLA₂, enzima que juega un papel importante en el inicio de la cascada del ácido araquidónico; además mostró capacidad de inhibir la producción de prostaglandina E₂ y leucotrieno B₄, mediadores químicos de la inflamación producidos por la vía de ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LPO), respectivamente (Look *et al.*, 1986).

Otra pseudopterina ampliamente estudiada ha sido la pseudopterina E, la cual mostró, en ensayos *in vitro* sobre neutrófilos humanos, capacidad de inhibir la

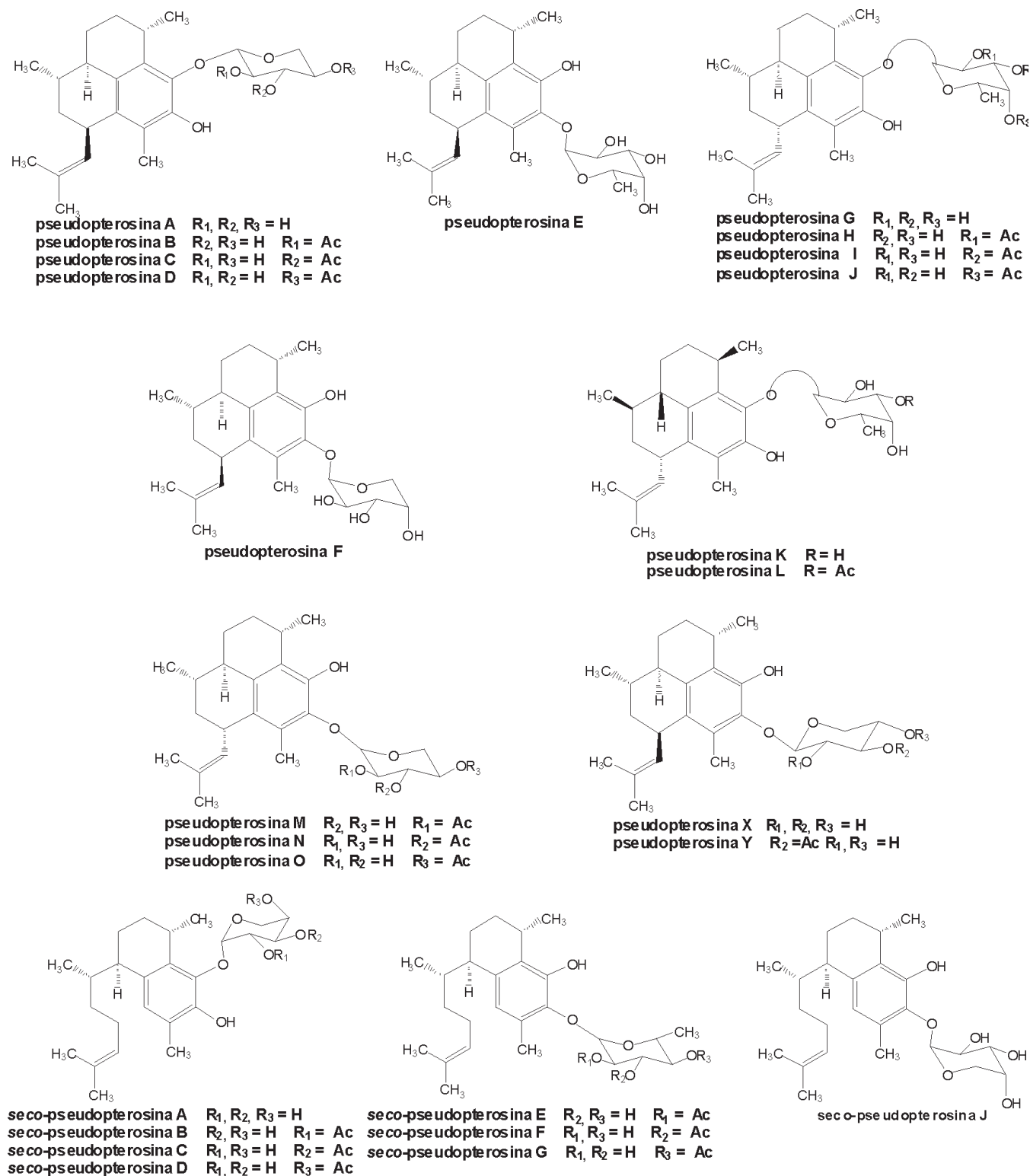


Figura 3. Pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas aisladas a partir de especímenes de *P. elisabethae* recolectados en el norte del Mar Caribe.

desgranulación de estos, inhibiendo enzimas como PLA₂, además, de inhibir la producción de leucotrienos, lo cual indica que actúa como un antagonista de la cascada del ácido araquidónico, inhibiendo la vía de LPO, exhibiendo además como una ventaja frente a su análoga la pseudopterosina A, la baja toxicidad que presenta (Potts & Faulkner, 1992; Mayer *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2002).

Las últimas pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas evaluadas en pruebas *in vivo* de actividad antiinflamatoria (edema auricular en ratón), fueron las PsM-O y las *seco*-PsE-G, las cuales mostraron porcentajes de inhibición de la inflamación superiores al 65%, siendo la PsN y la *seco*-PsE, las que mayor actividad antiinflamatoria presentaron (porcentaje de inhibición del 88%), (Ata *et al.*, 2003).

Por ello extractos semipurificados, ricos en estos compuestos, son usados como un aditivo para prevenir la irritación causada por la exposición al sol, en cosméticos para el rostro de la firma Estée Lauder en un producto llamado Resilience[®], el cual tiene gran éxito comercial gracias a su alta eficacia (Kijoa & Sawanwong, 2004; Haefner, 2003; Faulkner, 2000). Este hecho ha generado una gran demanda del organismo, la cual se estima del orden de 30 a 45 toneladas anuales, por parte de la industria cosmética. Sin embargo, en la actualidad la oferta de material animal sólo proviene de las Islas Bahamas, país que ejerce un control especial en la recolección de colonias con el fin de mantener la viabilidad del recurso. Actualmente el precio de la crema a base de extracto semipurificado de coral (50 ml) oscila entre US\$ 80-100 (Precios 2009).

Las pseudopterosinas A-D, han sido licenciadas a una pequeña firma, OsteoArthritis Sciences Inc., para uso medicinal como potencial droga antiinflamatoria, la cual ha completado la fase II de los ensayos clínicos de un derivado de la pseudopterosina A, llamado methopterosin (OAS1000), un potente compuesto antiinflamatorio, inhibidor de la síntesis de leucotrieno B₄, el cual fue incluido como una Nueva Droga Investigacional (Investigational New Drug IND), aplicado con la U.S. Food and Drug Administration (FDA), y hoy día se encuentra en fase de experimentación en humanos para dermatitis irritante de contacto (Gross & König, 2006; Kijoa & Sawanwong, 2004; Haefner, 2003; Faulkner, 2000).

Adicionalmente, la *P. elisabethae* recolectada en Bahamas, ha sido evaluada en ensayos de actividad antimicrobiana, en donde, el extracto crudo mostró una potente actividad antibacteriana contra bacterias *Gram*-positivas. Este mismo estudio mostró que las pseudopterosinas A-E, K, X y Y, aisladas a partir de este coral son las responsables de la actividad antibacterial contra *Streptococcus*

pyogenes, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, mientras que no presentaron actividad contra las bacterias *Gram*-negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ata *et al.*, 2004).

En Colombia el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia, ha sido el pionero en la investigación química y de actividad biológica de la especie de pluma de mar antes mencionada, *Pseudoptero-gorgia elisabethae*, que crece en el archipiélago de San Andrés y Providencia. En el presente trabajo se describirán los resultados de las investigaciones que hemos venido realizando durante los últimos 7 años en compuestos aislados de esta interesante pluma de mar y se resaltarán algunas de las enormes perspectivas que este tema de investigación ofrece.

Estudios en *Pseudoptero-gorgia elisabethae* recolectada en el archipiélago de San Andrés y Providencia

1. Estudios químicos (Duque *et al.*, 2004; Puyana *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2006; Correa, 2007)

Como se desprende de lo anteriormente mencionado, la composición y el porcentaje de pseudopterosinas presentes en las poblaciones naturales de *P. elisabethae*, varía considerablemente dependiendo de la procedencia del animal. Por esta razón y sabiendo de la existencia de poblaciones de *P. elisabethae* en el archipiélago de San Andrés y Providencia procedimos a realizar estudios del recurso, de su contenido de sustancias químicas y de la actividad biológica de extractos y de los compuestos aislados e identificados.

Material animal

Fragmentos de especímenes de colonias de *P. elisabethae* fueron recolectados por SCUBA en 13 sitios de la isla de Providencia y en 4 sitios de la isla de San Andrés (se tomaron alrededor de 10 réplicas en cada sitio de recolección). Los tejidos animales de cada muestra fueron sucesivamente secados al aire, extraídos con una mezcla de MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) y sometidos a CLAE-EM (cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas). Los perfiles cromatográficos obtenidos demostraron la presencia de dos quimiotipos (Figura 4) a los que denominamos quimiotipo 1 para los extractos de los animales de la isla de Providencia y quimiotipo 2 para aquellos provenientes de los animales de la isla de San Andrés. Aunque el quimiotipo 1 fue encontrado exclusivamente en las muestras de Providencia, algunas veces se encontró también el quimiotipo 2 en Providencia.

Aislamiento e identificación de compuestos en los dos quimiotipos

Los extractos de las muestras correspondientes a cada uno de los dos quimiotipos fueron juntados hasta obtener aproximadamente 2 g de extracto total para cada quimiotipo. Estos extractos fueron luego sometidos a fraccionamiento sobre sílica gel y posteriormente a purificación final por CLAE en fase reversa. Los compuestos puros aislados fueron identificados por métodos espectroscópicos (UV, EM de ionización suave, RMN mono- y bidimensional) y de transformación química.

El quimiotipo 1 se caracterizó por presentar como constituyentes mayoritarios una mezcla compleja (4-16%) de aproximadamente trece compuestos tipo pseudopterosinas, *seco*-pseudopterosinas y amfilectosinas (Figuras 4 y 5), de los cuales se logró el aislamiento de ocho compuestos las PsP-S, glicosidadas en el C-10 con L-fucosa libre y acetilada en los C-4', C-3' y C-2' respectivamente, las PsT-V glicosidadas en el C-10 con D-arabinosa libre y acetilada en los C-4' y C-3', respectivamente (Duque *et al.*, 2004) y la *seco*-PsK, glicosidada en el C-7 con L-fucosa libre (Duque *et al.*, 2006) junto con cinco compuestos conocidos las PsG, PsK, la *seco*-PsJ y las amfilectosinas A y B.

El quimiotipo 2 se caracterizó por tener bajas concentraciones (2-4%) de las mismas pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas mencionadas, en contraste sus

constituyentes mayoritarios fueron una mezcla de diterpenos tipo amfilectano (Figuras 4 y 5). De esta fracción se logró aislar e identificar como componente mayoritario a una mezcla en equilibrio de dos diterpenos monoacetilados con esqueleto amfilectano (MEDNG) denominados 10-acetoxi-9-hidroxi—amfilecta-8,10,12,14 tetraeno y 9-acetoxi-10-hidroxi-amfilecta-8,10,12,14 tetraeno, junto con dos componentes minoritarios el elisabetatrienol y la amfilecta-8(13),11,14-trieno-9,10-diona (Duque *et al.*, 2006).

En la Figura 5, se muestran las estructuras químicas de los compuestos tipo pseudopterosina y *seco*-pseudopterosina y otros de estructura relacionada encontrados por nosotros en *P. elisabethae* de San Andrés y Providencia (Duque *et al.*, 2004, Puyana *et al.*, 2004, Duque *et al.*, 2006, Correa, 2007). De ellos las PsP, PsQ, PsR, PsS, PsT, PsU, PsV, *seco*-PsK y los 4 diterpenos (10-acetoxi-9-hidroxi—amfilecta-8,10,12,14 tetraeno y 9-acetoxi-10-hidroxi-amfilecta-8,10,12,14 tetraeno, elisabetatrienol y amfilecta-8(13), 11,14-trieno-9,10-diona) fueron compuestos encontrados por primera vez en la naturaleza. Es importante anotar de estos resultados que **la composición y el porcentaje de pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas de *P. elisabethae* del Caribe colombiano (sur occidente del Mar Caribe) es muy diferente a la composición en esta clase de importantes compuestos encontrada en ejemplares del norte del Mar Caribe.** También es importante mencionar que la identidad

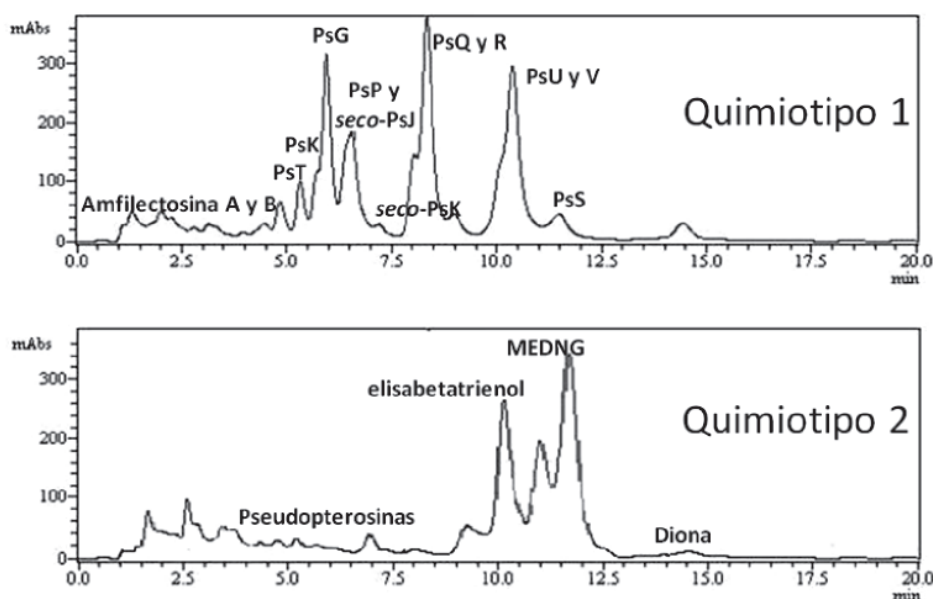


Figura 4. Perfiles por CLAE-EM de los dos quimiotipos encontrados en las muestras de *P. elisabethae* recolectada en las islas de Providencia y San Andrés. Columna Thermo HyperKeystone C-18, con un sistema isocrático ACN/H₂O (7:3), a 0.2 ml/min.

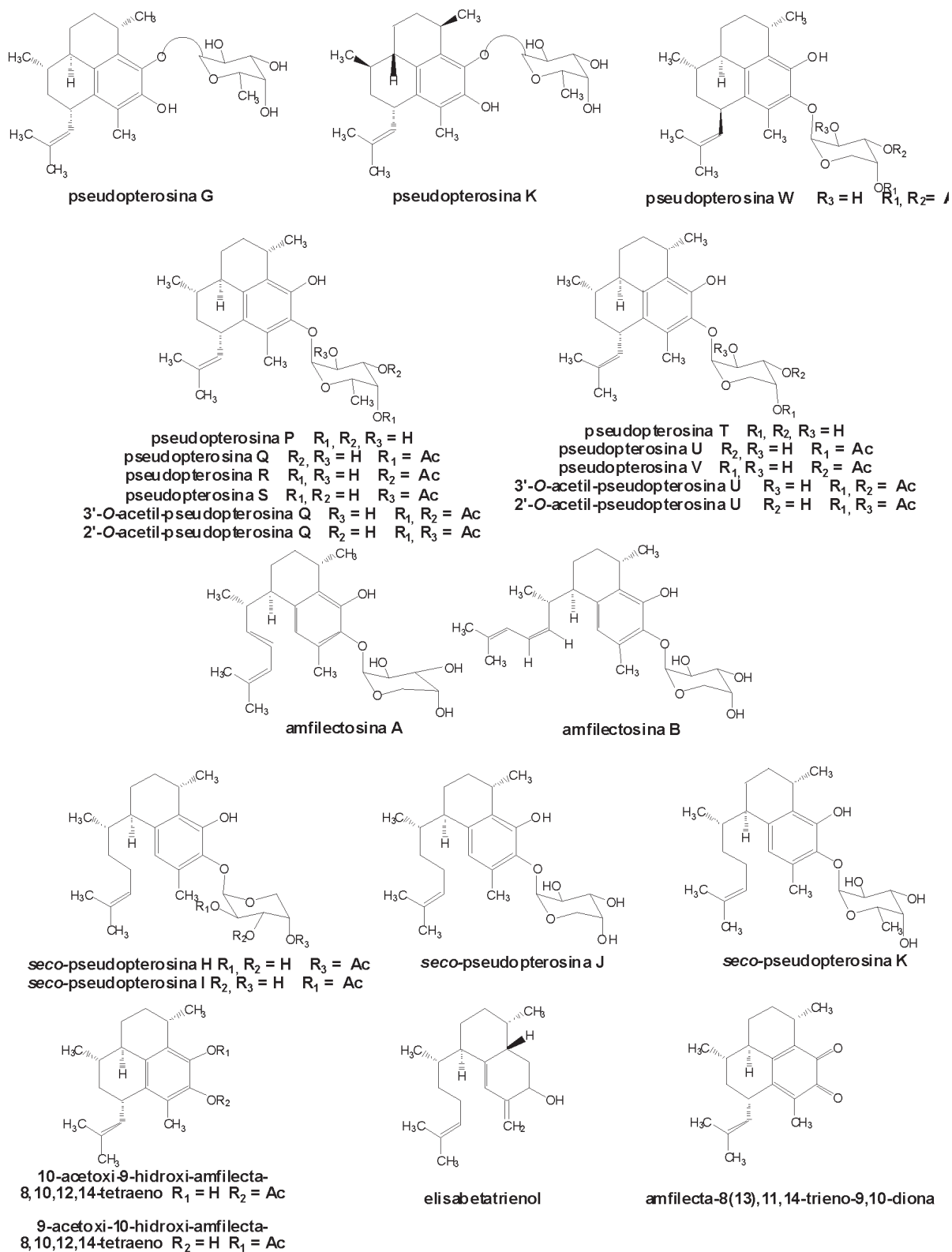


Figura 5. Compuestos aislados de *P. elisabethae* recolectada en las Islas de San Andrés y Providencia (sur occidente del Mar Caribe).

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos aislados de *P. elisabethae*

Compuesto	Concentración μ M	% inhibición de MPO	% inhibición de NO	% actividad captadora de NO
PsG	10	34	31	NA
	5			NA
	1			NA
PsK	10	NA	29	10
	5			10
	1			5
PsP	10	NA	58	NA
	5			NA
	1			NA
PsQ	10	59	37	42
	5			21
	1			22
PsS	10	49	36	31
	5			17
	1			6
PsT	10	52	52	25
	5			18
	1			14
PsU	10	52	32	38
	5			26
	1			28
<i>seco</i> -PsK	10	23	18	NA
	5			NA
	1			NA
MEDNG	50*	92	1	30
	25*			23
	5*			16
Dexametasona	10	35	100	NE
Indometacina	10	57	NE	NE
L-NIO	10	NE	82	NE
Curcumina	14	NE	NE	30

* μ g/ml ; NA: No activo; NE: No evaluado.

de las colonias estudiadas fue claramente confirmada como *P. elisabethae* por su morfología y análisis de escleritos. Adicionalmente, se observó que no hubo diferencias significativas en las dimensiones de los escleritos entre las colonias que conformaron los dos quimiotipos.

Además del trabajo realizado por nosotros, investigadores de la universidad de Puerto Rico reportaron simultáneamente algunas de las pseudopterosinas encontradas en nuestro trabajo (PsP, PsR, PsQ, PsU y PsV), y otras cinco nuevas pseudopterosinas aisladas a partir de especímenes de *P. elisabethae* recolectada en Providencia, de las cuales cuatro correspondieron a pseudopterosinas diacetiladas 3'-O-acetil-PsQ, 2'-O-acetil-PsQ, 3'-O-acetil-PsU y 2'-O-acetil-PsU y la PsW, la cual difiere de las demás pseudopterosinas en la estereoquímica del C-1, (Rodríguez *et al.*, 2004), además reportaron las *seco*-PsH- I, glicosidadas en el C-7 con α -arabinosa acetilada en

los C-2' y C-4', respectivamente, aisladas a partir de especímenes de *P. elisabethae* recolectados en la Isla de San Andrés, resultados también mostrados en la Figura 5 (Rodríguez *et al.*, 2004).

2. Estudios de actividad biológica de los compuestos aislados de *P. elisabethae* de las islas de San Andrés y Providencia

Propiedades antiinflamatorias (Correa, 2007; Correa *et al.*, 2009)

También como parte de nuestra investigación se determinaron las propiedades antiinflamatorias de extractos crudos de la pluma de mar *P. elisabethae* de San Andrés y de Providencia, en experimentos *in vivo*, usando el modelo clásico de inflamación aguda (edema en oreja de ratón, De Young *et al.*, 1989) y la inhibición del mediador de inhibición MPO (mieloperoxidasa) liberado en el edema formado

(Bradley *et al.*, 1982). En la Figura 6 se muestra que los dos extractos crudos presentaron valores de inhibición moderados de inflamación comparados con el estándar de indometacina utilizado. En contraste, en el ensayo de inhibición de la liberación de MPO en los homogenizados de las orejas usadas, se encontró que los extractos crudos mostraron valores de inhibición iguales o ligeramente superiores al estándar de indometacina (Figura 6), potente antiinflamatorio comercial, lo cual sugiere la presencia en los extractos de sustancias con una potente actividad en la inhibición de la desgranulación leucocitaria.

De otro lado, como la inflamación es un proceso complejo caracterizado por la contribución de muchos mediadores al proceso, las pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas aisladas y los compuestos MEDNG fueron evaluados en ensayos *in vitro* determinando su efecto en la liberación de dos de esos mediadores, la enzima MPO en neutrófilos humanos (PMN) (Bradley *et al.*, 1982) y el radical óxido nítrico (NO) en macrófagos J774 (CYTED, 2002). Adicionalmente, se evaluó para los compuestos la actividad captadora del radical NO (Marcocci *et al.*, 1994). En la Tabla 1, se muestra como los compuestos MEDNG, PsQ, PsS, PsT y PsU exhibieron niveles de inhibición de la liberación de MPO superiores a los mostrados por los controles, dexametasona e indometacina, de igual manera puede observarse como MEDNG, PsP y PsT fueron los tratamientos más potentes en la inhibición de la liberación de NO *in vitro*. Por último es importante mencionar que las PsQ, PsS y PsU presentaron una considerable actividad captadora

de NO (Tabla 1), mientras que las PsG, PsP y la *seco*-PsK no la tienen. Este último resultado parece indicar que la actividad captadora del radical NO moderada de estos últimos compuestos, se podría deber a la directa o indirecta inhibición de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS).

Los resultados anteriores son evidencia sustancial que contribuye a demostrar que los compuestos aislados durante este trabajo, son sustancias promisorias con un interesante perfil de actividad antiinflamatoria.

Propiedades citotóxicas (Correa, 2007)

Adicionalmente, se determinó la actividad citotóxica de los extractos de *P. elisabethae* correspondientes al quimiotipo 1 y al quimiotipo 2 contra cinco líneas tumorales: HEP-2 (carcinoma de laringe), MKN-45 (carcinoma de estomago), HT-29 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cervix) y dos cultivos de fibroblastos normales Fib 04 (epitelio bucal humano) y Fib 05 (tejido de cordón umbilical humano), con el fin de buscar la posible aplicación de *P. elisabethae* como fuente de compuestos con actividad anticáncer.

Para la determinación de la supervivencia celular se usó el método indirecto de reducción del MTT (Mosmann, 1983; Cordero & Aristizábal, 2002). Como control positivo de actividad se utilizó Doxorubicina HCl y como vehículo se empleó dimetil sulfóxido (DMSO, concentración final máxima 0,2% v/v). Se calcularon los porcentajes de supervivencia celular en los pozos tratados, relativos a los pozos de control de crecimiento celular y finalmente se construyeron curvas concentración vs. porcentaje de supervivencia.

Los resultados mostraron que los dos extractos presentaron una actividad citotóxica promisoriosa sobre las cinco líneas tumorales empleadas (Figura 7), observando una reducción de la supervivencia en todas las líneas usadas. Así, a las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7) ambos extractos presentaron un efecto citotóxico importante (Se considera que un extracto o una fracción presenta actividad citotóxica promisoriosa si es activo en concentraciones inferiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ (Mans *et al.*, 2000), mientras que a 5 $\mu\text{g/ml}$ ninguno de los extractos tuvo un efecto citotóxico sobre las líneas tumorales utilizadas. Al comparar los resultados de la actividad de los dos extractos se observa que el extracto de Providencia (quimiotipo 1) es más activo que el extracto de San Andrés (quimiotipo 2).

En cuanto a la citotoxicidad mostrada por el extracto crudo de Providencia sobre los dos cultivos de fibroblastos (Figura 6) los resultados muestran que éste indujo una reducción casi total de la supervivencia a las

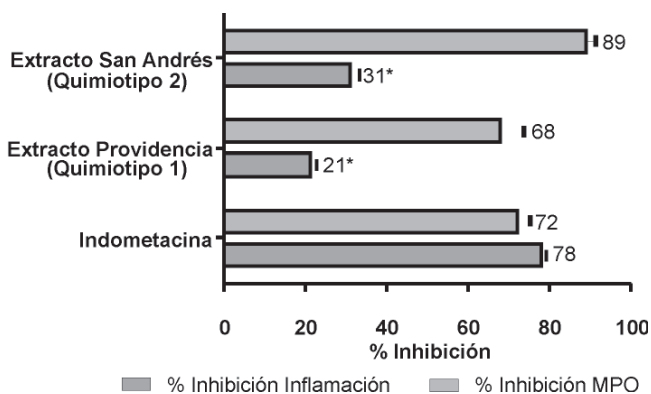


Figura 6. Porcentaje de inhibición de inflamación de los extractos de *P. elisabethae* en el ensayo de edema auricular inducido por TPA y porcentaje de inhibición de los niveles de MPO de los extractos de *P. elisabethae* evaluados en los homogeneizados de las secciones de orejas del ensayo de edema auricular inducido por TPA. Resultados expresados como el promedio del porcentaje de inhibición frente el vehículo (acetona) \pm D.E. (ANOVA y post-test Tukey * $P < 0.001$ significativo con respecto al patrón de referencia (indometacina).

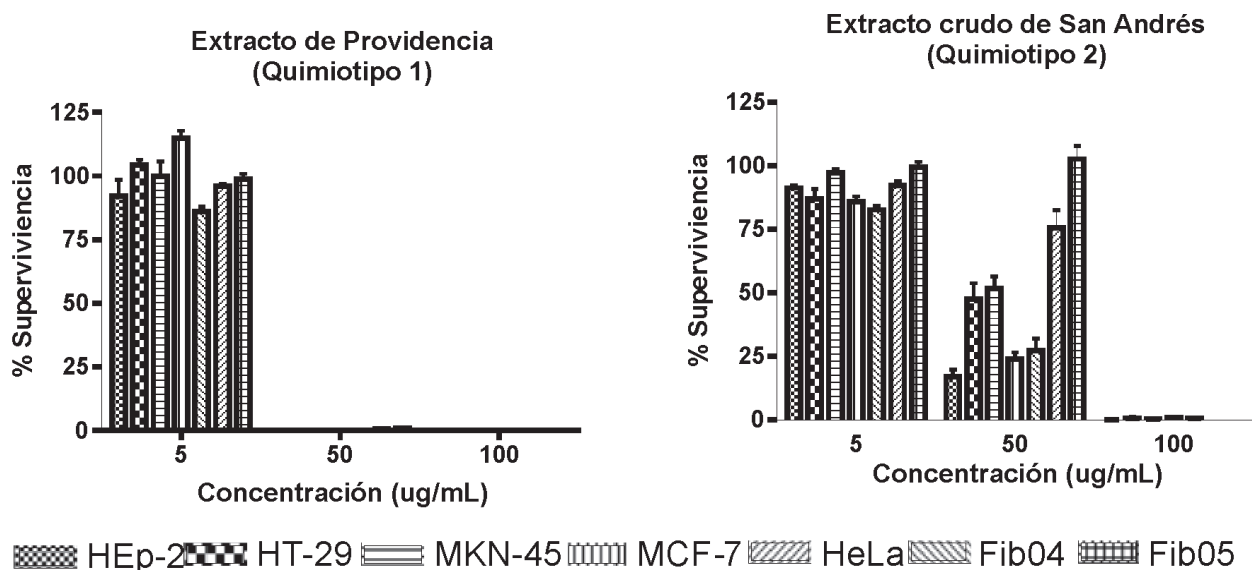


Figura 7. Porcentajes de supervivencia de las cinco líneas tumorales y dos cultivos de fibroblastos tratados con los extractos de *P. elisabethae* de Providencia (quimiotipo 1) y de San Andrés (quimiotipo 2). Resultados expresados como el promedio de porcentaje de supervivencia \pm D.E n= 6.

máximas concentraciones evaluadas (100 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$), mientras que a 5 $\mu\text{g/ml}$ no se observó ningún efecto citotóxico. En cuanto al extracto crudo de San Andrés, éste no presentó actividad citotóxica significativa a ninguna de las concentraciones evaluadas (0.5, 5 y 50 $\mu\text{g/ml}$). Este resultado es interesante ya que podría estar indicando una menor intensidad del efecto citotóxico del extracto de San Andrés sobre los cultivos de fibroblastos normales en comparación al efecto de éste sobre las líneas tumorales, sugiriendo una posible selectividad hacia las células tumorales.

De los resultados mostrados es claro que mucha más investigación es necesaria para determinar si las pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas y otros compuestos de estructura relacionada aislados de *P. elisabethae* de San Andrés y Providencia son responsables de la actividad citotóxica mostrada por los extractos crudos. Experimentos en este sentido se están llevando a cabo en nuestro laboratorio usando los compuestos puros y más líneas tumorales cancerosas.

Otras actividades biológicas

Recientemente, con el fin de ampliar el potencial de aplicación de estas interesantes sustancias, hemos venido realizando valoraciones complementarias que nos han permitido demostrar que las pseudopterosinas y *seco*-pseudopterosinas, tienen también una excelente actividad antibacteriana y *antifouling*.

En cuanto a la primera de las actividades mencionada y haciendo uso de dos metodologías diferentes (densidad óptica y ensayo de sensibilización, **Mora-Cristancho** et al. artículo en preparación), se evaluaron las actividades de las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, de la 3-*O*-Ac-PsU, de las *seco*-PsJ y *seco*-PsK, y de los compuestos MEDNG contra seis cepas bacterianas de origen marino *Oceanobacillus iheyensis*, *Ochrobactrum pseudogringonense*, *Vibrio harveyi*, *Kokurea rosea*, *Ochrobactrum* sp y *Alteromonas macleodii*, contra tres cepas bacterianas patógenas de origen terrestre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y contra el hongo patógeno *Candida albicans*. Los resultados demostraron que las pseudopterosinas, *seco*-pseudopterosinas y la mezcla en equilibrio de diterpenos aislados de *P. elisabethae* (Quimiotipos 1 y 2), tienen actividad selectiva contra bacterias gram positivas tanto marinas como terrestres con valores de IC_{50} entre 1.4 y 17 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, contra los microorganismos terrestres patógenos, mientras que no tienen actividad contra el hongo evaluado *Candida albicans* (**Correa et al.**, artículo en preparación).

Aunque en general hay un acuerdo dentro de la comunidad científica de que no existe un solo bioensayo que pueda arrojar resultados definitivos sobre las propiedades *antifouling* de las sustancias a valorar, debido principalmente a la diversidad de organismos implicados en el *fouling* marino, se trata la mayoría de las veces de usar un conjunto de bioensayos que utilicen como objetivo

diferentes organismos colonizadores involucrados tanto en el *microfouling* (bacterias o microalgas) como en el *macrofouling* (cirripedios y mejillones) (Briand, 2009). Con esto en mente se ensayaron extractos crudos de los dos quimiotipos de *P. elisabethae*, algunas mezclas de pseudopterosinas y seco-pseudopterosinas y algunas pseudopterosinas puras para valorar sus propiedades *antifouling* contra las microalgas *Cylindrotheca closterium*, *Chlorarachnion globosum*, *Pleurochrysis roscoffensis*, *Rodhella cyanea* y *Scenedesmus armatus*, contra las macroalgas *Ulva intestinales*, *Sargassum multicum* y *Polysiphonia lanosa*, y contra el mejillón *Mytilus edulis*. Los resultados mostraron que el quimiotipo 1 (fracciones que contienen pseudopterosinas) y las PsQ y U (las demás pseudopterosinas y seco-pseudopterosinas aisladas de los ejemplares de Providencia y San Andrés, están aún en fase de valoración) tienen propiedades *antifouling* en concentraciones promedio de 1 µg/ml contra los organismos ensayados (Ramos *et al.*, artículo en preparación).

Perspectivas

Los resultados anteriormente descritos constituyen una pieza importante dentro del proceso de bioprospección de esta especie, así, una vez terminada la fase de la determinación de su potencial de aplicación, los siguientes pasos para su explotación sustentable tienen que ver con la consecución de cantidades apreciables de estos metabolitos activos que aseguren la continuación de los estudios de mejoramiento de su potencial biológico (estudios de estructura vs. bioactividad), y que permitan establecer los procesos de la fabricación de productos para que en última instancia se asegure la continuidad en su comercialización.

En el caso de esta especie su extracción directa del medio donde vive no es posible debido a la baja densidad poblacional que ésta presenta (Puyana *et al.*, 2004), por lo cual se hace necesario buscar alternativas para el suministro sustentable de esta importante materia prima (extractos crudos de pseudopterosinas y seco-pseudopterosinas). Otros métodos que podrían ser ensayados comprenden síntesis químicas estereoselectivas, sin embargo, estos métodos son difíciles de llevar a cabo debido a la complejidad estructural de estos compuestos (presentan por lo menos cuatro centros quirales en la aglicona, sin considerar los del azúcar) y en muchos casos el proceso es inviable debido a su alto costo.

Lo considerado anteriormente exige una solución que para su implementación se necesita de la producción de conocimiento científico y tecnológico que sirva de soporte a la solu-

ción del problema del suministro para *P. elisabethae*. Investigaciones recientes (Mydlarz *et al.*, 2003) han venido demostrando que las pseudopterosinas y seco-pseudopterosinas en *P. elisabethae* del Caribe norte, son producidas por los simbiontes de este octocoral. Este descubrimiento explicaría el por qué existe tanta variabilidad de producción de estos compuestos entre individuos y localidades inclusive en sitios tan cercanos como en las islas de San Andrés y Providencia, donde hemos encontrado un quimiotipo distinto para las poblaciones que viven en cada una de estas islas, como lo mencionamos en la primera parte de este trabajo.

Así, uno de los caminos que creemos será de gran ayuda es la caracterización de los simbiontes de los especímenes de *P. elisabethae* que viven en Providencia, tendientes al establecimiento de cuál de ellos (dinoflagelados, bacterias, etc.) es el responsable de la producción de estos compuestos. Por supuesto cultivar un microorganismo es un proceso muchísimo más fácil que cultivar el macroorganismo entero o que utilizar procedimientos de síntesis complejos y costosos. Estudios en esta dirección se llevarán a cabo en los próximos años en nuestro laboratorio.

Agradecimientos

Carmenza Duque agradece a la Universidad Nacional de Colombia, a Colciencias y a la Fundación para la Ciencia y la Tecnología del Banco de la República por la financiación de las investigaciones presentadas, así como a la corporación Coralina por el permiso para la recolección del coral blando *Pseudoptero-gorgia elisabethae* y al Ministerio del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por el permiso de investigación y recolección de muestras para los trabajos en *antifouling*. Así mismo es importante mencionar que los anteriores resultados fueron el fruto de un trabajo conjunto del grupo de investigación que dirige C.D. “Estudio y aprovechamiento de productos naturales y frutas de Colombia” y en el cual intervinieron de manera importante los coinvestigadores: Mónica Puyana, Leonardo Castellanos, Oscar Osorno, Luis Fernando Ospina, Fabio Ancizar Aristizábal, Catalina Arévalo-Ferro, y Freddy Alejandro Ramos; y los estudiantes de posgrado: Hebelin Correa, Edisson Tello, Alba Lucía Valenzuela, Claudia Cordero, Jennyfer Mora-Cristancho, y las estudiantes de pregrado: Ginna Narváez y Andrea Arias. Por último es importante expresar nuestro profundo agradecimiento a la Dra. Claire Hellio de la School of Biological Sciences, University of Portsmouth, United Kingdom, por su ayuda en algunos de los ensayos *antifouling* mencionados.

Bibliografía

- Ata A, Kerr RG, Moya CE, Jacobs RS.** 2003. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron* 59:4215-4222.
- , **Win HY, Holt D, Holloway P, Segstro EP, Jayatilake GS.** 2004. New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Helv Chim Acta* 87:1090-1098.
- Bayer FM.** 1961. The shallow-water octocorallia of the west Indian Region. *Martinus Nijhoff, The Hague* 373 p.
- Berrue F, Kerr RG.** 2009. Diterpenes from gorgonian corals. *Nat. Prod. Rep.* 26: 681-710.
- Blunt JW, Copp BR, Hu W-P, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 26, 170-244 y todas las revisiones anteriores de los mismos autores citadas en esta referencia (2003-2008).
- Briand JF.** 2009. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* 25: 297-311.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G.** 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophils content with an enzyme marker. *J Invest Derm* 78:206-209.
- Cordero C, Aristizábal F.** 2002. Evaluación preeliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4: 100-106.
- Correa H.** 2007. Bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias antiinflamatorias, analgésicas y citotóxicas. Universidad Nacional de Colombia-Bogotá.
- , **Valenzuela AL, Ospina LO, Duque C.** 2009. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J Inflamm* 6:5:1-10.
- , **Duque C, Kerr R.** 2009. Antimicrobial and cytotoxic activity of pseudopterოსins and structurally related compounds isolated from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia island (SW Caribbean). Artículo en preparación.
- CYTED.** 2002. Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos antiinflamatorios. Subprograma X. Proyecto X.6. In Búsqueda y evaluación de nuevos agentes naturales con actividad antiinflamatoria y antiartrítica Collado Oliver, España.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM.** 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26:335-341.
- Duque C, Puyana M, Castellanos L, Arias A, Correa H, Osorno O, Asai T, Hara N, Fujimoto Y.** 2006. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia Islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron* 62:4205-4213.
- , **Narvaez G, Paz A, Osorno O, Hara N, Fujimoto Y.** 2004. Pseudopterოსins P-V, new compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron* 60:10627-10635.
- Faulkner DJ.** 2000. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 135-145.
- . 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19, 1-48 y todas las revisiones anteriores del mismo autor citadas en esta referencia (1977, 1984, 1986-2001).
- Fenical W.** 1987. Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. *J Nat Prod* 50:1001-1008.
- Ferns TA, Kerr RG.** 2005 Identification of amphilectosins as key intermediates in pseudopterოსin biosynthesis. *J Org Chem* 70:6152-6152.
- Gross H, König GM.** 2006. Terpenoids from marine organisms: unique structures and their pharmacological potential. *Phytochem Rev* 5:115-141.
- Gutierrez-Rodriguez C, Barbeitos MS, Sánchez JA, Lasker HR.** 2009. Phylogeography and morphological variation of the branching octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50:1-15.
- Haefner B.** 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *DDT* 8:536-544.
- Heckrodt TJ, Mulzer J.** 2005. Marine Natural Products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: Structures, Biosynthesis, Pharmacology, and Total Synthesis. In *Natural Products Synthesis II. Volume 244*. 1st edition. Edited by Mulzer J. New York: Springer Berlin Heidelberg 1-41.
- Johansson S, Göransson U, Luijendijk T, Backlund A, Claesson P, Bohlin L.** 2002. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod* 65:32-41.
- Kijoa A, Sawanwong P.** 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar Drugs*, 2:72-82.
- Look SA, Fenical W, Jacobs RS, Clardy J.** 1986. The pseudopterოსins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6238-6240.
- , **Fenical W.** 1987. The *seco*-pseudopterოსins: new anti-inflammatory diterpene-glycosides from a Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Pseudopterogorgia*. *Tetrahedron* 43: 3363-3370.
- Mans D, Da Rocha A, Schwartzmann G.** 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5:185-198.
- Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaux MT, Packer L.** 1994. The nitric oxide-scavenger properties of Ginkgo biloba extract EGB 761. *Biochem Biophys Res Commun* 15: 462-475.
- Mayer AMS, Jacobson PB, Fenical W, Jacobs RS, Glase, KB.** 1998. Pharmacological characterization of the pseudopterოსins: novel anti-inflammatory natural products isolated from the

- Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. Life Sciences 62:PL401-407.
- Mora-Cristancho JA, Arévalo-Ferro C, Ramos FA, Tello E, Duque C.** Antifouling activities against marine surface colonizer bacteria of extracts of marine invertebrates collected in the Colombian Caribbean Sea. To be Submitted.
- Mosmann T.** 1983. Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Meth 65, 55-63.
- Mydlarz L, Jacobs RS, Boehnlein J, Kerr RG.** 2003. Pseudopterosin Biosynthesis in *Symbiodinium* sp., the Dinoflagellate Symbiont of *Pseudopterogorgia*. Chem & Biol 10: 1051-1056.
- Potts BC, Faulkner DJ.** 1992. Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. J Nat Prod 55:1707-1717.
- Puyana M, Narvaez G, Paz A, Osorno O, Duque C.** 2004. Pseudopterosin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the Islands of San Andrés and Providencia (SW Caribbean). J Chem Ecol 30:1183-1201.
- Ramos FA, Tello E, Correa H, Duque C, Hellio C.** Artículo en preparación.
- Rodríguez II, Shi Y-P, García OJ, Rodríguez AD, Mayer AMS, Sánchez JA, Ortega E, González J.** 2004. New pseudopterosin and *seco*-pseudopterosin diterpene glycosides from two Colombian isolates of *Pseudopterogorgia elisabethae* and their diverse biological activities. J Nat Prod 67:1672-1680.
- Roussis V, Wu Z, Fenical W, Strobel SA, Van Duyn D, Clardy J.** 1990. New anti-inflammatory pseudopterosins from the marine octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. J Org Chem 55:4916-4922.
- Thornton RS, Kerr RG.** 2002. Induction of pseudopterosin biosynthesis in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. J Chem Ecol 28:2083-2090.

Recibido: septiembre 21 de 2009.

Aceptado para su publicación: diciembre 18 de 2009.