



BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS EN FUENTES MARINAS

Autor

Marcos Lugo Hernández

Grado en Farmacia

Curso Académico 2021-2022

Convocatoria de Julio

Tutor: José Javier Fernández Castro

Co-tutora: Nathália Peixoto Nocchi Carneiro

Área de Química Orgánica

RESUMEN

El ecosistema marino contiene gran parte de la biodiversidad del planeta y, por tanto, alberga una gran variedad de especies. Estas especies se encuentran en medios donde los metabolitos secundarios juegan un papel clave en su supervivencia. Los productos naturales obtenidos de estos organismos son una fuente de candidatos con potencial para convertirse en fármacos usados en el tratamiento de diversas patologías. Los microorganismos dinoflagelados y los invertebrados marinos son excelentes fuentes de metabolitos secundarios, por lo que son el principal enfoque de muchas líneas de investigación. Se analizan diferentes extractos, fracciones y productos de estos dos grupos de organismos marinos en la búsqueda de moléculas bioactivas que presenten una actividad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa, enzima presente en el sistema nervioso colinérgico. A partir de los prometedores resultados de actividad obtenidos, usando método de Ellman, se ha demostrado que los metabolitos de origen marino podrían utilizarse eficazmente como potenciales dianas terapéuticas anticolinesterasas.

ABSTRACT

The marine ecosystem contains much of the planet's biodiversity and is therefore home to a wide variety of species. These species are found in environments where secondary metabolites play a key role in their survival. Natural products obtained from these organisms are a source of candidates with the potential to be developed as drugs used in the treatment of various pathologies. Dinoflagellate microorganisms and marine invertebrates are excellent sources of secondary metabolites, so they are the main focus of many lines of research. Different extracts, fractions and products of these two groups of marine organisms are analysed in the search for bioactive molecules that have an inhibitory activity against the acetylcholinesterase, an enzyme present in the cholinergic nervous system. From the promising results of activity obtained, using Ellman's Method, it has been showed that marine origin metabolites could be used as potential anticholinesterase therapeutic targets.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Ecosistema marino como fuente de metabolitos bioactivos	5
1.2 Las colinesterasas	7
1.3 Inhibidores de la acetilcolinesterasa	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Procedimientos generales.....	11
3.2 Metodología de los ensayos de actividad	12
3.2.1 Ensayo de actividad acetilcolinesterasa por fluorescencia (kit comercial Invitrogen®)	12
3.2.2 Método de Ellman	13
3.2.3 Cálculo del porcentaje de inhibición.....	15
3.3 Cribado/Screening de los extractos	15
3.4 Fraccionamiento por HPLC/UV-DAD del extracto de <i>Zoanthus pulchellus</i>	20
3.5 Fraccionamiento bioguiado del extracto de <i>Amphidinium carterae</i> (ACRN03)	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Eficacia de los métodos	23
4.2 Cribado de los extractos (actividad de inhibición)	23
4.3 Fraccionamiento del extracto de <i>Zoanthus pulchellus</i>	25
4.4 Fraccionamiento bioguiado del extracto de <i>Amphidinium carterae</i> (ACRN03)	30
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1. Medicamento Prialt®.....	5
FIGURA 2. Estructura de la salinospiramida A.....	6
FIGURA 3. Estructura y presentación comercial de la trabectedina (ET-743)....	6
FIGURA 4. Estructura de la plitidepsina	6
FIGURA 5. Esquema del funcionamiento del sistema nervioso colinérgico. ⁽⁹⁾ ...	7
FIGURA 6. Estructura de fisosgtimina.....	8
FIGURA 7. Estructura de galantamina	8
FIGURA 8. Estructura de equinocromo A	9
FIGURA 9. Reacción de coloración y resultado en placas de 96 pocillos	14
FIGURA 10. Resumen del procedimiento general de extracción empleado para invertebrados marinos.....	16
FIGURA 11. Resumen del procedimiento general de extracción empleado para las cepas de dinoflagelado.....	17
FIGURA 12. Resumen de la marcha cromatográfica empleada para el extracto en metanol:tolueno (1:1) de la cepa ACRN03 (ACRN03.GK-MT) de <i>Amphidinium carterae</i>	22
FIGURA 13. Cromatograma HPLC 235 nm del extracto de <i>Zoanthus pulchellus</i> . I = Norzoantamina II = Zoantamina.	26
FIGURA 14. RMN H en CD ₂ Cl ₂ . I = Norzoantamina y II = Zoantamina.	27
FIGURA 15. Espectro de masas de la norzoantamina. ESI-HRMS: C ₂₉ H ₄₀ NO ₅ , m/z 482,3 [M + H] ⁺	28
FIGURA 16. Espectro de masas de la zoantamina. ESI-HRMS: C ₃₀ H ₄₂ NO ₅ , m/z 496,3 [M + H] ⁺	28
FIGURA 17. Estructura de la norzoantamina	29
FIGURA 19. Cinética del ensayo.....	29
FIGURA 20. Gráfica de actividad AChE obtenida en cada paso del fraccionamiento bioguiado. Fraccionamiento en columna de Sephadex (a). Fraccionamiento en columna de gel de sílice (b).	30

FIGURA 21. Espectro de RNM H del compuesto hallado en la fracción ACRN03-G	32
--	----

ÍNDICE TABLAS

TABLA 1. Esquema de volúmenes añadidos a los diferentes pocillos de la placa	13
TABLA 2. Extractos seleccionados para este estudio obtenidos de especies de invertebrados marinos	17
TABLA 3. Extractos seleccionados para este estudio obtenidos de especies de dinoflagelados marinos. GK= medio Guillard K modificado, ⁽¹⁷⁾ GSe= medio GP. ⁽¹⁸⁾	18
TABLA 4. Condiciones analítica y semipreparativa empleadas para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/UV-DAD) del extracto extracto de Z. pulchellus (ZP.MeOH-DCM). ACN= Acetonitrilo. H ₂ O= agua grado HPLC..	21
TABLA 5. Porcentajes de inhibición de invertebrados.....	24
TABLA 6. Porcentajes de inhibición de dinoflagelados	24
TABLA 7. Porcentajes de inhibición de los alcaloides de Zoanthus	29
TABLA 8. Porcentajes de inhibición de las fracciones de la columna empaquetada con Sephadex.....	31
TABLA 9. Porcentajes de inhibición de las fracciones de la columna empaquetada con gel de sílice	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ecosistema marino como fuente de metabolitos bioactivos

El océano cubre el 70% de la superficie terrestre, albergando gran parte de la biodiversidad de la Tierra. Muchas formas de vida habitan estos ecosistemas, que se caracterizan por ser medios hostiles con condiciones ambientales duras para la vida. Por otro lado, los organismos que viven en estos medios están sujetos a relaciones de depredación y, por tanto, existe un ambiente de competición entre diferentes especies.

Dichas condiciones han propiciado la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios por parte de los organismos marinos aumentando su supervivencia. Estos metabolitos secundarios provienen de microorganismos u organismos invertebrados, entre otros. Asimismo, estos compuestos tienen una gran variedad de aplicaciones al presentar actividad frente al cáncer, infecciones o diabetes.⁽¹⁾

Algunos de estos metabolitos se encuentran todavía en las diferentes fases clínicas de sus respectivos ensayos clínicos mientras que otros han sido comercializados.⁽²⁾ Ejemplos de estos productos naturales son:

- Ziconotida: se trata de un conopéptido o conotoxina sintetizada a partir de las toxinas de moluscos del género *Conus*. Es usado en pacientes con dolor severo crónico por administración intratecal bajo el nombre comercial Prialt® (**Figura 1**).⁽³⁾



FIGURA 1. Medicamento Prialt®

- Marizomib (Salinospiramida A): es un inhibidor del proteosoma usado frente al cáncer que actualmente se encuentra en desarrollo, concretamente en fase I (**Figura 2**).⁽⁴⁾

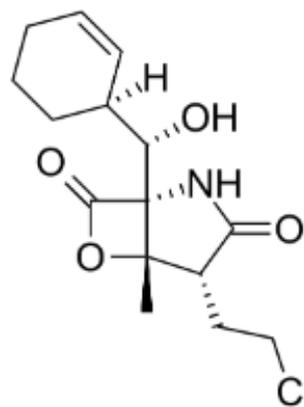


FIGURA 2. Estructura de la salinospiramida A

- Trabectedina (ET-743): alcaloide marino comercializado bajo el nombre Yondelis® y usado en el sarcoma de tejido blando (**Figura 3**).⁽⁵⁾



FIGURA 3. Estructura y presentación comercial de la trabectedina (ET-743)

- Plitidepsina (Aplidina): depsipéptido cíclico anticancerígeno que actualmente se encuentra en fase III (**Figura 4**).⁽⁶⁾

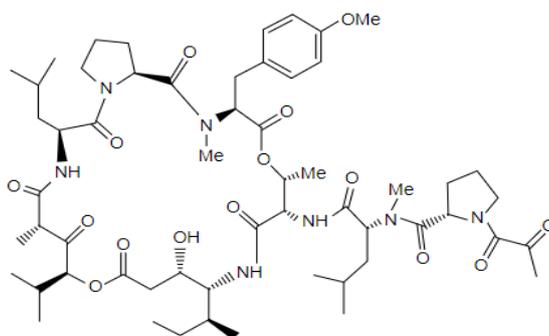


FIGURA 4. Estructura de la plitidepsina

1.2 Las colinesterasas

Por otro lado, muchos productos naturales también juegan un papel importante en los trastornos neurológicos, siendo usados como tratamiento para los mismos. Dentro de estas patologías destacan la enfermedad del Alzheimer, la miastenia gravis y el glaucoma.⁽⁷⁾

Actualmente se están investigando posibles terapias para estos trastornos, usando como diana terapéutica la enzima acetilcolinesterasa mediante el uso de moléculas bioactivas que la inhiban.⁽⁸⁾

Las colinesterasas son enzimas catalíticas que hidrolizan a la acetilcolina, principal neurotransmisor del sistema nervioso colinérgico. Existen dos colinesterasas: la acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa (pseudocolinesterasa). Una vez es liberada, la acetilcolina activa los receptores de acetilcolina (nicotínicos y muscarínicos) y posteriormente es hidrolizada de forma rápida por la acetilcolinesterasa dando como productos de esta hidrólisis acetato y colina (**Figura 5**).⁽⁹⁾

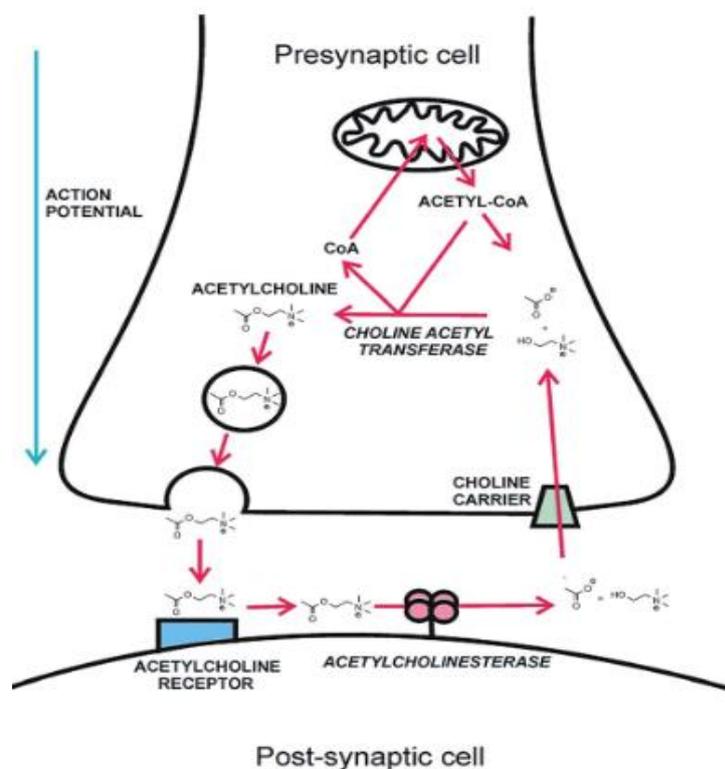


FIGURA 5. Esquema del funcionamiento del sistema nervioso colinérgico.⁽⁹⁾

1.3 Inhibidores de la acetilcolinesterasa

En la actualidad existen diferentes inhibidores de la acetilcolinesterasa comercializados para el tratamiento de trastornos neurológicos como los mencionados anteriormente. Estos fármacos actúan generalmente incrementando la disponibilidad de la acetilcolina en el sistema nervioso central inhibiendo a la acetilcolinesterasa.⁽¹⁰⁾

Son conocidos como agonistas colinérgicos indirectos y pueden inhibir a la colinesterasa de forma irreversible, uniéndose al grupo éster de la acetilcolinesterasa para formar el producto intermedio y que la enzima no pueda hidrolizar a la acetilcolina y, de forma reversible, donde el fármaco se une reversiblemente al grupo aniónico y/o al grupo éster de la enzima.⁽¹¹⁾

Algunos de ellos fueron obtenidos de fuentes naturales terrestres o marinas como es el caso de los siguientes metabolitos:

- *Fisostigmina*: alcaloide natural usado como antídoto en casos de intoxicación con algún agente anticolinérgico. Sus derivados se han usado en el tratamiento de la miastenia gravis (**Figura 6**).^(9,12)

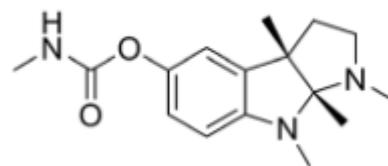


FIGURA 6. Estructura de fisostigmina

- *Galantamina*: alcaloide terciario que actúa como inhibidor reversible competitivo de la acetilcolinesterasa. Es usado en el tratamiento del Alzheimer enfocado en paliar los síntomas de la enfermedad (**Figura 7**).^(9,13)

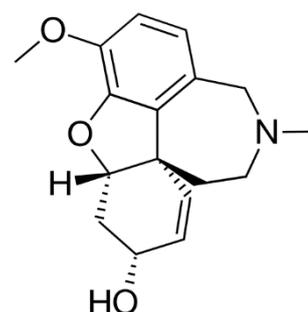


FIGURA 7. Estructura de galantamina

- *Equinocromo A*: metabolito de origen marino posteriormente modificado y comercializado bajo la marca HistoChrome® con propiedades vasoprotectoras y antiinflamatorias. Se usa en Rusia como tratamiento del síndrome coronario agudo (**Figura 8**).^(9,14)

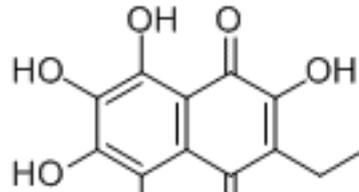


FIGURA 8. Estructura de equinocromo A

La búsqueda de nuevas moléculas con capacidad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa es, por tanto, una necesidad, y se convierte en el enfoque principal de este trabajo, utilizando los recursos naturales que podemos encontrar en el ecosistema marino.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de fin de grado fue la búsqueda de productos marinos que presentan una actividad inhibitoria frente a la enzima acetilcolinesterasa.

De esta manera, los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. Establecer una rutina de ensayo para evaluar la actividad inhibitoria frente a la acetilcolinesterasa de productos naturales mediante ensayos *in vitro*.
2. Realizar un cribado o screening de las muestras disponibles del banco de extractos del Laboratorio de Productos Marinos del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO) de la Universidad de La Laguna para la búsqueda de potenciales candidatos a fármacos agonistas colinérgicos indirectos.
3. Seleccionar los extractos más prometedores para fraccionamiento bioquímico y aislamiento de los productos naturales de interés.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Procedimientos generales

Reactivos

De manera general, todos los reactivos químicos y disolventes empleados en el desarrollo de este trabajo fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich:

- Acetylcholinesterase Fluorescent Activity Kit – Invitrogen®
- Fosfato monosódico (NaH_2PO_4) y fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico)
- Yodato de acetilcolina
- Acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (acetilcolinesterasa, tipo-VI-S, EC 3.1.1.7)
- Albúmina de suero bovino

Especificaciones de los equipos

- HPLC Serie 1200 de Agilent Technologies compuesta por una bomba cuaternaria G13311C, muestreadores automáticos y colectores de fracciones G1364C, un detector de índice de refracción (RID) Infinity G1362A y una matriz de detección de diodos ultravioleta (UV-DAD) G1315D.
- Cromatografía de capa fina (TCL - Merck®, gel de sílice 60 F254) visualizado por luz UV (254nm) y rociado con cloruro de cobalto (2% ácido sulfúrico, 10%) y con calor.
- Espectrómetro RMN Bruker AVANCE 500 MHz ó 600 MHz (Bruker Biospin, Falländen, Suiza). El dispositivo Bruker AVANCE 600 MHz está equipado con una criosonda de detección inversa TCI de 5 mm (Bruker Biospin, Falländen, Suiza). Se utilizaron secuencias de pulsos de RMN de Bruker estándar. Los espectros de RMN 1D (protón ^1H y carbono ^{13}C) y 2D (espectroscopía de correlación - COSY, correlación de enlace múltiple heteronuclear - HMBC y correlación cuántica simple heteronuclear - HSQC) se obtuvieron disolviendo muestras en diclorometano deuterado (CD_2Cl_2 , pureza 99.9%, Sigma- Aldrich®) o cloroformo-d (CDCl_3 , pureza 99,96 %, Sigma-Aldrich®), según su solubilidad. Los espectros de RMN

resultantes se analizaron mediante el software MestReNova (Mestrelab Research). Los desplazamientos químicos se muestran en relación con las señales de disolvente para ^1H y ^{13}C (CD_2Cl_2 , δ_{H} 5,32 y δ_{C} 54,00; CDCl_3 , δ_{H} 7,26, δ_{C} 77,0), en los que el desplazamiento químico se expresa en partes por millón (ppm).

- Lector de microplacas multimodo de fluorescencia y absorbancia Varioskan LUX Thermo Fisher.
- Los datos de HR-ESI-MS se obtuvieron en un Waters LCT Premier XE Micromass (Manchester, Reino Unido).

3.2 Metodología de los ensayos de actividad

Durante el desarrollo de la parte experimental de ensayos de actividad del trabajo se utilizaron dos métodos diferentes para evaluar la actividad inhibitoria de las muestras frente a la acetilcolinesterasa. Primero se empezó utilizando el kit comercial para todas las muestras seleccionadas. Posteriormente se empleó otro ensayo conocido como el método de Ellman.

3.2.1 Ensayo de actividad acetilcolinesterasa por fluorescencia (kit comercial Invitrogen®)

Es un ensayo diseñado, originalmente, para medir la concentración de acetilcolinesterasa en suero, plasma, membranas de eritrocitos, células y tejidos lisados usando espectroscópica de fluorescencia o fluorimetría. El kit usa molécula no fluorescente que se une covalentemente al tiol, producto de la reacción entre la acetilcolinesterasa y el sustrato, produciendo así un producto fluorescente. Por lo tanto, a mayor fluorescencia, menor actividad inhibitoria de la muestra frente a la acetilcolinesterasa.

Durante la planificación de este ensayo se modificó el protocolo descrito en el kit ⁽¹⁵⁾ para adecuarlo a nuestras muestras y objetivos. Por eso, todos los pocillos con muestra fueron pipeteados con la enzima acetilcolinesterasa y la concentración final de las muestras empleadas fue de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Se diluyó el tampón con agua desionizada y se reconstituyó el reactivo de detección y la enzima acetilcolinesterasa con DMSO seco. Posteriormente preparamos la mezcla de reacción compuesta por: el sustrato de la acetilcolinesterasa (acetilcolina yodada), el reactivo de detección y DMSO seco.

Las muestras fueron pipeteadas en los pocillos de una placa negra de 96 pocillos y seguidamente se pipeteó la mezcla de reacción. Cada muestra se pipeteó por triplicado y se añadieron tres muestras más: un blanco sin el estándar de acetilcolinesterasa, un control que sí contiene el estándar y el vehículo que contiene DMSO (usado para solubilizar las muestras). Se incubaron durante 30 minutos y finalmente se añadió el estándar de acetilcolinesterasa para iniciar la reacción (**Tabla 1**). La fluorescencia fue leída en el lector de microplacas Varioskan Lux durante 20 min con intervalos de lectura de 1 min a una emisión de 510 nm y una excitación de 390 nm.

TABLA 1. Esquema de volúmenes añadidos a los diferentes pocillos de la placa

Well	Group	Sample 25 mg/mL	DMSO	1X Assay Buffer	Acetylcholinesterase Standard	Reaction Mix	Total volume
B	Blank			100 µL		50 µL	150 µL
C	Control			95 µL	5 µL	50 µL	150 µL
V	Vehicle		0.3 µL	95 µL	5 µL	50 µL	150.3 µL*
S	Sample	0.3 µL		95 µL	5 µL	50 µL	150.3 µL*

* 0.2% irrelevant increase

3.2.2 Método de Ellman

Es uno de los métodos más utilizados para medir la actividad de la colinesterasa, porque determina tioles a bajas concentraciones.⁽¹⁶⁾ Este método detecta la presencia de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato de acetiltiocolina por la acetilcolinesterasa.

La tiocolina reacciona con el reactivo cromóforo, el DTNB (reactivo de Ellman), dando lugar a un producto de coloración amarilla cuya absorbancia es medida a una longitud de onda de 412 nm (**Figura 9**). De este modo, cuanto mayor coloración amarilla, menor actividad inhibitoria tendrá la muestra.

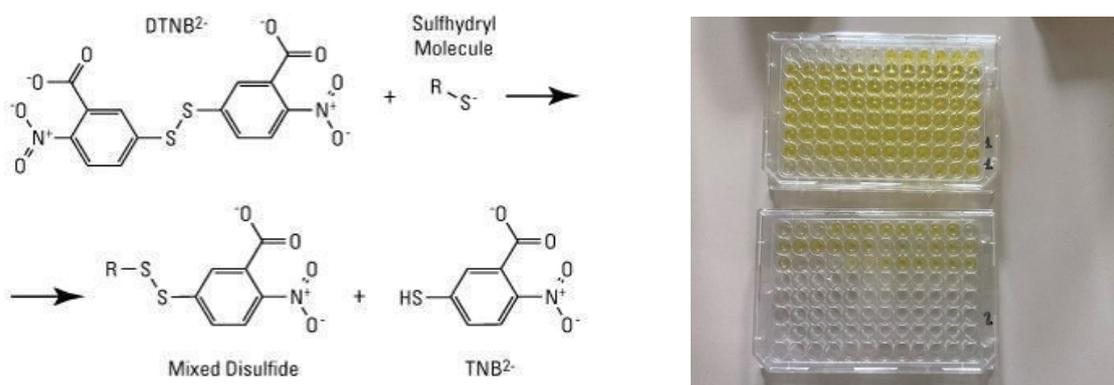


FIGURA 9. Reacción de coloración y resultado en placas de 96 pocillos

Para este método se preparó un tampón fosfato 0,1 M pH 8,0 usando dos sales: Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄. Con esta disolución se reconstituyó el reactivo DTNB a una concentración 3 mM y simultáneamente se preparó otra disolución de yodato de acetilcolina 75 mM con agua destilada.

La enzima se preparó usando albúmina y las dos sales mencionadas anteriormente. Se diluyó la enzima con este tampón hasta llegar a una concentración de 1 mU/ml.

Para cada pocillo se pipetearon: 2,5 µL de enzima, 5 µL de DTNB y 237,5 µL de tampón fosfato. Se prepararon dos tipos de blanco en la placa: uno sin acetiltiocolina y otro sin enzima. A parte de los blancos también se prepararon el control y el vehículo (DMSO). Las placas fueron incubadas durante 30 minutos con agitación y finalmente se pipeteó el yodato de acetiltiocolina con ayuda de la pipeta multicanal para iniciar la reacción. La placa se leyó en el lector Varioskan LUX a 412 nm durante 10 min con intervalos de lectura de 1 min. Cada muestra se ensayó por triplicado.

3.2.3 Cálculo del porcentaje de inhibición

El cálculo de los porcentajes de inhibición presentados en este trabajo son los obtenidos por el método de Ellman.

Se halló la pendiente (velocidad de la reacción) de cada muestra usando los valores de absorbancia en cada intervalo. A todos los valores de pendiente se restó el valor de la pendiente del blanco sin enzima. Posteriormente se usó la siguiente fórmula para hallar el porcentaje de actividad de la acetilcolinesterasa, utilizando los valores obtenidos para el vehículo como el 100% de la actividad de la enzima:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\text{valor pendiente muestra}}{\text{valor pendiente vehículo}} \times 100$$

Para calcular el porcentaje de inhibición seguimos la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ Actividad}$$

Una vez obtenido cada valor de inhibición para cada réplica de cada muestra hacemos el promedio y obtenemos el resultado final de inhibición.

3.3 Cribado/Screening de los extractos

Para el desarrollo de este trabajo se hizo uso de parte del banco de extractos del Laboratorio de Productos Marinos del IUBO. Se pudo dividir estos extractos en dos grandes grupos de taxones: los extractos provenientes de invertebrados y extractos de dinoflagelados (**Tablas 1 y 2**).

El proceso de extracción de los metabolitos llevado a cabo para cada muestra se realizó de acuerdo con metodologías específicas ya establecidas por los Grupo de Productos Marinos para cada tipo de organismo, dependiendo de sus características químicas. De manera general, los extractos de los invertebrados marinos se obtuvieron del organismo completo liofilizado por

medio de maceración en diferentes disolventes (**Tabla 1**). La figura 10 resume el procedimiento general de extracción empleado para los invertebrados marinos.

El procedimiento de extracción para los dinoflagelados se inició con el protocolo de cultivo ya establecido en el laboratorio con distintos medios de acuerdo con la característica de las cepas. Tras el periodo necesario de crecimiento de cada cepa para que alcance el final de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, el volumen de cultivo fue centrifugado para separar las células y medio, y la biomasa celular fue extraída en metanol (**Tabla 2**). La figura 11 presenta el resumen del procedimiento de cultivo y extracción de las células de dinoflagelados.

Todas las extracciones fueran asistidas por ultrasonido, filtradas y el disolvente fue evaporado con ayuda del rotavapor. Los extractos obtenidos fueron almacenados a -5°C .

Los extractos fueron ensayados en ese estudio para determinar su actividad enzimática sobre acetilcolinesterasa. Posteriormente, a partir de los extractos más activos, se emplearon técnicas cromatográficas para aislamiento de sustancias responsables de la actividad inhibitoria sobre la acetilcolinesterasa.



FIGURA 10. Resumen del procedimiento general de extracción empleado para invertebrados marinos

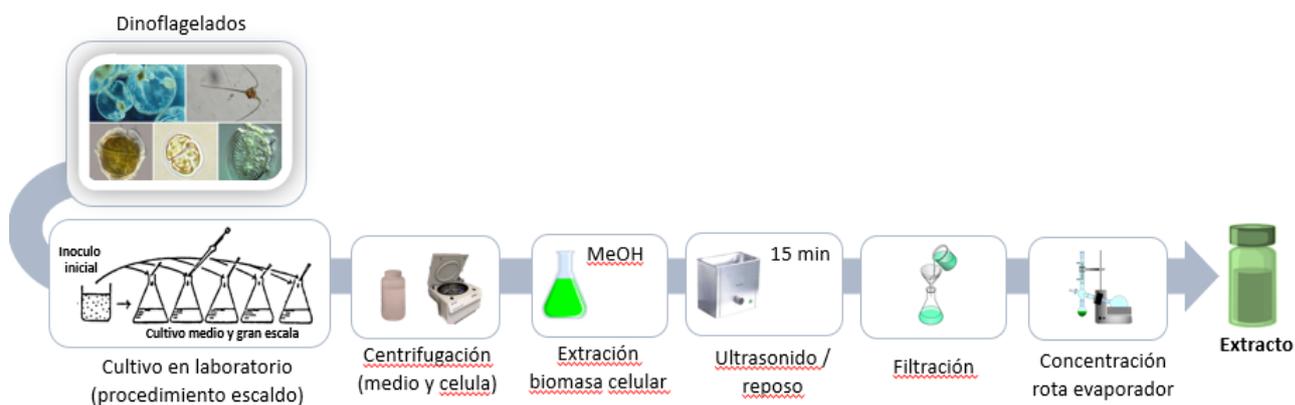


FIGURA 11. Resumen del procedimiento general de extracción empleado para las cepas de dinoflagelado

TABLA 2. Extractos seleccionados para este estudio obtenidos de especies de invertebrados marinos

INVERTEBRADOS			
Código extracto	Especie	Lugar de recolección	Extracción
TC.AcEt	<i>Tubastraea coccinea</i>	Santa Cruz de Tenerife	Acetato de etilo
TC.MeOH		(Santa Cruz de Tenerife, España)	Metanol
PC.MeOH	<i>Palythoa caribaeorum</i>	Tajao (Santa Cruz de Tenerife, España)	Metanol
ZP.MeOH-DCM	<i>Zoanthus pulchellus</i>	Punta del Hidalgo (Santa Cruz de Tenerife, España)	Metanol:Diclorometano (1:1)
CT.DCM	<i>Coscinasterias tenuispina</i>	Santa Cruz de Tenerife	Extracción secuencial – parte Diclorometano

CT.HEX	(Santa Cruz de Tenerife, España)	Extracción secuencial – parte Hexano
---------------	----------------------------------	--------------------------------------

TABLA 3. Extractos seleccionados para este estudio obtenidos de especies de dinoflagelados marinos. GK= medio Guillard K modificado,⁽¹⁷⁾ GSe= medio GP.⁽¹⁸⁾

DINOFLAGELADOS					
Código extracto	Código Cepa	Especie	Lugar de recolección	Medio de cultivo	Extracción (células)
VGO791	VGO791	<i>Gambierdiscus ecentrecus</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
VGO1180	VGO1180	<i>Gambierdiscus silvae</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
VGO1397	VGO1397	<i>Gambierdiscus carolians</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
VGO1270	VGO1270	<i>Gambierdiscus australes</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
VGO1278	VGO1278	<i>Gambierdiscus australes</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
VGO1250	VGO1250	<i>Gambierdiscus australes</i>	Punta del Hidalgo	GK	Metanol

			(Tenerife, España)		
VGO1198	VGO1198	<i>Gambierdiscus australes</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
AMTF.1.CK			Punta del	GK	Metanol
AMTF.1.CGSe	AMTF-1	<i>Amphidinium carterae</i>	Hidalgo (Tenerife, España)	GSe	Metanol
AMTF.3.CK			Punta del	GK	Metanol
AMTF.3.CGSe	AMTF-3	<i>Amphidinium sp.</i>	Hidalgo (Tenerife, España)	GSe	Metanol
ACRN03.CK- MT	ACRN03	<i>Amphidinium carterae</i>	Isla de Reunión (Archipiélag o de las Mascareñas , Este de Madagascar , Ultramar Francés)	GK	Metanol: Tolueno (1:1)
CMCV-2	CMCV-2	<i>Chattonella marina</i>	Bahía de la Paz (Baja California Sur, México)	GSe	Metanol
Bapaz	Bapaz-10	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Bahía Concepción (Baja California)	GSe	Metanol

			Sur, México)		
Gimp Baco	GIMP BACO-13	<i>Gymnodinium impudicum</i>	Bahía de la Paz (Baja California Sur, México)	GSe	Metanol
COTF.1.CK	COTF-1	<i>Coolia</i> sp.	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
COTF.2.CK	COTF-2	<i>Coolia canariensis</i>	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol
COTF.3.CK	COTF-3	<i>Coolia</i> sp.	Punta del Hidalgo (Tenerife, España)	GK	Metanol

3.4 Fraccionamiento por HPLC/UV-DAD del extracto de *Zoanthus pulchellus*

Inicialmente, para evaluar el perfil químico y desarrollar un método de separación, el extracto del hidro coral *Z. pulchellus* (ZP.MeOH-DCM) fue sometido a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés “*High performance liquid chromatography*”) con un detector de matriz de diodos ultravioleta (UV-DAD) en modo analítico. Posteriormente, los metabolitos mayoritarios del extracto fueron aislados por HPLC en modo semipreparativo. Las condiciones empleadas en los análisis de HPLC están detalladas en la tabla 3. Al final de la separación cromatográfica, fue posible purificar los compuestos **1** y **2**. Las sustancias aisladas fueron analizadas por técnicas espectroscópicas de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC) e EM.

Antes de cada análisis en HPLC las muestras fueran filtradas en filtros de PTFE de 0,45 μm (Chromafil®). Los datos de DAD se registraron en un rango de 190 a 400 nm, y la detección fue realizada en 235 nm.

TABLA 4. Condiciones analítica y semipreparativa empleadas para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/UV-DAD) del extracto de *Z. pulchellus* (ZP.MeOH-DCM). ACN= Acetonitrilo. H₂O= agua grado HPLC.

HPLC	Columna	Método **	Flujo	Concentración de la muestra - volumen de inyección
Analítico	Luna® C18 (250x4.6mm, 5 μm , 100 Å)	Gradiente de elución: Primera rampa desde el 100% de H ₂ O hasta el 40:60 de ACN:H ₂ O en 30 minutos. Seguida de una segunda rampa hasta el 100% de ACN en 10 minutos. Finalizando con un sistema final	1 mL/min	10 mg/mL de ACN - 20 μL
Semipreparativo*	Luna® C18 (250x100mm, 5 μm , 100 Å).	isocrático con 100% de ACN durante 10 minutos. Tiempo total de análisis: 50 minutos	2,5 mL/min	15 mg/ 200 μL de ACN - 200 μL

* Las fracciones se recogieron en el colector automático. El tiempo de recogida fue de 0,5 min/tubo de ensayo.

** Todos los disolventes empleados se filtraron utilizando filtros de fibra de vidrio (Millipore®, grado GF/F, tipo 1, tamaño de poro de 1,6 μm , 47 mm de diámetro) y se sonicaron durante 15 minutos antes de los análisis.

3.5 Fraccionamiento bioguiado del extracto de *Amphidinium carterae* (ACRN03)

El extracto en metanol:tolueno obtenido a partir de células de la cepa ACRN03 del dinoflagelado *A. carterae* (ACRN03.GK-MT = 3g) fue sometido a una marcha cromatográfica empleando distintas fases estacionarias. El proceso de separación empezó con una cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna empaquetada con Sephadex LH-20 (24 cm x 6,5 cm Ø) eluida en metanol:diclorometano:hexano (2:1:1). Fueron recolectadas un total de 51 fracciones de 25 ml cada una, que, de acuerdo con los perfiles observados en CCD, fueran reunidas en 3 fracciones finales (ACRN03-SPX.1 = 1,83 g; ACRN03-SPX.2 = 0,99 g y ACRN03-SPX.3 = 0,17 g). Las tres fracciones fueran sometidas de actividad inhibitorias frente acetilcolinesterasa.

A partir de los resultados de actividad, la fracción ACRN03-SPX.2 (500 mg) fue elegida para una nueva separación en una columna empaquetada con gel de sílice F60 (40 cm x 2,5 cm Ø), utilizando un gradiente de elución con diclorometano-metanol que proporcionó, después de la reunión por similitud en CCD, 14 fracciones. Después de la recolección de todas las fracciones obtenidas, éstas se analizaron mediante técnicas espectroscópicas de RMN (1H). Además, todas estas fracciones también fueron evaluadas frente a la acetilcolinesterasa.

La figura 12 resume los pasos empleados en la marcha cromatográfica del extracto en metanol:tolueno de ACRN03.

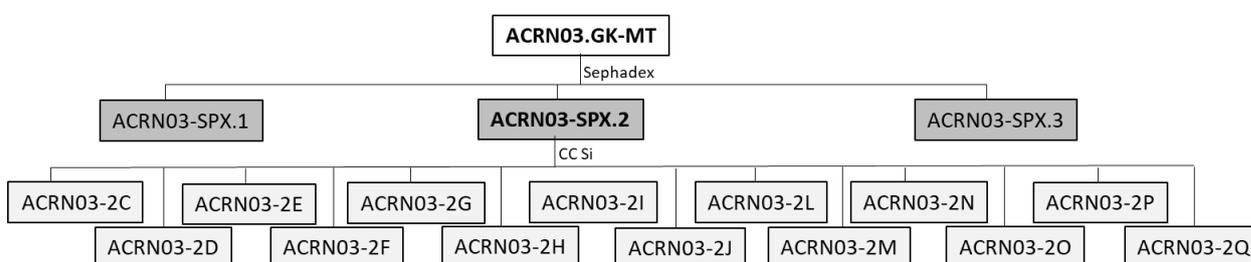


FIGURA 12. Resumen de la marcha cromatográfica empleada para el extracto en metanol:tolueno (1:1) de la cepa ACRN03 (ACRN03.GK-MT) de *Amphidinium carterae*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Eficacia de los métodos

En este trabajo se utilizaron dos métodos para evaluar la actividad inhibitoria acetilcolinesterasa de las muestras ensayadas: el kit de fluorescencia de acetilcolinesterasa y el método de Ellman.

Durante el transcurso del desarrollo experimental se obtuvieron resultados fuera de los parámetros establecidos por el kit comercial al usar el método de fluorescencia. Posteriormente, a pesar de los cambios empleados en la metodología, se llegó a la conclusión de que este no era el método adecuado para la valoración de la inhibición de la acetilcolinesterasa en ensayos farmacológicos para la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas anticolinesterasas. El kit fue diseñado para la cuantificación de acetilcolinesterasa en muestras de suero, plasma, membranas de eritrocitos, células y tejido lisado.

Por lo tanto, empleamos el método de Ellman para valorar la acetilcolinesterasa por medio de espectroscopía de absorbancia. Este método está enfocado para medir la actividad de la colinesterasa porque detecta tioles a bajas concentraciones, por lo que nos pareció un ensayo más acertado para la búsqueda de sustancias con actividad anticolinesterasa. Por otro lado, el kit comercial presentaba mucho DMSO en el medio de reacción, influyendo en la actividad de la enzima y enmascarando la inhibición de esta.

4.2 Cribado de los extractos (actividad de inhibición)

En este trabajo se evaluó un total de 24 extractos, donde el 75 % presentó un porcentaje de inhibición entre 0-50%, el 21% entre 50 y 90% de inhibición y el 4% de los extractos presentaron un porcentaje de inhibición superior a 90%. Las tablas 5 y 6 contienen los resultados del ensayo de actividad expresados como porcentaje de inhibición.

TABLA 5. Porcentajes de inhibición de invertebrados

INVERTEBRADOS	
Código	Porcentaje de inhibición
TC.AcEt	40,93%
TC.MeOH	40,32%
PC.MeOH	16,72%
ZP.MeOH-DCM	94,32%
CT.DCM	11,98%
CT.HEX	17,09%

En el caso de los invertebrados, el extracto ZP.MeOH-DCM (*Zoanthus Puchellus*) presentó una excelente actividad anti-acetilcolinesterasa siendo el único extracto que se encuentra en un rango de inhibición del 90-100%, con un porcentaje de inhibición del 94,32% (**Tabla 5**).

TABLA 6. Porcentajes de inhibición de dinoflagelados

DINOFLAGELADOS	
Código	Porcentaje de inhibición promedio
VGO791	26,18%
VGO1180	35,60%
VGO1397	45,30%
VGO1270	50,20%
VGO1278	23,63%
VGO1250	38,14%
VGO1198	54,54%
AMTF.1.CK	56,02%
AMTF.1.CGSe	21,12%
AMTF.3.CK	25,83%
AMTF.3.CGSe	31,91%
ACRN03.CK-MT	54,07%

CMCV-2	15,33%
Bapaz	18,81%
Gimp Baco	59,01%
COTF.1.CK	36,57%
COTF.2.CK	26,73%
COTF.3.CK	25,63%

En cuanto a los dinoflagelados, varios extractos dieron buena actividad con valores superiores a 50% de inhibición: VGO1198 (54,54%), AMTF.1.CK (56,02%), ACRN03.CK-MT (54,07%) y Gimp Baco (59,01%) (**Tabla 6**). De todos estos extractos ACRN03.CK-MT era del que más cantidad de material se disponía para seguir el fraccionamiento bioguiado.

Analizando los resultados obtenidos se decidió fraccionar el extracto ACRN03.CK-MT de dinoflagelados y el extracto ZP.MeOH-DCM de invertebrados para el aislamiento de metabolitos activos.

4.3 Fraccionamiento del extracto de *Zoanthus pulchellus*

El extracto de *Z. pulchellus* fue el que presentó mayor actividad de inhibición de la acetilcolinesterasa. El perfil químico por HPLC-UV/DAD analítico de este extracto reveló la presencia de dos compuestos mayoritarios (pico), el compuesto 1 (RT=25,518 min) y el compuesto 2 (RT= 26,068 min) (**Figura 13**). Estas dos sustancias fueron aisladas por HPLC-UV/DAD en modo semipreparativo y caracterizadas estructuralmente con auxilio de técnicas espectroscópicas de RMN y MS. Comparando los datos de RMN (**Figura 14**) y MS (**Figuras 15 y 16**) con la literatura disponible fue posible determinar que la estructura de los compuestos aislados correspondía a las conocidas norzoantamina (I) (**Figura 17**) y zoantamina (II) (**Figura 18**), importantes alcaloides previamente aislados de *Zoanthus*(19).

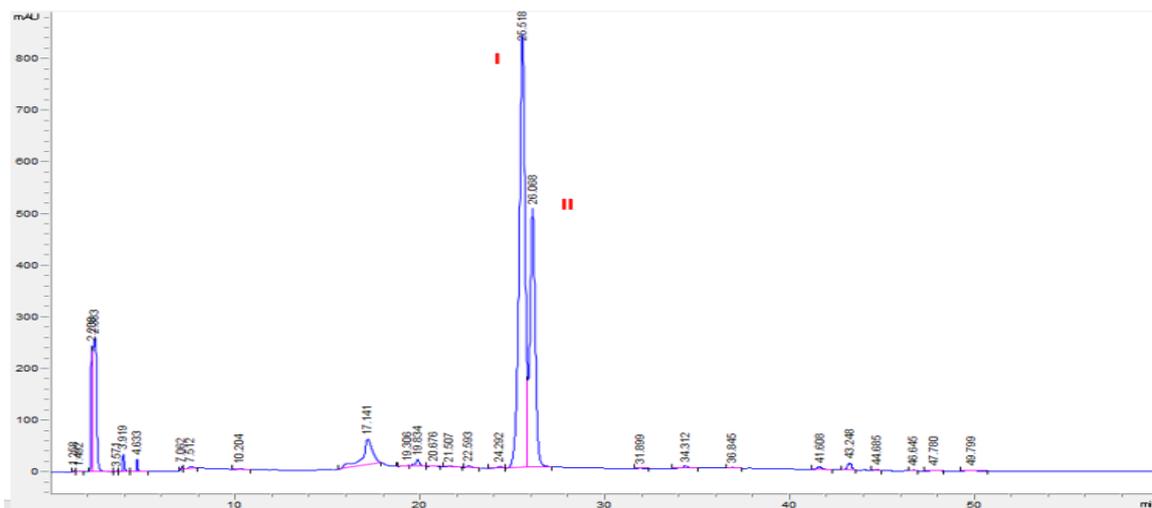


FIGURA 13. Cromatograma HPLC 235 nm del extracto de *Zoanthus pulchellus*. I = Norzoantamina II = Zoantamina.

La caracterización de ambos los compuestos se puede verificar, a parte de los análisis de todos los datos de RMN, mediante la observación dos singletes (1,13 y 2,84 ppm) en el espectro de ^1H RMN de la norzoantamina, y un doblete (1,15 ppm) y un quintuplete (2.92 ppm) en el espectro de ^1H RMN de la zoantamina (**Figura 14**). Las estructuras fueran confirmadas con los datos de masas de alta resolución, la fórmula molecular de la norzoantamina se estableció por ESI-HRMS como $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_5$ (m/z 481,3; calculado para 482,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$) (**Figura 15**) y de la zoantamina como $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{NO}_5$ (m/z 495,3; calculado para 496,3 $[\text{M} + \text{H}]^+$) (**Figura 16**).

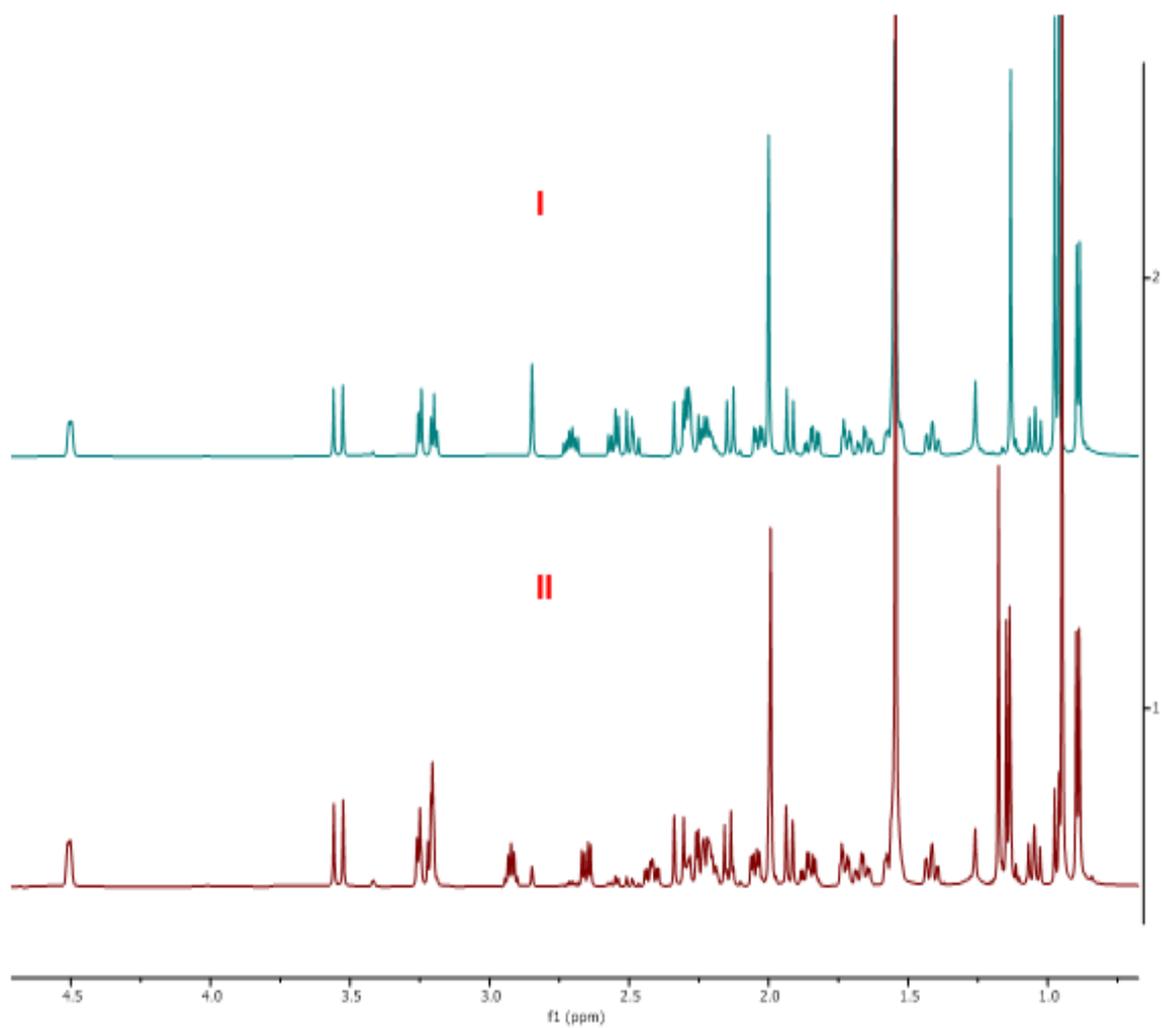


FIGURA 14. RMN H en CD_2Cl_2 . I = Norzoantamina y II = Zoantamina.

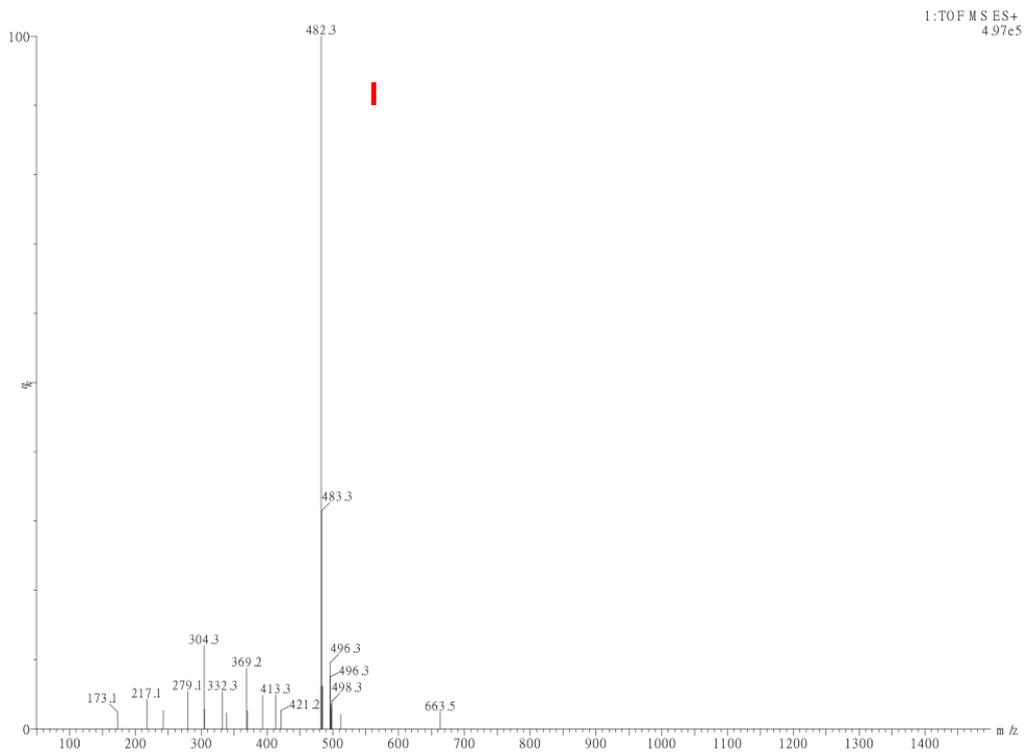


FIGURA 15. Espectro de masas de la norzoantamina. ESI-HRMS: $C_{29}H_{40}NO_5$, m/z 482,3 [M + H]⁺

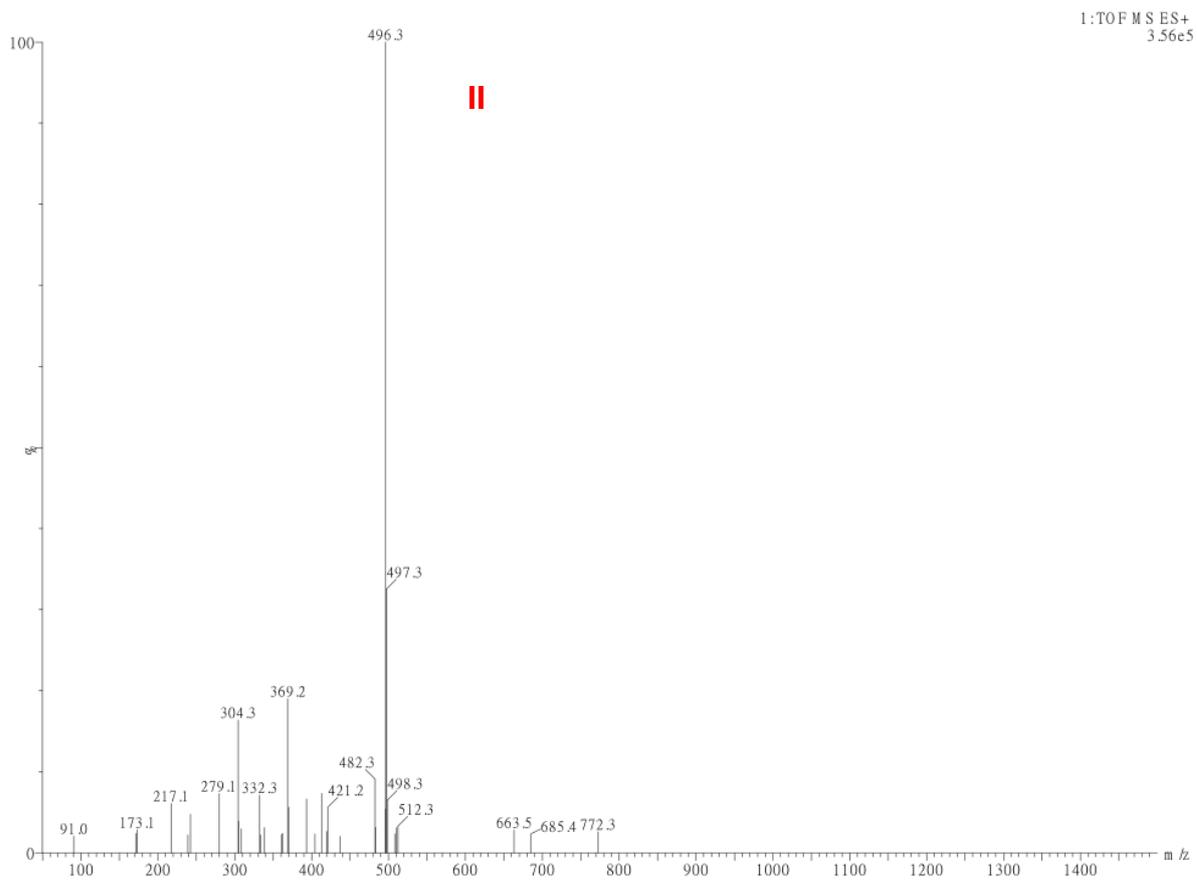


FIGURA 16. Espectro de masas de la zoantamina. ESI-HRMS: $C_{30}H_{42}NO_5$, m/z 496,3 [M + H]⁺

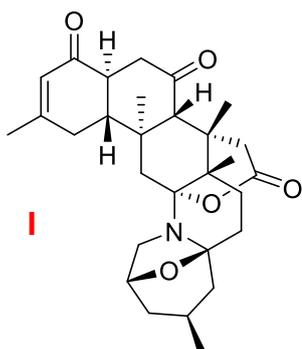


FIGURA 17. Estructura de la norzoantamina

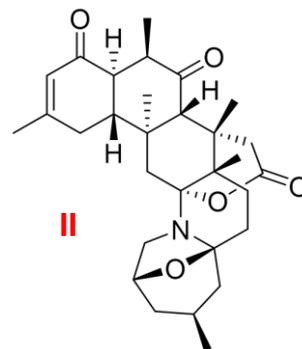


FIGURA 18. Estructura de la zoantamina

La norzoantamina (**Figura 17**) y zoantamina (**Figura 18**) fueron ensayadas para determinar su actividad inhibitoria. A pesar de que el extracto de *Z. pulchellus* (ZP.MeOH-DCM) presentó muy excelente actividad inhibitoria, tanto la norzoantamina y zoantamina presentan valores bajos en comparación (**Tabla 7**) (**Figura 19**). Es probable que la acción inhibitoria de la acetilcolinesterasa encontrada en el extracto de extracto de *Z. pulchellus* sea producto de otra molécula minoritaria o de una sinergia entre varias moléculas.

TABLA 7. Porcentajes de inhibición de los alcaloides de *Zoanthus*

Código	Porcentaje de inhibición
ZP.MeOH-DCM	94,32%
Zoantamina	21,43%
Norzoantamina	31,84%

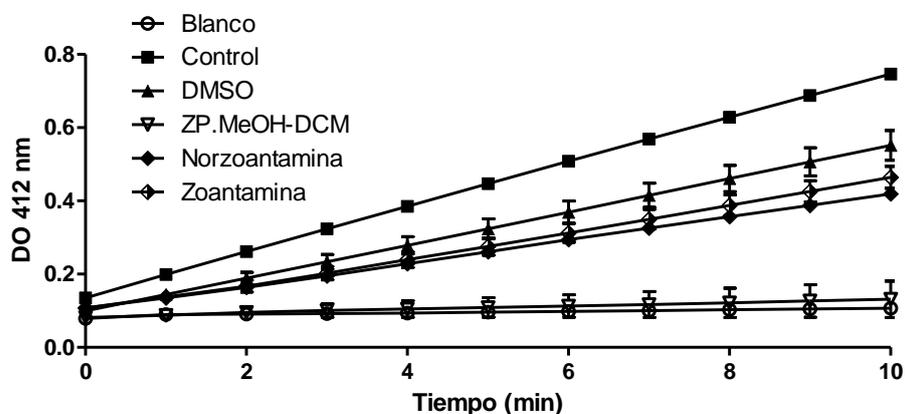


FIGURA 19. Cinética del ensayo

4.4 Fraccionamiento bioguiado del extracto de *Amphidinium carterae* (ACRN03)

Para este extracto fue empleada la estrategia del fraccionamiento bioguiado para el aislamiento de las sustancias activas (**Figura 20**).

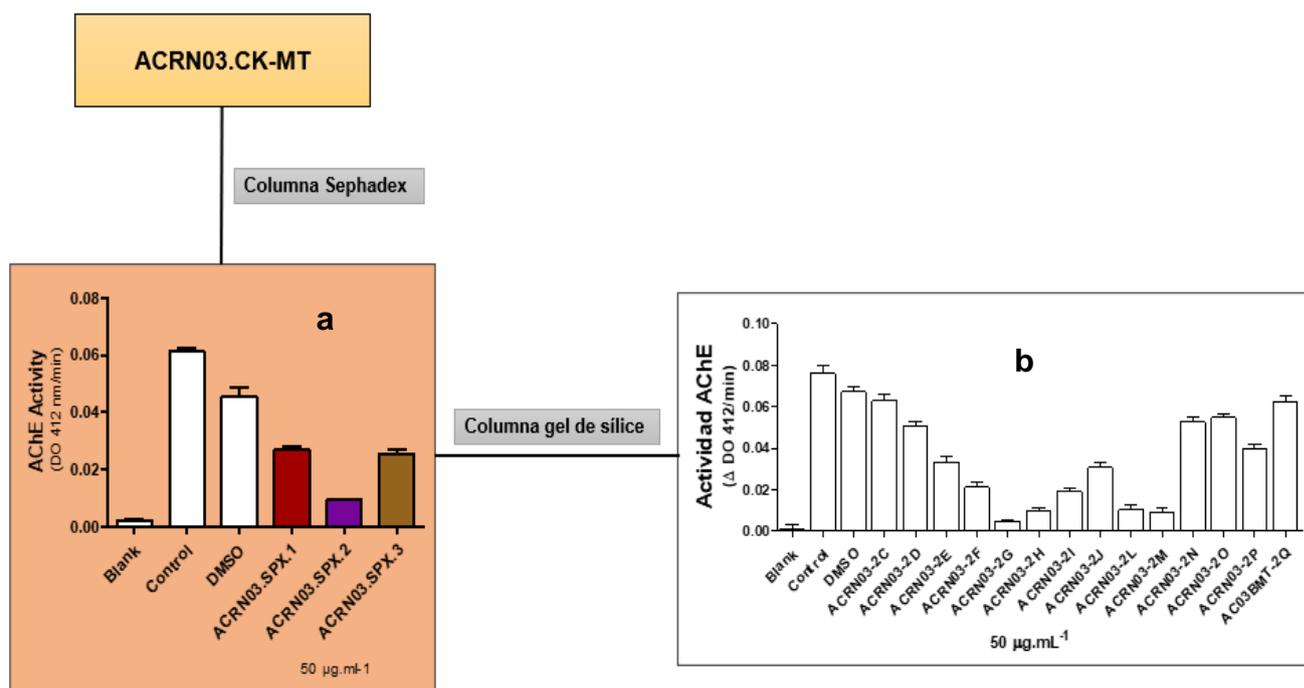


FIGURA 20. Gráfica de actividad AChE obtenida en cada paso del fraccionamiento bioguiado. Fraccionamiento en columna de Sephadex (a). Fraccionamiento en columna de gel de sílice (b).

Inicialmente se obtuvieron 3 fracciones en la columna empaquetada con Sephadex. Estas fracciones fueron ensayadas obteniendo sus respectivos porcentajes de inhibición (**Tabla 8**). De las tres fracciones obtenidas solamente la fracción ACRN03.SPX.2 presentó una inhibición alta (83,97%). Por consiguiente, se decidió fraccionar la fracción ACRN03.SPX.2 en una columna empaquetada con gel de sílice, obteniendo otras 14 fracciones que también fueron ensayadas.

TABLA 8. Porcentajes de inhibición de las fracciones de la columna empaquetada con Sephadex

Código	Porcentaje de inhibición
ACRN03.SPX.1	43,12%
ACRN03.SPX.2	83,97%
ACRN03.SPX.3	46,22%

Del segundo fraccionamiento, la fracción con mayor actividad fue ACRN03-G (**Tabla 9**), presentando un porcentaje de inhibición de 94,85%. Cabe destacar otras fracciones también presentaran buena actividad inhibitoria: ACRN03-H (86,80%), ACRN03-L (86,12%) y ACRN03-M (88,10%), por lo que es probable que haya más de una sustancia activa.

TABLA 9. Porcentajes de inhibición de las fracciones de la columna empaquetada con gel de sílice

Código	Porcentaje de inhibición
ACRN03-2C	6,43%
ACRN03-2D	25,60%
ACRN03-2E	51,36%
ACRN03-2F	69,80%
ACRN03-2G	94,85%
ACRN03-2H	86,80%
ACRN03-2I	72,92%
ACRN03-2J	55,54%
ACRN03-2L	86,12%
ACRN03-2M	88,10%
ACRN03-2N	22,13%
ACRN03-2O	18,96%
ACRN03-2P	41,94%
ACRN03-2Q	7,75%

Posteriormente se realizó una RMN ^1H de la fracción ACRN03-G, su espectro evidenció señales correspondientes a los distintos tipos de protones presentes en un esteroide (Figura 21), como el doblete con desplazamiento δ_{H} 4,15 ppm correspondiente al grupo -OH, las señales a δ_{H} 0,84 – 0,94 ppm correspondiente al acoplamiento de los protones de los grupos metilos -CH₃, y una señal de protones olefínicos a δ_{H} 5,41 ppm. Este esteroide se encuentra en proceso de elucidación estructural.

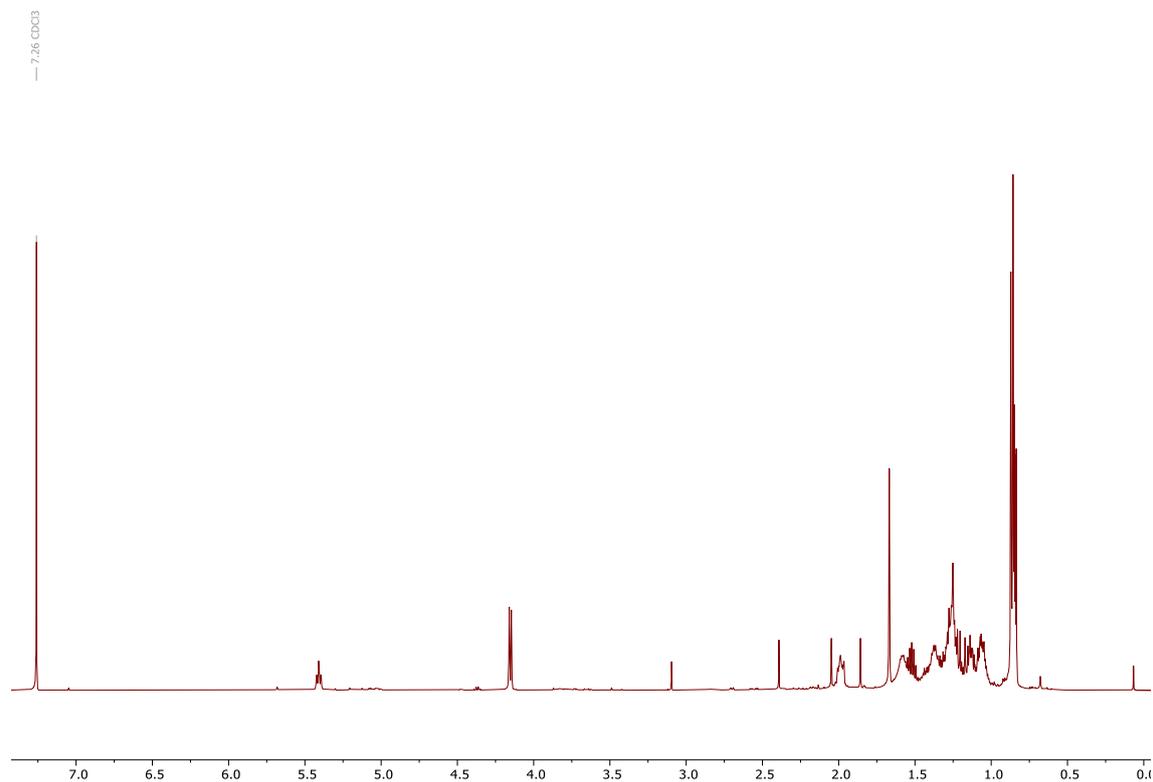


FIGURA 21. Espectro de RMN H del compuesto hallado en la fracción ACRN03-G

5. CONCLUSIONES

- El método más adecuado para la determinación de actividad inhibitoria frente la acetilcolinesterasa de extractos, fracciones y sustancias aisladas es el método de Ellman ya que detecta grupos tioles a bajas concentraciones.
- El extracto más activo de todos los ensayados fue del invertebrados *Zoanthus Puchellus*. Ya para los extractos de dinoflagelados, varias especies presentaran buena actividad para la búsqueda de sustancias activas, de entre ellas, destacamos en ese trabajo el extracto en metanol:tolueno de *Amphidinium carterae*.
- Los alcaloides mayoritarios aislados de *Zoanthus Puchellus*, la zoantamina y la norzoantamina, presentaron baja actividad comparada a la actividad del extracto.
- *Amphidinium carterae* es una excelente fuente de diversos metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Harvey AL. Natural products in drug discovery. Vol. 13, Drug Discovery Today. 2008. p. 894–901.
2. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. Vol. 8, Nature Reviews Drug Discovery. 2009. p. 69–85.
3. Frankfurt P, Zafes /, Schmidtko A, Lötsch J, Geisslinger G, Schmidtko A, et al. New Drug Class Ziconotide for treatment of severe chronic pain. Lancet [Internet]. 2010;375:1569–77. Available from: www.thelancet.com
4. Macherla VR, Mitchell SS, Rao Manam R, Reed KA, Chao TH, Nicholson B, et al. Structure-Activity Relationship Studies of Salinosporamide A (NPI-0052), a Novel Marine Derived Proteasome Inhibitor. 2005; Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
5. D’Incalci M, Galmarini CM. A Review of trabectedin (ET-743): A unique mechanism of action. Vol. 9, Molecular Cancer Therapeutics. 2010. p. 2157–63.
6. Alonso-Álvarez S, Pardal E, Sánchez-Nieto D, Navarro M, Caballero MD, Mateos MV, et al. Plitidepsin: Design, development, and potential place in therapy. Vol. 11, Drug Design, Development and Therapy. Dove Medical Press Ltd.; 2017. p. 253–64.
7. Lazarevic-Pasti T, Leskovac A, Momic T, Petrovic S, Vasic V. Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer’s Disease to Anti-Cancer Drugs. Current Medicinal Chemistry. 2017 Oct 25;24(30).
8. Thapa S, Lv M, Xu H. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2017 Nov 7;17(17).
9. Moodie LWK, Sepčić K, Turk T, Frangež R, Svenson J. Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms. Natural Product Reports [Internet]. 2019 Aug 1;36(8):1053–92. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9NP00010K>
10. Shaikh S, Verma A, Siddiqui S, Ahmad S, Rizvi S, Shakil S, et al. Current Acetylcholinesterase-Inhibitors: A Neuroinformatics Perspective. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets. 2014 May 31;13(3):391–401.
11. Li S, Li AJ, Zhao J, Santillo MF, Xia M. Acetylcholinesterase Inhibition Assays for High-Throughput Screening. In 2022. p. 47–58.
12. Arens AM, Shah K, Al-Abri S, Olson KR, Kearney T. Safety and effectiveness of physostigmine: a 10-year retrospective review *. Clinical Toxicology. 2018 Feb 1;56(2):101–7.
13. Scott LJ, Goa KL, Burns A, Mcdowell FH, Burke WM. Galantamine A Review of its Use in Alzheimer’s Disease.

14. Mishchenko NP, Fedoreev SA, Bagirova VL. Histochrome: A new original domestic drug. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003 Jan 1;37(1):48–52.
15. Invitrogen™ Acetylcholinesterase Fluorescent Activity Kit Kit de actividad fluorescente de la acetilcolinesterasa Kits de ELISA 1-B | Fisher Scientific [Internet]. [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/acetylcholinesterase-fluorescent-activity-kit/15820893?searchHijack=true&searchTerm=EIAACHEF&searchType=RAPID&matchedCatNo=EIAACHEF>
16. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Vol. 7, *Biochemical Pharmacology*. Pergamon Press Ltd; 1961.
17. Cruz López PG. Estudio de toxinas y otros metabolitos secundarios de origen marino. 2009 [cited 2022 Jun 19]; Available from: <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/10164>
18. Blackburn SI, Bolch CJS, Haskard KA, Hallegraef GM. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*. 2001;40(1):78–87.
19. Guillen PO, Gegunde S, Jaramillo KB, Alfonso A, Calabro K, Alonso E, et al. Zoanthamine alkaloids from the zoantharian zoanthus cf. pulchellus and their effects in neuroinflammation. *Marine Drugs*. 2018 Jul 1;16(7).