



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIOS SOBRE LA EXTRACCION Y
TRANSFORMACION DE PROSTAGLANDINA CONTENIDA
EN LOS CORALES BLANDOS DEL GENERO PLEXAURA
ESPECIE *homomalla* DEL CARIBE MEXICANO.

T E S I S
Que para obtener el Título de
Q U I M I C O
P r e s e n t a
María Antonieta Aguirre García
Ciudad Universitaria, D. F. 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: DR. GUSTAVO GARCIA DE LA M.
VOCAL: DR. ANGEL GUZMAN SANCHEZ
SECRETARIO: DRA. GLORIA PEREZ DE GUZMAN
1er. SUPLENTE: DR. LUIS A. MALDONADO GRANIEL
2o. SUPLENTE: O. IRMA KORKOWSKI DE ARNAUD

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA
U.N.A.M.

SUSTENTANTE: MARIA ANTONIETA AGUIRRE GARCIA

ASESOR DEL TEMA: DR. GUSTAVO A. GARCIA DE LA MORA

ESTA TESIS SE DESARROLLO EN
LOS LABORATORIOS DE QUIMICA
ORGANICA DE LA DIVISION DE
ESTUDIOS DE POSGRADO BAJO
LA DIRECCION DEL DR. GUSTAVO
ALBERTO GARCIA DE LA MORA.

AGRADEZCO AL CONSEJO
NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGIA, LA BECA
OTORGADA DURANTE EL
PROYECTO DE EXTRACCION
DE PROSTAGLANDINAS Y
LA EXPLOTACION RACIONAL
PARA LA PRESERVACION
DEL RECURSO.

Con profundo agradecimiento
al Dr. Gustavo Alberto García de la M.
quién con sus consejos hizo posible
la realización de este trabajo.

A LA MEMORIA DE
PAPA AGUSTIN

A Mamá Beatriz a quien
nunca podré pagar todo
lo que me ha dado.

A mis Padres por su
comprensión y cariño.

A LILIANA con cariño, para
que todas las cosas que nos
unen sean para seguir adelan-
te siempre.

A RENE por todo lo que
significa para mí.

A los M. en C. Irma Kór-
kowski y Héctor M. Luna
por su inestimable amistad.

C O N T E N I D O

- 1.- INTRODUCCION
- 2.- HISTORIA DE LAS PROSTAGLANDINAS
- 3.- SU DESCUBRIMIENTO EN CORALES
- 4.- ESTUDIOS SOBRE LA CONFIGURACION ABSOLUTA (C-15)
DE LAS PROSTAGLANDINAS EN LOS CORALES MEXICANOS
- 5.- RESULTADOS SOBRE EXTRACCION (OPTIMIZACION Y
COMPARACION CON OTROS METODOS)
- 6.- DETERMINACIONES DE HUMEDAD
- 7.- TRANSFORMACIONES A PGE₂
- 8.- OBTENCION DE PGB₂
- 9.- CONCLUSIONES
- 10.- BIBLIOGRAFIA

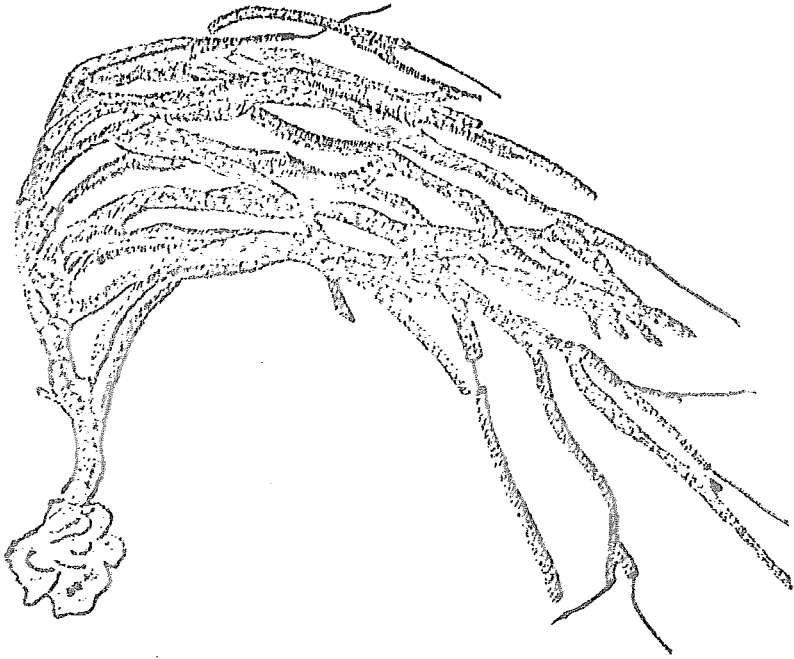


FIGURA I

I N T R O D U C C I O N

A raíz del establecimiento de la estructura de las Prostaglandinas por S. Bergstrom en el año de 1956, el incremento de las investigaciones sobre las acciones biológicas de estos compuestos fue espectacular.

Sin embargo, la poca disponibilidad de Prostaglandinas para estudios farmacológicos, debido a las pequeñas cantidades que se podían extraer de organismos terrestres, limitaba en cierto grado el descubrimiento de todas sus posibles aplicaciones como fármacos.

El campo de la síntesis química ha ayudado en mucho a los estudios farmacológicos de las Prostaglandinas, puesto que hasta 1978 se han desarrollado por lo menos diez síntesis totales de Prostaglandinas con esquemas totalmente diferentes, que han proporcionado mayores cantidades para todo tipo de estudios.

En 1970 fue informado el descubrimiento de Prostaglandinas en un coral suave llamado PLEXAURA homomalla, en concentraciones suficientes como para pensar que pudiera ser un recurso natural explotable.

El objetivo de la presente tesis fue el estudio de métodos de extracción, técnicas de identificación y cuantificación, en muestras de diferentes sitios del Caribe Mexicano, así como la transformación química a otras Prostaglandinas.

HISTORIA
DE LAS
PROSTAGLANDINAS

Las Prostaglandinas son sustancias con propiedades ácidas y solubles en lípidos, capaces de ejercer una gran diversidad de efectos farmacológicos sobre diferentes estructuras y funciones del organismo humano.

El primer contacto con las Prostaglandinas se debe a Kurzrok y Lieb (1) en el año de 1930, cuando publica que el semen humano tiene un efecto estimulante sobre las fibras aisladas del músculo uterino; los autores interpretaron el fenómeno como un efecto de la Acetilcolina y el hallazgo despertó considerable interés, aun cuando los experimentos quedaron interrumpidos. En 1933, sin embargo, M.W. Goldblatt (2), al parecer desconociendo las investigaciones anteriores, hizo en Inglaterra una breve descripción de un doble efecto del fluido seminal humano: la estimulación de la musculatura lisa y el descenso de la presión arterial. De los resultados de sus experimentos, concluyó que el principio activo difería de otras sustancias conocidas con efectos similares.

Sin tener conocimiento de estas observaciones U.S. von Euler (3), emprendió en 1934 estudios con el mismo material y comprobó que el fluido seminal ejercía un intenso efecto biológico sobre los órganos aislados y sobre la tensión arterial del conejo. A este estudio les había impulsado el descubrimiento anterior de un efecto adrenalínico en extractos de glándula prostática, de algunos animales.

Dos hallazgos abrieron el camino -
esclarecer la química y la biología del principio activo.
El primero de ellos fue la observación de que en las glándulas
siculares del carnero existían cantidades relativamente gran-
des de la sustancia. El hallazgo fue afortunado, ya que la ma-
yoría de los demás animales domésticos parecían carecer de la -
sustancia o poseerla en cantidades mínimas. Gracias a que se --
pudo obtener una cantidad necesaria de glándulas, se procedió a
la extracción que proporcionó el material para otros estudios.

El segundo descubrimiento de interés,
fue el hecho de que el principio activo se comportara como un --
ácido liposoluble que formaba con facilidad sales hidrosolu ----
bles. Ello significaba que el material podía purificarse con re-
lativa facilidad y separarse de una serie de sustancias contami-
nantes como aminas y péptidos.

Una vez establecido que el compuesto
activo era un ácido liposoluble suficientemente puro para su em-
pleo en pruebas fisiológicas y para la caracterización de sus --
efectos, se decidió bautizarlo con la denominación de PROSTA--
GLANDINA. El nombre permitía diferenciarlo de otro ácido lipo--
soluble similar, aunque no idéntico, llamado Vesiglandina.

En 1939 se sospechaba que el "ácido -
graso", era un compuesto insaturado; y su escasa solubilidad en
éter de petróleo era un nuevo indicio de que se trataba de un --

compuesto hidroxilado. En vista de las dificultades para dilucidar su naturaleza química en ese tiempo, todo el material -- disponible fue reunido por S. Bergstrom (4) quien en 1956, no sólo consiguió aislar las sustancias activas, sino que con técnicas mas avanzadas, descubrió su insólita composición química en 1962; mostrando que en realidad eran compuestos muy semejantes a los ácidos grasos y todos derivados del compuesto padre -- llamado Acido Prostanico. Esquema I.

Quedaba abierto entonces, el camino -- para el estudio de una serie de sustancias, que desde 1960 han -- constituido la base para investigaciones de amplia repercusión en los campos químico, fisiológico, bioquímico, patológico, -- farmacológico y terapéutico.

Todas las Prostaglandinas resultaron ser hidroxiácidos insaturados, con un anillo de cinco miembros, en un esqueleto de 20 átomos de carbono. De esta manera se estableció que las Prostaglandinas naturales podrían clasificarse en dos familias principales: Primarias y Secundarias.

PGE y PGF pertenecen a las primarias, así como PGA y PGB pertenecen a las secundarias. Los rasgos estructurales que diferencian a estas familias se ilustran en el Esquema II.

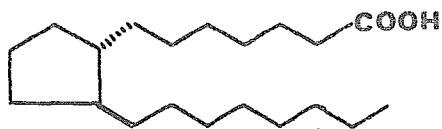
Las Prostaglandinas de las series 1, 2 y 3 tienen 1, 2 y 3 dobles enlaces respectivamente con la posición y estereoquímica indicada. Esquema III.

Las Prostaglandinas de la serie 1 (E₁, F₁, A₁, B₁), poseen una doble ligadura trans en la posición 13 - 14.

Las de la serie 2 (E₂, F₂, A₂ y B₂), poseen además un doble enlace cis en la posición 5 - 6.

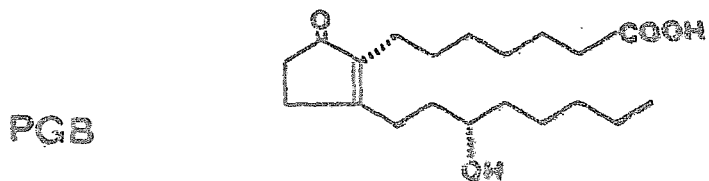
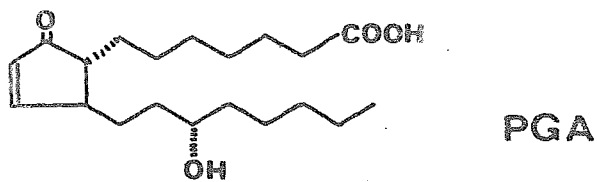
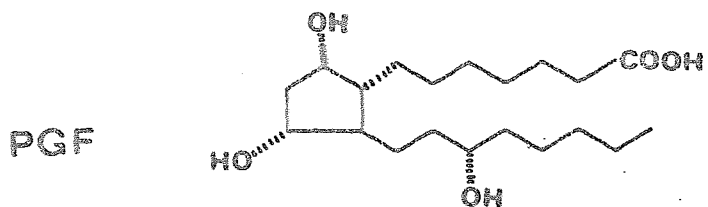
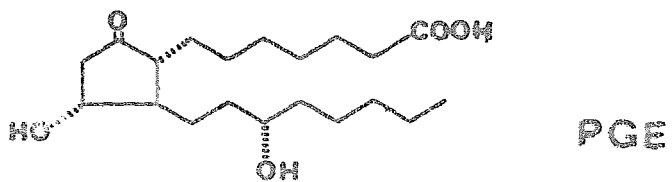
Las de la serie 3 (E₃, F₃ y B₃), -- tienen una doble ligadura, adicional, cis en la posición 17 -18.

Todas las Prostaglandinas naturales tienen un grupo hidroxilo en la posición 15.

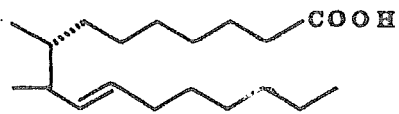


ESQUEMA I

ESQUEMA II



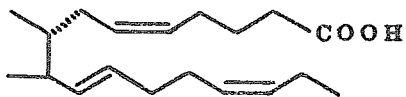
ESQUEMA III



Serie 1



Serie 2



Serie 3

EL
DESCUBRIMIENTO
DE
PROSTAGLANDINAS
EN CORALES

En la segunda mitad de la década de los sesenta, cuando la disponibilidad de las Prostaglandinas era aun extremadamente pequeña, los invertebrados marinos inferiores podían haber sido considerados como un recurso prometedor en la búsqueda de fuentes adicionales de éstos compuestos típicamente mamíferos.

Weinheimer y Spraggins (5), de la Universidad de Oklahoma, hicieron estudios sobre un grupo de éstos invertebrados marinos, conocidos como Gorgónidos, y notaron la presencia de terpenoides y otros compuestos de la fracción lipídica y en 1969 informaron sobre la existencia de grandes cantidades de Prostaglandina y algunos de sus derivados en la Plexaura homomalla Esper; colectados en las costas de Florida. Estos corales contenían una concentración de hasta 1.5 % en peso seco.

La Prostaglandina que obtuvieron, desafortunadamente, era una Prostaglandina secundaria, la PGA_2 y con uno de los centros asimétricos cambiado, es decir en la PGA_2 de mamíferos, la configuración absoluta en el carbono 15 es (S), mientras que la encontrada en esos corales fue (R). Esto significa un descenso en la actividad fisiológica en el organismo con respecto a la Prostaglandina natural.

Poco tiempo después, en estudios realizados en Bahamas y Gran Caimán en 1972, se encontraron

Prostaglandinas activas, con la configuración 15 (S).

Debido a que los corales blandos -- (Plexaura homomalla) que contenían Prostaglandinas, fueron encontrados en Florida en el Mar Caribe, la Facultad de Química de la U.N.A.M. realizó estudios preliminares, con el objeto de saber si existía esta especie en las costas mexicanas del Caribe. Estos estudios resultaron positivos, lo que dió origen a la investigación tema de ésta tesis.

ESTUDIOS
SOBRE LA
CONFIGURACION
ABSOLUTA (C - 15)
DE LAS
PROSTAGLANDINAS
EN LOS
CORALES MEXICANOS

Uno de los principales objetivos -- del presente trabajo fue el de establecer si los corales del - Caribe Mexicano contenían Prostaglandinas en las cantidades in -- formadas para los corales de otras zonas del Caribe; la deter -- minación de la estereoquímica del carbono 15 y por lo tanto, - conocer el tipo o variedad de coral Plexaura homomalla produc -- toras de Prostaglandina 15 (R) o 15 (S); así como una estima -- ción de la población de corales para estudios de cosecha.

Como no es posible realizar dentro del mar la determinación de la variedad de coral con que se -- cuenta, es necesario trasladar las muestras al laboratorio y - realizar procesos de extracción e identificación de la Prosta -- glandina presente.

Existen dos métodos informados (6), para determinar cual isómero de la PGA_2 se tiene.

El más sencillo consiste en hacer - una extracción (ver Parte Experimental) del coral, aplicar pe -- queñas muestras del extracto en placas de Gel de Sílice (GF -- 254) y desarrollar éstas en el sistema denominado A-IX (AcOH, - AcOEt, 2,2,4 Trimetilpentano, Agua) (7); la observación de la placa revelada indica cuál isómero se tiene, siendo el menos - polar el isómero 15 (R).

Para realizar ésta determinación, - es necesario contar con muestras auténticas de los dos isóme --

ros de PGA_2 .

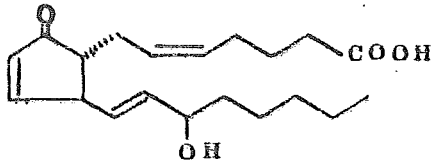
La identificación por éste método resulta difícil, si la variedad de coral tiene mezclas de Prostaglandinas, ya que la diferencia de polaridad entre ellas es muy pequeña.

Existe otro método que consiste en la medida de la rotación de la luz polarizada (Polarimetría), la cual es una constante física para las sustancias ópticamente activas. La PGA_2 15 (S), tiene una rotación específica de $[\alpha]_d^t = +131$ y la PGA_2 15 (R) de $[\alpha]_d^t = +117$. Esquema IV. La cercanía del valor de éstas constantes físicas, evita que ésta medida sea segura para la determinación de la configuración en el carbono 15, pues pequeñas impurezas provocan grandes cambios en el poder rotatorio.

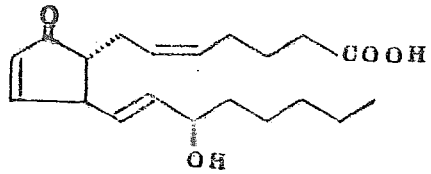
Si se realiza la transformación de PGA_2 a PGB_2 por medio de un tratamiento alcalino, en etanol o metanol, se puede entonces, realizar la determinación de la configuración del carbono 15 por Polarimetría.

La PGB_2 únicamente posee un centro asimétrico, precisamente en el carbono 15, y la rotación específica es de $[\alpha]_d^t = +33$ para 15 (S). En el caso de PGB_2 15 (R) debe tener una rotación específica $[\alpha]_d^t = -33$. El hecho de que el valor de la rotación sea el mismo pero de signo contrario, permite que la Polarimetría sea un método seguro.

ESQUEMA IV



$\text{PGA}_2-15(\text{R})$



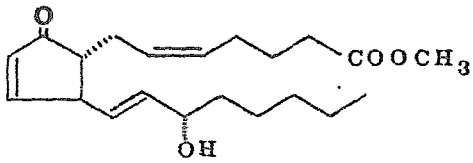
$\text{PGA}_2-15(\text{S})$

Muestras de PGA_2 obtenidas de los corales colectados desde el punto denominado Nizuc hasta 12 Km al sur de Tulum (120 Kilómetros de litoral), fueron transformadas a PGB_2 y determinada su rotación específica en cada caso.

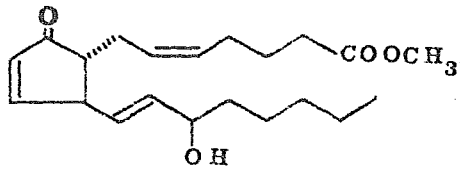
En todas las muestras el resultado indica que la variedad de Plexaura homomalla colectada es ---- 15 (R).

En el laboratorio se desarrolló un método sencillo para determinar la variedad de Plexaura homomalla. Este consiste en la comparación de la muestra que se va a determinar con muestras auténticas de los ésteres metílicos de PGA_2 15 (R) ó PGA_2 15 (S) en cromatografía en placa delgada. - La diferencia de polaridad entre los ésteres metílicos es mucho mayor que entre los ácidos libres, siendo la PGA_2Me 15 (S) más polar que el correspondiente isómero, lo que hace que la identificación sea mucho más sencilla y confiable. Esquema V.

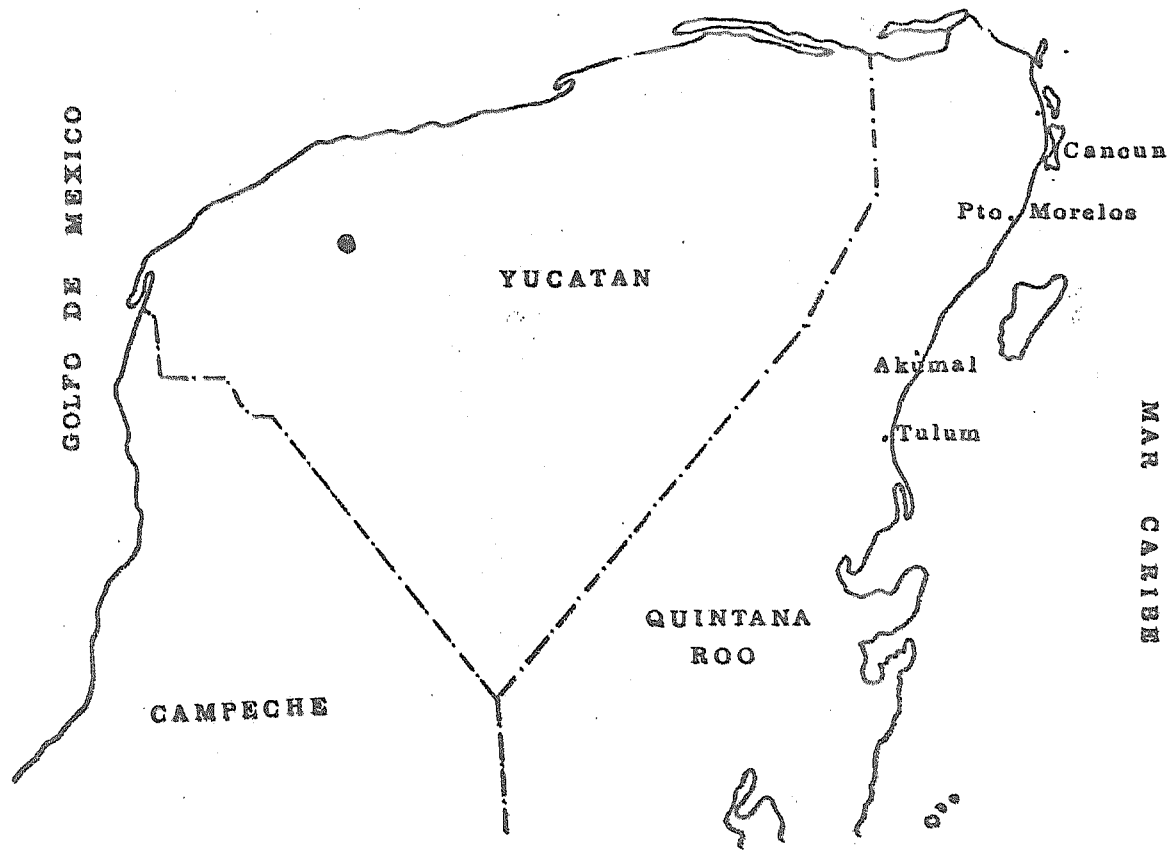
ESQUEMA V



PGA₂Me-15 (S)



PGA₂Me-15 (R)



MAPA 1

PLAN DE
TRABAJO
SOBRE
COLECTA Y
MUESTREO

Otro de los objetos de éste plan, - era determinar el contenido de Prostaglandinas en los corales del género Plexaura especie homomalla, de la zona arrecifal -- del noroeste de la península de Yucatán, cubriendo una distancia aproximada de 120 kilómetros. Mapa No. 1.

Este estudio se realizó durante 12 meses, comprendiendo las siguientes zonas, consideradas potencialmente productoras de Plexaura homomalla: PUNTA NIZUC, BAJO FINDUVET, PUNTA PETEMPICH, PUERTO MORELOS, PUNTA MAROMA, AKU--MAL, XCARET, TULUM y TULUM - 12. Mapa No. 2.

Debido a que las diferencias estructurales del arrecife, son muy grandes a lo largo de la zona de estudio, la población de Plexaura homomalla varía de acuerdo a la zona evaluada.

1.- NIZUC se caracteriza por muy altas concentraciones de colonias de Plexaura homomalla, no alcanzan por lo general, tallas mayores de 60 cm. Aquí se encontraron colonias desde profundidades menores a un metro, hasta 8 ó 9 metros junto con una densa zona de Acrópora palmata (coral de esqueleto de CaCO_3).

2.- PUNTA PETEMPICH, la zona es pequeña, pero las condiciones generales (de tamaño y profundidad), son similares a las de Nizuc.

3.- BAJO FINDUVET, es una zona restringida para la cosecha, debido a las condiciones ambientales poco propicias y lejanía de la playa, pero posee una buena concentración de colonias.

4.- PUERTO MORELOS, es la zona más extensa en el área en que se encontró Plexaura homomalla. Es por área total la zona con mayor potencial de cosecha.

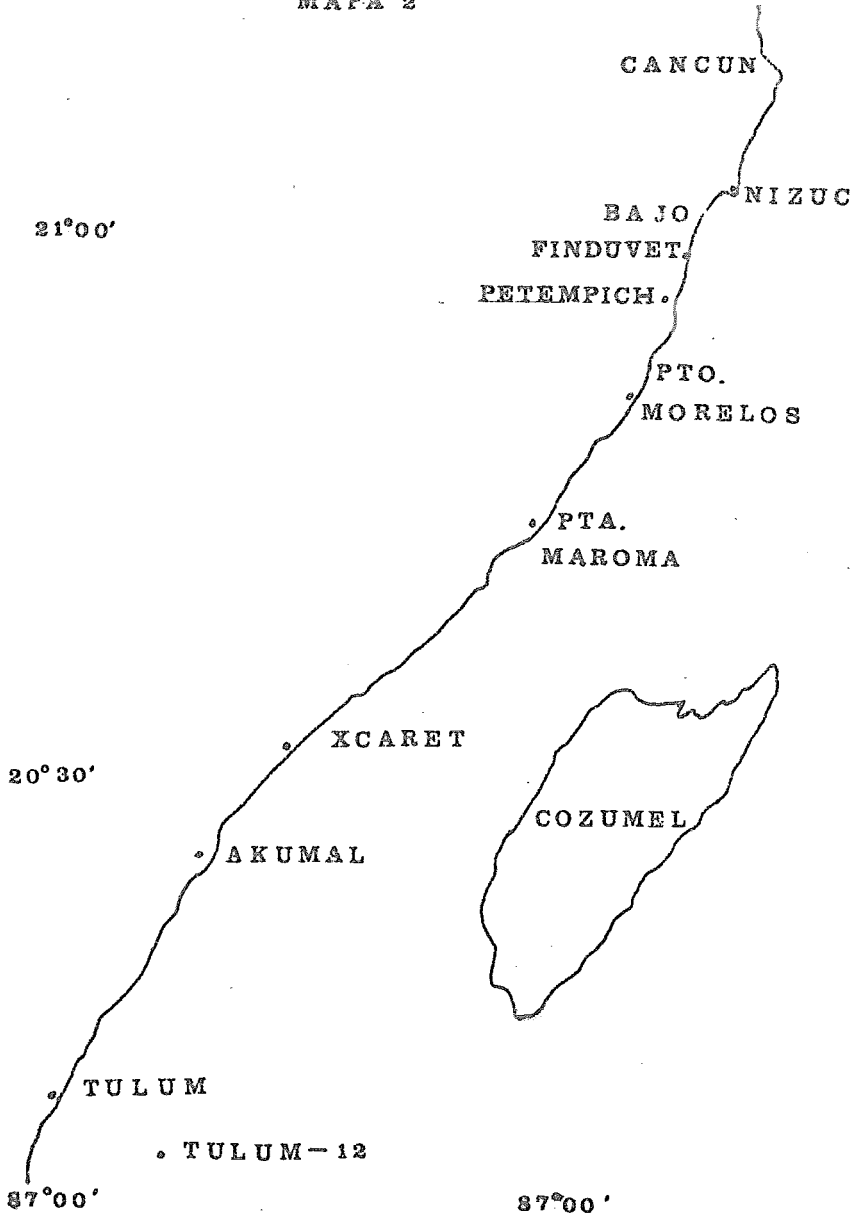
5.- PUNTA MAROMA, también tiene una extensión considerable, pero, existen grandes áreas de colonias muy pequeñas.

6.- AKUMAL, representa la zona de mayor densidad poblacional encontrada. La excelente protección así como la abundancia de sustrato alimenticio, son dos causas de ésta exuberante población.

7.- XCARET, aquí no existe una estructura arrecifal apropiada, sino solo una comunidad coralina sobre sustrato duro, encontrándose la especie Plexaura homomalla representada por algunas decenas de colonias con distribución muy restringida.

8.- TULUM, tiene una abundancia poblacional alta, y se caracteriza por estar muy junta a la estructura formada por Acrópora palmata, reduciendo así la dis-

MAPA 2



tribución de la especie.

9.- TULUM - 12 (12 Km al sur de Tulum), representa condiciones extremas, posee una densidad poblacional mayor, pero las colonias tienen sólo unos 20 ó 25 cm de altura.

COLECTA DE CORALES

La colecta se llevaba a cabo cortando ramas con un promedio de 35 cm de largo y 15 cm de ancho, las cuales fueron introducidas en bolsas de polietileno e inmediatamente se trasladaban a hieleras de plástico conteniendo hielo seco (temperatura de -70°C), para evitar transformaciones de Prostaglandinas o descomposición en los corales. Estas hieleras se transportaban inmediatamente a la Ciudad de México.

Uno de los factores que puede ser de mucha importancia para determinar la variación del contenido de Prostaglandinas, es el de la uniformidad en el método ó forma de colecta, es decir, si se lastima el coral al cortarlo, si el transporte de los corales cortados hasta la lancha fue hecho sobre la superficie del agua o bajo de ella y finalmente la distancia y por tanto el tiempo desde el corte hasta su congelación, ya que se puede observar fácilmente como el pólipo (que es el que contiene la Prostaglandina), se desprende del coral una vez que ha sido cortado.

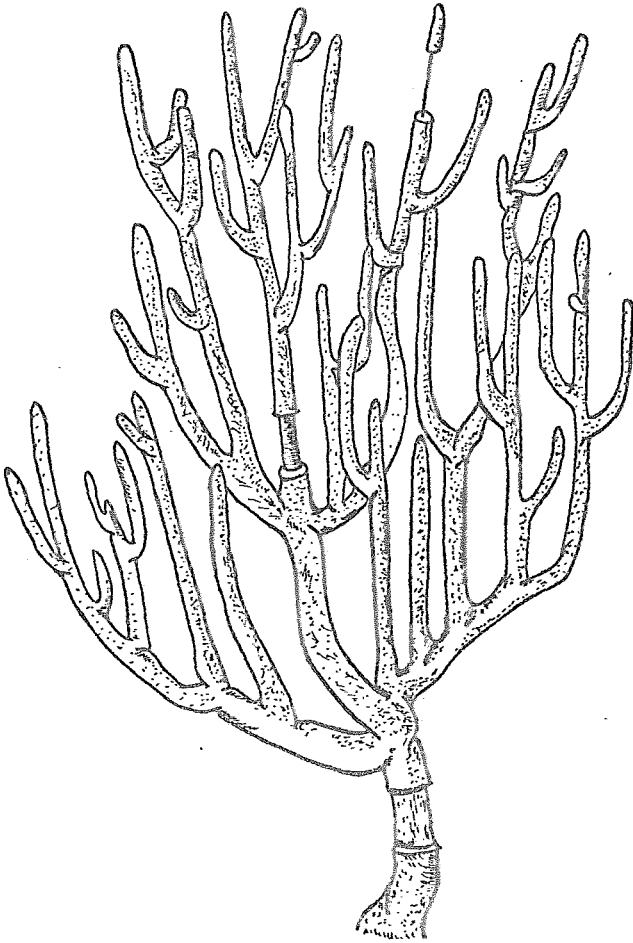
Aunque la técnica de corte se trató de uniformar, esto sólo se logró en las muestras de Nizuc (por su abundancia y accesibilidad); existieron diferencias mayores en el método de corte, en otras zonas, principalmente por las condiciones climatológicas, el día de la colecta y/o por las dificultades que mostraba el arrecife de la zona en particular.

La determinación cuantitativa de Prostaglandinas en el coral fue ensayada a diversas escalas, siendo las escalas pequeñas las de más precisión debido al método de lectura final; sin embargo, fue necesario hacer un análisis de las partes de las colonias que se tomaron como muestra, ya que estas no son uniformes.

En el esquema VI, se representa un diagrama de una colonia de Plexaura homomalla donde se muestran las diferentes proporciones existentes entre el llamado esqueleto axial y el tejido a lo largo de la colonia. La relación en peso seco "tejido - esqueleto" en la parte baja de la colonia es de 1 : 2 en promedio, siendo el diámetro promedio del esqueleto en la base de 1.1 cm. En la parte media, donde el diámetro del esqueleto es alrededor de 0.5 cm y la relación "tejido - esqueleto" es de 5 : 1. En las puntas de la colonia la relación mencionada es de 30 : 1 y el diámetro del esqueleto es de 0.1 cm en promedio.

Dado que las colonias presentan va-

ESQUEMA VI



riaciones, cuando se desee hacer un análisis cuantitativo de Prostaglandinas, será necesario realizar una buena homogenización del material mediante una molienda del mismo, en frío (temperaturas menores a los 10 °C). No obstante, cuando las colonias son grandes, el esqueleto axial, resulta difícil de moler, por lo que sería conveniente encontrar una forma de muestreo que permitiera trabajar solamente con las puntas de las mismas colonias.

Con el objeto de saber qué cantidad de Prostaglandina contenía el esqueleto axial, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de éste, resultando que no existen Prostaglandinas en ésta parte del coral (algunas veces se pudieron detectar pequeñas cantidades de Prostaglandinas, 0.5 a 0.1 %, pero probablemente fueron residuos del tejido).

Sabiendo que el esqueleto axial no contiene Prostaglandinas, solamente es necesario analizar el tejido, pero si se desea saber la cantidad de Prostaglandina por peso de coral, es indispensable conocer qué por ciento del peso total del coral está representado por el tejido.

Análisis hechos con una gran cantidad de "ramas" de coral, mostraron que el esqueleto solamente representa el 20 % del peso total de coral seco, 53 % se debe al tejido de las puntas; 22 % al tejido de la parte media y solamente 5 % al tejido de la parte inferior de la colonia.

Conociendo las proporciones anteriormente mencionadas, se puede decir que solamente es necesario analizar una pequeña fracción del tejido del coral y el resultado multiplicarlo por 0.8510 para obtener la cantidad de Prostaglandina por peso de coral seco. Sin embargo es necesario determinar también, si existe la misma cantidad de Prostaglandina en el tejido de las puntas de la parte media o de la base del coral, aún cuando la densidad de "pólipos"*** cerca de las puntas no es muy diferente a la densidad de ellos en la parte inferior de la colonia.

Los análisis del tejido de las diferentes partes de la colonia muestran que el por ciento de Prostaglandina en las puntas es superior en 10 % al de la parte media y entre 15 y 20 % al de la parte baja.

Este resultado puede deberse a que las muestras de coral son manejadas (corte, transporte, almacenamiento, etc.) por la parte inferior y por lo tanto es la que sufre mayor daño. El daño ó pérdida que se pueda tener en las partes medias es mayor que la ocasionada en las puntas, puesto que éstas últimas son muy abundantes. A reserva de realizar análisis de corales tratados con especial cuidado para evitar cualquier daño, la forma de determinar que cantidad de Prostaglandinas se tienen en el coral será:

** Denominación del animal que constituye la colonia.

PARTE	FACTOR	%
ANALIZADA:	USADO:	REAL:

PUNTAS:	$\frac{53+22\left(\frac{1}{1.1}\right)+5\left(\frac{1}{1.21}\right)}{100} = 0.7713$	% obtenido X 0.7713
---------	---	---------------------

MEDIOS:	$\frac{53(1.1)+22+5\left(\frac{1}{1.1}\right)}{100} = 0.8484$	% obtenido X 0.8484
---------	---	---------------------

BASES:	$\frac{53(1.21)+22(1.1)+5}{100} = 0.9333$	% obtenido X 0.933
--------	---	--------------------

Teniendo estos factores, solamente es necesario hacer los análisis de la muestra (tejido), conociendo la humedad y de que parte de la colonia fue tomada la muestra.

MÉTODOS Y RESULTADOS SOBRE EXTRACCIÓN

Se conocen dos métodos efectivos - para la extracción de Prostaglandinas de los corales Plexaura homomalla, la elección de alguno de ellos dependerá de varios factores como son: la cantidad de coral, el costo de la extracción, la pureza requerida, la forma en que se desea el compuesto (ácido libre o esterificado) y la facilidad de esa extracción.

El primer método (A) consiste en - la extracción directa de las Prostaglandinas del coral con disolventes orgánicos, los cuales pueden ser: cloroformo, cloruro de metileno, éter ó metanol. La elección del disolvente depende principalmente de las cantidades y el costo, así como - también el efecto que pueda tener sobre las Prostaglandinas. Así se conoce que la extracción realizada con metanol, provoca la esterificación parcial de los ácidos libres.

El segundo método (B), está basado en las propiedades ácidas de las Prostaglandinas, por lo que se puede efectuar una extracción ácido - base - neutro. También se debe elegir el disolvente adecuado, con el objeto de que la partición disolvente - agua, sea la óptima.

En el laboratorio se ensayaron los dos métodos mencionados, para determinar cuál era el que pre-

sentaba mayores ventajas para los objetivos que se perseguían.

La extracción directa (método A), se realizó con disolventes polares (CH_2Cl_2 - 10% EtOH). Se probaron varios tiempos de extracción que variaron de 1 a 3 horas, sin cambios apreciables en los resultados obtenidos.

Con este procedimiento es posible aislar las Prostaglandinas en la forma como se encuentran en el coral (ésteres metílicos, acetatos, ácido - acetato, etc.), pero el método tiene el inconveniente de obtener también todos los productos orgánicos que se encuentran en el coral, haciendo necesaria una purificación posterior por cromatografía la cual resulta ser costosa y laboriosa por la gran cantidad de productos indeseables como clorofila, esteroides, etc. Es posible realizar una hidrólisis de los ésteres una vez obtenidos todos los productos de la mencionada extracción directa, sin embargo, dicha hidrólisis debe ser enzimática, dado que los métodos químicos producen una transformación no deseable de la PGA_2 a la PGB_2 y ésta última resulta inútil para cualquier propósito.

El método B se realizó a diferentes escalas y aunque en principio es más laborioso, es también más recomendable debido a la alta pureza con que se obtienen las Prostaglandinas sin necesidad de posterior purificación por cromatografía.

El primer paso de este método consiste en la hidrólisis enzimática de los ésteres de las Prostaglandinas, con el objeto de tener todo el material deseado como ácido carboxílico libre (8). Se lleva la solución a un pH mayor de 7.5 y se extrae el material neutro. El disolvente informado para realizar dicha operación es el cloruro de metileno, pero se encontró que se producían emulsiones que dificultaban la extracción, razón por la cual se cambió a una mezcla acetato de etilo - éter (1:1), sistema que presentó menos problemas de emulsiones y máximos resultados en la extracción. -- Una vez extraído todo el material neutro, se acidula la solución y se procede a la extracción de Prostaglandinas con una mezcla similar de disolventes. La evaporación de estos disolventes a temperaturas inferiores a 30 °C, da como resultado un aceite amarillento, después de una decoloración con carbón activado.

Es importante tener mucho cuidado en las variaciones del pH y la temperatura durante el proceso de extracción porque la transformación antes mencionada de --- PGA_2 a PGB_2 , se lleva a cabo fácilmente con variaciones no controladas de pH.

DETERMINACION CUANTITATIVA

Para la determinación cuantitativa de Prostaglandinas, se ensayaron tres métodos utilizando diferentes cantidades de tejido de coral.

El primer método, el de mayor escala, es aquel en el que se necesitan muestras de aproximadamente 100 gramos de tejido de coral húmedo y la extracción se --- realiza con el procedimiento optimizado mencionado anteriormente.

No obstante que éste método se ha - utilizado para la determinación cuantitativa, el resultado obtenido no representa el contenido real que se encuentra en el coral, ya que la determinación se realiza por "pesada" y es -- además conocido, que en el proceso de extracción existe una -- pérdida de productos. Sin embargo las cantidades de Prostaglandina obtenida por éste procedimiento, representan las cantidades que realmente pueden obtenerse de manera práctica.

Se realizaron algunos ensayos con - el objeto de determinar el porciento de recuperabilidad, que - se tiene por éste proceso de extracción, demostrándose que ésta recuperabilidad varía entre un 85 - 90 %. Estos ensayos se hicieron sometiendo al proceso de extracción, cantidades conocidas de Prostaglandina.

El segundo método consiste fundamentalmente en realizar la extracción de Prostaglandinas a una escala mucho menor; aplicando esencialmente el mismo procedimiento de separación: ácido - base - neutro. En éste método se necesitan alrededor de 500 mg de tejido de coral húmedo y el proceso de extracción se realiza por centrifugación, mediante lo cual se evita que existan pérdidas en las emulsiones que se forman con el procedimiento a escalas mayores. Conociendo el porcentaje de recuperabilidad para éste método, los errores experimentales son reducidos, aún cuando la medida final se realiza por pesada.

El tercer método se aplica a escalas todavía menores, esto es, aproximadamente 200 mg de tejido de coral húmedo. El proceso de centrifugación se aplica y la determinación se realiza por la absorción de la PGA_2 en la región del ultravioleta. Por lo tanto este método es más preciso puesto que es un método espectrofotométrico que mide la intensidad de absorción a 217 nm; la cantidad de PGA_2 se obtiene directamente leyendo el valor de la absorción en una curva de calibración de concentración contra absorción hecha previamente con PGA_2 pura.

En éste tercer método también existe el problema de conocer el porcentaje de recuperabilidad, por lo tanto se ideó la forma de introducir una referencia interna

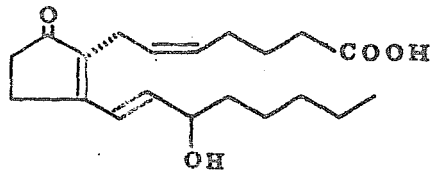
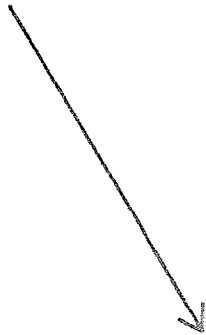
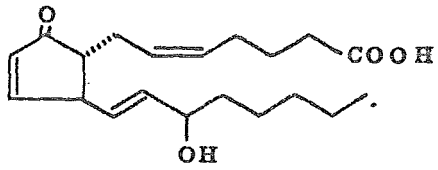
que nos diera la cantidad de Prostaglandina que se hubiera perdido en el proceso. Las condiciones que debe cumplir una referencia interna son las siguientes: Tener una respuesta similar al compuesto en el método de medida y/o tener propiedades ó -- comportamientos iguales al compuesto que se desea determinar, - en el proceso que se utiliza.

La PGB_2 , que es un compuesto que difiere de la PGA_2 unicamente por la posición de la doble ligadura, podemos considerarla como una referencia interna ideal, debido a que posee propiedades químicas muy similares y por que la absorción en el ultravioleta de PGB_2 es de 278 nm, y por lo tanto no interfiere en la lectura que se obtiene para PGA_2 que absorbe en 217 nm.

De ésta manera, el método de determinación fue mejorando notablemente, pues solamente es necesario medir la absorción que tiene la muestra a 278 nm y a 217 - nm; conociendo la cantidad de PGB_2 que se adicionó antes del - proceso de extracción, se conoce la absorción que debe obser-- varse a 278 nm. Por la diferencia entre la absorción teórica y la observada, se determina directamente el porciento de recuperación que se tuvo, y por tanto, la cantidad obtenida de PGA_2 .

Con éste último método se puede determinar la cantidad de Prostaglandina en la muestra de coral,

ESQUEMA VII



con un error experimental de aproximadamente 2 %. Este error consiste principalmente en la asociación que se tiene entre el metanol, usado como disolvente, y la PGA_2 que impide una lectura exacta a 217 nm, puesto que el disolvente tiene una absorción residual a 210 nm.

Una forma de aumentar más aún la exactitud del método de determinación, es a través de la transformación de PGA_2 a PGB_2 , Esquema VII, después de haber determinado el porcentaje de recuperación, ahora teniéndose que medir la absorción a 278 nm, evitando de esta manera el problema de la asociación con el disolvente, se determina el contenido de Prostaglandina en el coral.

VARIACIONES EN CONTENIDO

Con el objeto de determinar si existía una variación en el contenido de Prostaglandinas con la época del año, se decidió hacer análisis cuantitativos de muestras colectadas mensualmente en la zona de NIZUC (ver mapa).

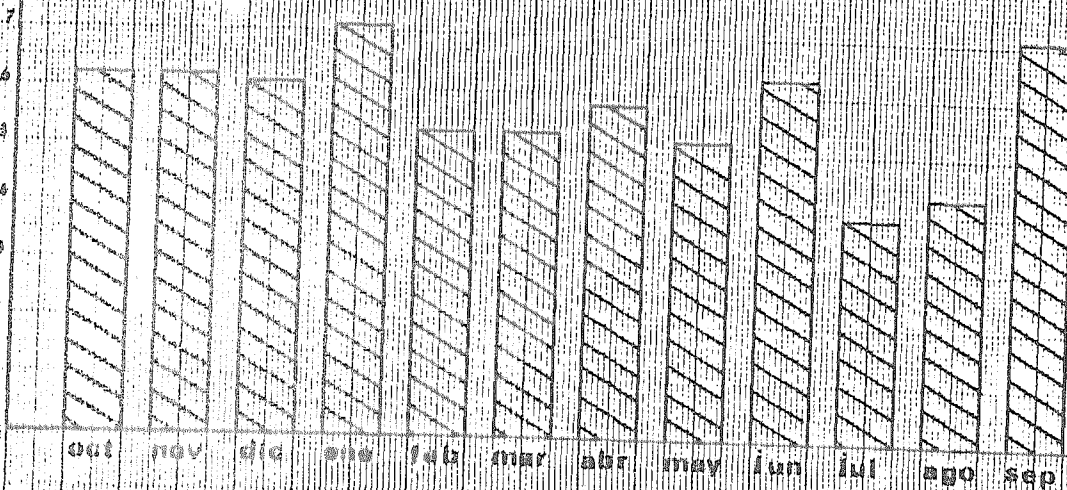
Por otro lado, también era necesario determinar si existía variación en el contenido de Prostaglandinas en las diferentes zonas de colecta a lo largo de las nueve zonas del Caribe Mexicano, ya mencionadas.

Se analizó la zona de NIZUC durante once meses, de octubre de 1975 a septiembre de 1976 y los resultados de los análisis se muestran en la gráfica No. 1. Como podemos observar casi no hay variación, de un máximo de 7.1 % en enero y septiembre, a un mínimo de 3.9 en julio. Estos análisis se llevaron a cabo siempre por triplicado, sin variación aparente, lo cual indicaba una gran confiabilidad en el método de análisis.

En la gráfica No. 2, se muestran los resultados de los análisis de muestras colectadas en las nueve diferentes zonas del Caribe Mexicano. Se podrá observar que existe una menor uniformidad en los resultados; esto puede ser debido a que las condiciones ambientales del coral varían en las diferentes zonas, lo cual repercute en el contenido

%
pg

NIZUC



Gráfica 1

GRAFICA No. 1

N I Z U C

1.- Octubre.....	6.2 %
2.- Noviembre.....	6.2 %
3.- Diciembre.....	6.1 %
4.- Enero.....	7.1 %
5.- Febrero.....	5.3 %
6.- Marzo.....	5.3 %
7.- Abril.....	5.8 %
8.- Mayo.....	5.2 %
9.- Junio.....	6.3 %
10.- Julio.....	3.9 %
11.- Agosto.....	4.3 %
12.- Septiembre.....	7.1 %

do de Prostaglandinas.

Una comprobación de lo enunciado anteriormente, es el valor obtenido para la zona de TULUM (punto No. 8, gráfica No. 2), que solamente fue de 3.0 %. El día de la colecta las condiciones climatológicas no eran buenas y hubo necesidad de "arrastrar" las muestras bajo la superficie -- del agua, durante un tiempo prolongado (15 a 20 minutos). Días después, nuevas muestras de coral fueron cortadas en la misma zona, evitando el mencionado "arrastre" y el resultado fue de 4.8 % (punto No. 9 de la misma gráfica), el cual es un resultado promedio. Experimentos sobre muestras de coral que han sido "arrastrados", dan resultados muy bajos de Prostaglandi--nas.

Los análisis de la zona de NIZUC en las diferentes épocas, muestran una gran uniformidad y solamente en los meses de julio y agosto, el rendimiento decreció un poco; esto pudo estar asociado con el hecho de que la época de reproducción de éste coral es el verano o sea los meses de junio, julio y agosto. Con el objeto de comprobar la variación mencionada será necesario realizar análisis de muestras colectadas con especial cuidado para éste fin.

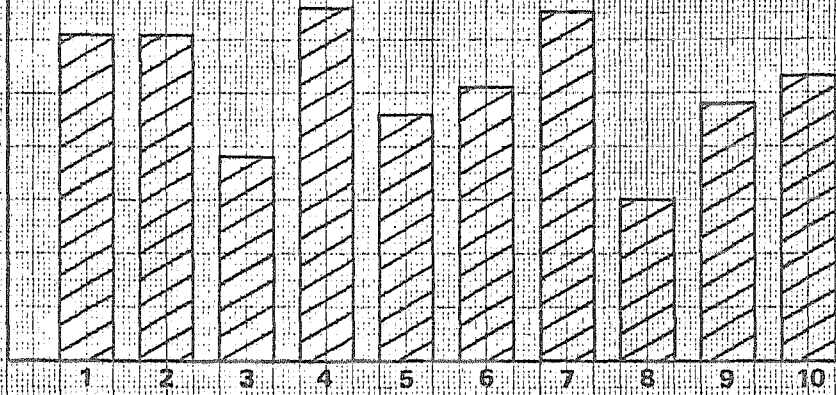
Podemos decir que las cantidades de Prostaglandina que se han encontrado en los corales del Caribe Mexicano; son superiores a los informados por otros investiga-

dores. Debido a que se desconocen las condiciones en que fueron realizados los trabajos de los norteamericanos, no es posible asegurar que los corales del Caribe Mexicano, contienen mayores cantidades de Prostaglandina que los de otras zonas del mismo Caribe. Es posible pensar que ellos realizaron los análisis sobre toda una colonia y por lo tanto la relación tejido - esqueleto disminuya, lo que daría menores rendimientos de Prostaglandina, pero aún considerando que el porcentaje del esqueleto se aumente en un 10 %, nuestros resultados sólo se verían disminuídos ese mismo porcentaje y en vez de tener 5 a 5.5 % de promedio, se tendría un 4 a 4.9 % que sigue siendo superior al informado en la literatura.

GRAFICA No. 2

1.- NIZUC.....	6.1
2.- PETEMPICH.....	6.1
3.- BAJO FINDUVET.....	3.8
4.- PUERTO MORELOS.....	6.6
5.- PUNTA MAROMA.....	4.6
6.- AKUMAL.....	5.1
7.- XCARET.....	6.5
8.- TULUM "arrastrados".....	3.0
9.- TULUM.....	4.8
10.- TULUM - 12.....	5.3

%
PG



Gráfica 2

PURIFICACION DE PGA_2

La Prostaglandina obtenida directamente por el proceso de extracción ácido - base - neutro, tiene una pureza aproximada del 35 % en base a PGA_2 , sin embargo se tiene material neutro (5 - 8%); PGB_2 (3 - 5%) y PGE_2 (5 - 7%); por lo que podemos decir que se tienen al menos un 93 % de Prostaglandinas totales.

La forma más fácil de eliminar el material neutro es realizando una segunda extracción, con el método ya mencionado, ácido - base - neutro; lo que elimina todo éste material y transforma la PGE_2 en la PGA_2 requerida, con lo que se obtiene un material de al menos 93 % de pureza en base a PGA_2 .

Si deseamos tener una pureza mayor de PGA_2 , es necesario realizar una cromatografía sobre Gel de Sílice, ya sea en columna o en placa delgada, de las cuales la última es la más recomendable para pequeñas cantidades. Una vez hecha esta purificación, se obtiene un aceite amarillento claro que es PGA_2 con una pureza mínima de 96 % y el resto es PGB_2 que resulta difícil de eliminar cuando se encuentra como ácido libre. La identificación de PGA_2 se puede llevar a cabo por métodos espectroscópicos, fácilmente

EXTRACCIONES A ESCALAS MAYORES

Las extracciones de Prostaglandina del coral a escalas mayores de 200 gramos, presentaron varios problemas. El primer de ellos es el tiempo de exposición, tanto del coral como del material extraído, a la temperatura ambiente. Lo anterior ocurre durante el proceso de molienda del coral y en el momento de la evaporación de los disolventes. Trayendo como consecuencia transformaciones no deseadas y aunque existen formas de controlar estos factores, era necesario tener un especial cuidado.

La forma de llevar a cabo el proceso de molienda más rápidamente, era eliminando todo el esqueleto ó soporte del coral y solamente trabajar con el "tejido", -- que es donde se encuentran las Prostaglandinas. El proceso de eliminación del esqueleto debe realizarse lo más rápido posible.

Otro problema que se tuvo con las extracciones a escalas mayores, es que se necesitan grandes cantidades ó volúmenes de disolventes, y aunque éste era un problema obvio, producía una mayor cantidad de emulsiones, las cuales son más difíciles de controlar y eliminar.

ALMACENAMIENTO

Anteriormente se mencionó la rápida descomposición que sufren, tanto los corales como las Prostaglandinas, por lo que hay que congelarlos en hielo seco, inmediatamente después de cortarlos, para transportarlos hasta nuestro lugar de trabajo.

En este estado, ni los corales ni las Prostaglandinas sufren transformaciones ó descomposición. Sin embargo, cuando se almacenan a temperaturas superiores de los refrigeradores comunes (- 15 a - 5 °C), se pueden observar algunas transformaciones químicas en las Prostaglandinas.

Las transformaciones sufridas son en primer lugar, la hidrólisis enzimática de los ésteres metílicos y de los acetatos, produciendo los ácidos carboxílicos y alcoholes correspondientes. En segundo lugar se lleva a cabo, la transformación, en proporción mucho menor, de PGA_2 a PGB_2 .

Estas reacciones de tipo enzimático, sólo pueden ser detenidas a temperaturas menores a los 30 grados bajo cero, lo cual haría muy costoso el proceso de almacenaje.

Ahora bien, si se analizan las repercusiones que tienen éstas transformaciones el valor de las Prostaglandinas, podemos decir que las hidrólisis menciona-

das, son benéficas para la obtención de PGA_2 ; ya que como se mencionó anteriormente, en el proceso de extracción (Método B) - se lleva a cabo una hidrólisis enzimática para facilitar la extracción del material deseado. Sin embargo, la transformación que ocurre a PGB_2 es perjudicial, puesto que ésta Prostaglandina tiene una actividad biológica diferente. Afortunadamente la magnitud de ésta última transformación es despreciable a temperaturas inferiores a $-5\text{ }^\circ\text{C}$.

Es muy importante mencionar que se debe tener un especial cuidado en que las muestras de coral no se sequen, es decir, que la cantidad de agua que contengan, no sea menor a 40 %, ya que hemos observado que partes de las colonias de corales que han sufrido esa pérdida de humedad contienen una proporción de hasta 35 % de PGB_2 , lo cual disminuye considerablemente el valor del material.

El almacenaje de las Prostaglandinas ya extraídas, no presenta mayores problemas, unicamente es necesario guardar el compuesto en recipientes cerrados a temperaturas inferiores a cero grados.

De la misma manera, la proporción de PGA_2 y de PGE_2 no varía en estas mismas condiciones de almacenamiento.

H U M E D A D

El contenido de agua en los corales, no es constante, ya que depende de pequeñas variaciones en el tratamiento que sigue al corte, por lo que es necesario realizar todos los análisis en base al peso seco del coral.

Con el objeto de determinar el porcentaje de agua contenida en los corales se realizaron varias de terminaciones de humedad por el método de Karl - Fischer y se compararon con los resultados obtenidos por el método de pérdida de peso por calor (secado al vacío), en el mismo número de muestras.

Los resultados obtenidos por cualquiera de los dos métodos fueron similares, con pequeñas variaciones del orden de 0.5 a 1.0 %.

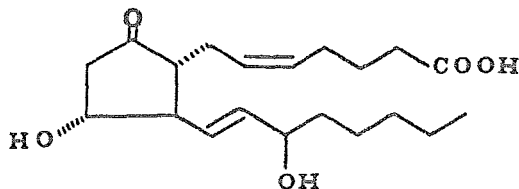
El método de Karl - Fischer es más preciso, pero es también más elaborado y costoso; por lo que se decidió emplear el segundo método de secado directo de las mues tras a 60 °C y al vacío (1mm Hg), todas ellas por triplicado du rante 24 horas.

T R A N S F O R M A C I O N E S

A P G E₂

La última de las finalidades que --
perseguíamos, fue la de la transformación de la Prostaglandina
secundaria PGA_2 , obtenida de los corales, a la Prostaglandina -
primaria PGE_2 .

El principal problema consiste en -
la introducción de un grupo oxhidrilo en la posición 11 y con -
una configuración absoluta (R).



PGE_2

Existe un procedimiento informado -
en la literatura (9), para dicha introducción; también se han -
informado variantes a dicho método (10); sin embargo, ninguno -
de ellos evita la posibilidad de obtener el isómero (S) en la -
posición 11.

Nosotros decidimos ensayar todos --
los procedimientos informados y hacer una evaluación sobre la
costeabilidad y facilidad de implementación de ellos.

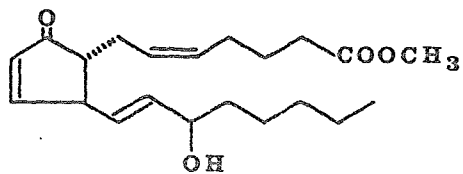
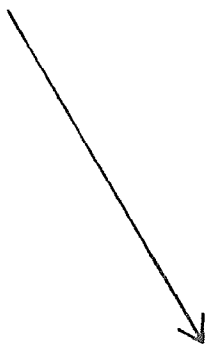
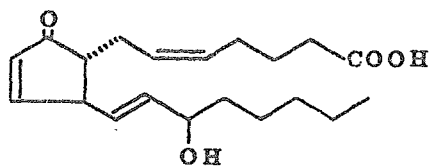
El método básicamente consiste en la epoxidación (11) de la doble ligadura del anillo y una posterior ruptura reductiva del epóxido al correspondiente alcohol. Es imposible tratar de evitar el epímero en el carbono 11, ya que la epoxidación de PGA_2 no puede ser efectuada en una forma estereoespecífica. Solamente a través de derivados sobre el alcohol del carbono 15, puede favorecerse estereoselectivamente (12 - 14) el ataque sobre el epóxido para dar el alcohol α en el carbono 11 en una proporción 95 : 5 a favor del isómero deseado.

Debido a que es más fácil trabajar con los ésteres metílicos de las Prostaglandinas, el primer paso fue la esterificación con Diazometano de la PGA_2 . Esquema - VIII.

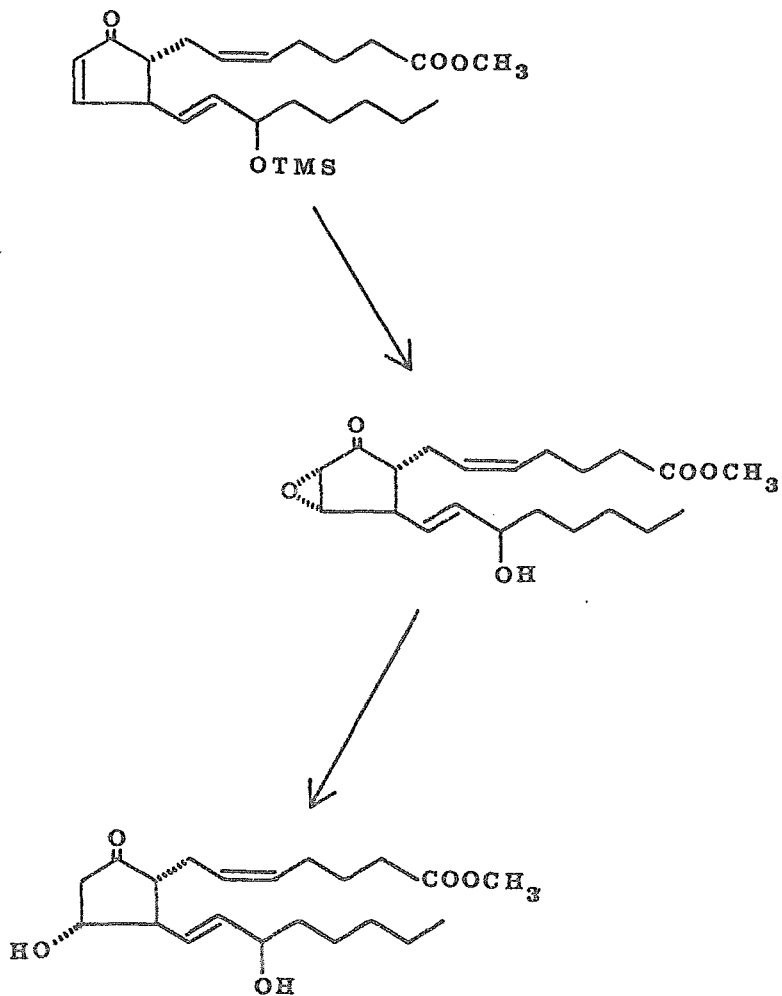
Existen otros procedimientos de esterificación más comunes, como metanol - ácido sulfúrico, que sin embargo no pueden ser utilizados con PGA_2 , ya que puede sufrir una transformación a PGB_2 , además de la deshidratación del oxhidrilo del carbono 15.

El siguiente paso consiste en proteger el oxhidrilo del carbono 15 con el grupo trimetilsilícico (TMS), el cual es lo suficientemente grande como para regular la epoxidación posterior (H_2O_2 - LiOH - Isopropanol) a una relación α (deseado) : β (no deseado) de 80 : 20. Siendo el éter

ESQUEMA VIII



ESQUEMA IX



PGE₂-Me

trimetilsilícico fácilmente hidrolizable en el momento de tra
bajar la reacción de epoxidación. Esquema IX.

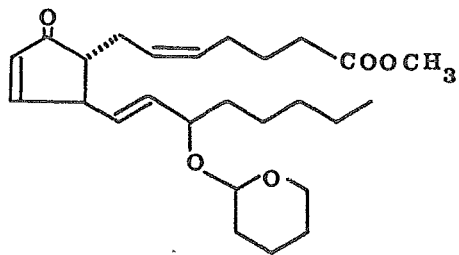
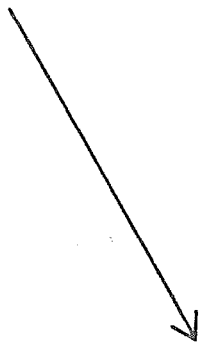
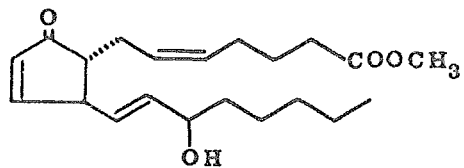
La reacción posterior es la reduc--
ción del epóxido, la cual puede llevarse a cabo con amalgama
de aluminio, siendo éste reactivo barato y fácil de preparar
en grandes cantidades; todo el proceso se lleva a cabo en 40%
de rendimiento y la separación del epímero no deseado, en el
carbono 11, se realiza por cromatografía en placa delgada de
SiO₂.

Se decidió probar un nuevo procedi-
miento utilizando Dihidropirano como grupo protector ya que -
resultaba más económico, para la transformación mencionada, -
que a través del derivado de Trimetil silicio.

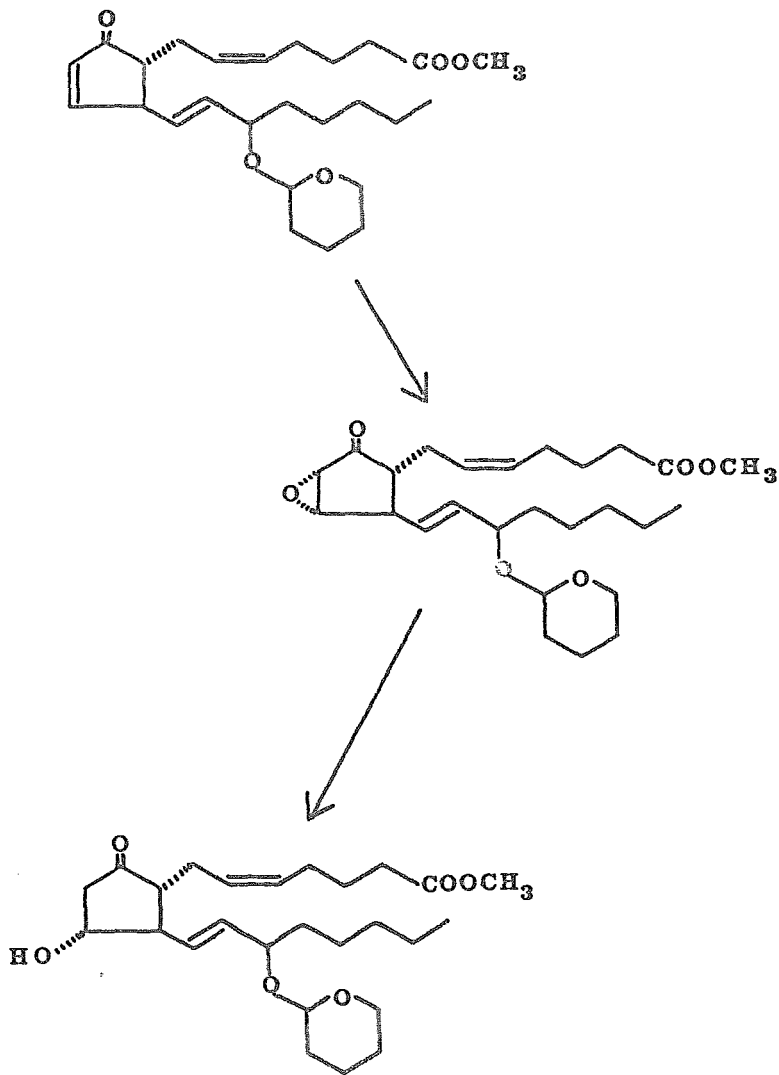
El primer paso es también la esteri
ficación con Diazometano y el tratamiento del éster con Dihi-
dropirano produce el derivado Tetrahidropiranílico (THP), el
cual se somete al mismo procedimiento de epoxidación y reduc-
ción con amalgama de aluminio, para obtener finalmente el de-
rivado Tetrahidropiranílico del éster metílico de PGE₂. Esque-
mas X y XI.

La hidrólisis del THP se lleva a ca
bo con solución acuosa de ácido acético y los epímeros obteni
dos en el carbono 11, también se separan por cromatografía en
placa fina de SiO₂. Por éste procedimiento la relación de --

ESQUEMA X



ESQUEMA XI

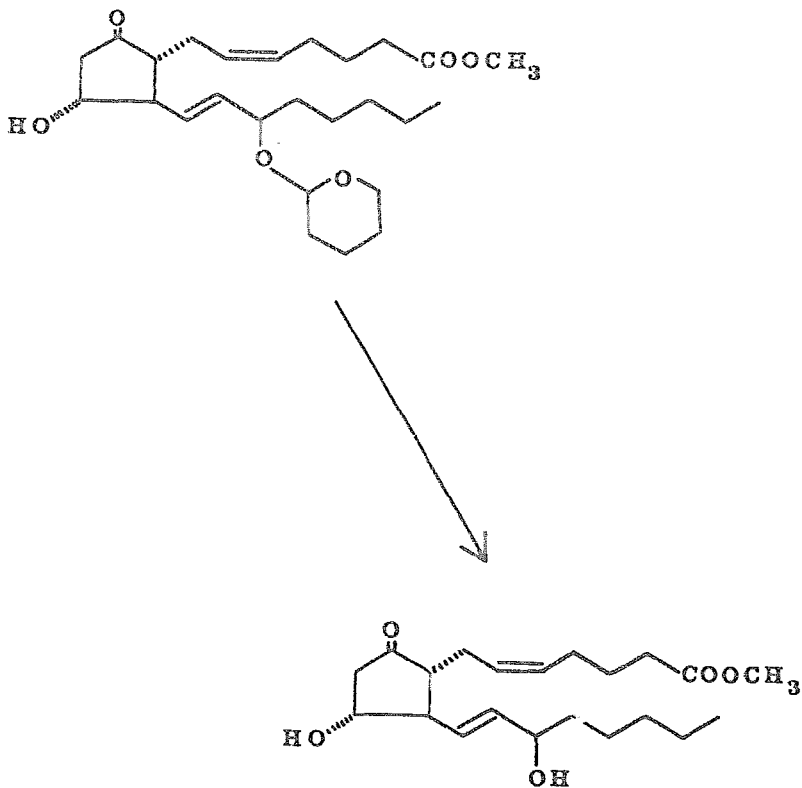


isómeros en el carbono 11, es de 70 : 30 a favor del isómero deseado (11 α).

Es necesario aclarar que todas las transformaciones se realizaron a partir de PGA_2 15 (R) (Prostaglandina de configuración no mamífera), para obtener la correspondiente Prostaglandina de la familia E, puesto que es el material que se obtuvo de los corales del Caribe Mexicano, sin embargo, cabe aclarar, que todo el procedimiento es aplicable a la PGA_2 15 (S), con resultados similares.

Finalmente puntualizamos que las transformaciones químicas para obtener PGE_2 a partir de PGA_2 , fueron realizadas tanto con el éster metílico de PGA_2 , como con el ácido libre. De los resultados obtenidos se concluye que, aunque es más fácil el manejo de los ésteres de las Prostaglandinas, los resultados son similares y solamente dependiendo del tipo de transformación ó modificación que se desee, se recomendaría partir del ácido libre ó éster metílico correspondiente.

ESQUEMA XII



P A R T E

E X P E R I M E N T A L

TECNICA DE EXTRACCION

Aproximadamente 100 gramos de corral molido, se colocaron en 250 ml de una solución acuosa de NaCl y CaCl_2 . Se ajustó el pH entre 7.5 y 8.0 con solución de NaOH al 10 %, y se mantuvo con agitación magnética durante 12 horas a temperatura ambiente.

Se diluyó con 250 ml de acetona, se agitó 5 minutos y se filtró para eliminar el residuo sólido. Este residuo se lavó con agua destilada y se desechó. De nuevo se ajustó el pH de la solución con NaHCO_3 a 8.5; se extrajeron los neutros con una mezcla de acetato de etilo - éter - (1 : 1) (3 X 150 ml).

La solución acuosa se aciduló con HCl concentrado hasta pH entre 3 y 4. Se extrajo la Prostaglandina con una mezcla de acetato de etilo - éter (1 : 1) -- (4 X 150 ml). Se lavó con agua la fase orgánica, hasta pH -- neutro; se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y evaporó. El residuo oleoso se disolvió en metanol y decoloró con carbón activado. Se filtró sobre celita y evaporó a sequedad.

Rendimiento promedio 4 - 5 %.

EXTRACCION POR CENTRIFUGACION

Aproximadamente dos gramos de tejido de coral, se colocaron en 6 ml de solución hipotónica. Se ajustó el pH entre 7.5 y 8.0, con solución de NaOH al 10 % y se agitó durante 12 horas.

Se colocaron en dos tubos de centrifuga, se agregaron 3 ml de acetona a cada tubo, se agitó y se centrifugó; los residuos se lavaron con agua destilada y se desecharon. Se ajustó el pH de la solución a 8.5 con solución saturada de NaHCO_3 . Se colocó la solución en tres tubos y a cada uno se le agregó una mezcla de acetato de etilo - éter (1 : 1) (3 X 4.5 ml), para la extracción de neutros y se centrifugó durante cinco minutos.

Separada la fase orgánica, la fase acuosa se aciduló a pH entre 3 y 4 con HCl concentrado y se centrifugó durante cinco minutos. Se extrajo la Prostaglandina con una mezcla de acetato de etilo - éter (1 : 1) (4 X 9 ml); se agitó y centrifugó durante cinco minutos. La fase orgánica se lavó con agua y se centrifugó para una mejor separación. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y evaporó. Se disolvió en MeOH y decoloró con carbón activado. Se filtró y evaporó a sequedad.

PREPARACION DEL ESTER METILICO DE PGA₂

Un gramo de PGA₂ (2,994 mmoles), se disolvió en 50 ml de éter. Se enfrió a cero grados y se fue -- agregando poco a poco, con agitación magnética, una solución re--
cién preparada de Diazometano (preparada de 0.37 g de N, Nitro--
so metil urea). Terminada la adición, se continuó la agitación
por cinco minutos más y se añadieron dos gotas de ácido acético.
Se evaporó a sequedad resultando un líquido amarillo viscoso, --
el cual se purificó posteriormente por cromatografía en colum--
a. Obteniéndose el producto deseado en 90 % de rendimiento.

I.R. (Película): 3440 cm⁻¹ i (ν -C-OH); 3000 cm⁻¹ d (ν C=C-H);
2950 - 2850 cm⁻¹ f (ν C-H sat.); 1740 cm⁻¹ f (ν C=O de éster);
1710 cm⁻¹ f (ν C=O de ciclopentenona); 1560 cm⁻¹ d (ν C=C-H).

R.M.N. (CDCl₃): 7.43 ppm (dd) 1H (J=2.4 Hz, J=6 Hz); 6.10 ppm
(dd) 1H (J=2 Hz, J=6 Hz); 5.53 ppm (m) 2H; 5.33 ppm (m) 2H; --
4.07 ppm (m) 1H; 3.64 ppm (s) 3H; 3.21 ppm (m) 1H; 2.70 ppm --
(s) 1H; 2.50 - 1.05 ppm (m) 17H; 0.82 ppm (t) 3H (J=4 Hz).

U.V. (Metanol): 217 nm (ε=9800).

PREPARACION DEL ETER 15 - TETRAHIDROPIRANILICO
DEL ESTER METILICO DE PGA₂

En un matraz de bola de 100 ml, -- con trampa para humedad, se disolvieron 500 mg (1.43 mmoles) de PGA₂Me Ester, en 6.25 ml de CH₂Cl₂. Se agregaron, con agitación magnética, 0.24 ml (2.92 mmoles) de Dihidropirano --- (DHP) y 0.035 ml de una solución al 10 % de ácido para - to-- luen sulfónico. La reacción se siguió por ccf y duró aproximadamente 20 minutos. Al cabo de este tiempo se agregaron 5 gotas de piridina y 20 ml de éter.

La reacción se extrajo con acetato de etilo (3 X 20 ml); las fases orgánicas se lavaron dos veces con solución saturada de NaCl y se secó sobre MgSO₄ anhidro. Se evaporó a sequedad. El rendimiento es del 90 %.

I.R. (Película): 3005 cm⁻¹ d (νC=C-H); 2940 - 2869 cm⁻¹ f -- (νC-H sat.); 1740 cm⁻¹ f (νC=O de éster); 1710 cm⁻¹ f (νC=O de cetona αβ no saturada); 1020 cm⁻¹ m (ν-C-O).

R.M.N. (CDCl₃): 7.42 ppm (dd, 1H, J=6 Hz, J=2.4 Hz); 6.05 ppm (dd, 1H, J=6 Hz, J=2 Hz); 5.42 ppm (m, 4H); 4.52 ppm (m, 1H); 3.51 ppm (m, 7H); 2.42 - 0.95 ppm (m, 25H); 0.78 ppm (t, 3H) - (J=5 Hz).

ORTENCION DE PGE₂

En un matraz de bola de 50 ml se disolvieron 500 mg (1.43 mmoles) de PGA₂ en 3 ml de tetrahydro furano (THF) anhidro, con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno. Se adicionó 1 ml de una solución al 5 % de cloruro de trimetil silicio en hexametil disilazano y se mantuvo a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, siguiendo la reacción por cromatografía en capa fina (ccf). El producto siliilado se concentró a presión reducida para eliminar el THF. Se obtuvieron 567 mg de un líquido amarillo viscoso con un 90 % de rendimiento.

Los 567 mg de producto crudo de la reacción anterior, disueltos en 11.7 ml de isopropanol, se vertieron en un matraz de bola de tres bocas, provisto de embudo de adición, termómetro y atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a - 40°C y se adicionó, gota a gota, una mezcla de 1 ml de H₂O₂ al 30 % y 1.2 ml de LiOH 3N. Terminada la adición se dejó subir la temperatura a - 30°C y el progreso de la reacción se controló por ccf. La reacción se suspendió agregando 3.5 ml de una solución de HCl 1N, y se concentró a presión reducida para eliminar el isopropanol.

Se vertió en 20 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 X 20 ml). Las fases orgánicas se lavaron con solución saturada de NaCl (2 X 20 ml), se seca

ron sobre Na_2SO_4 anhidro y evaporaron a sequedad; obteniéndose un residuo aceitoso con un 70 % de rendimiento.

Este material crudo, se redisolvió en 5 ml de éter, con agitación y enfriamiento a -18°C .

Se adicionaron 0.35 ml de una solución de metanol - agua (9:1) y se agregaron poco a poco 500 mg de amalgama de aluminio (7) recién preparada. Terminada la adición se llevó a temperatura ambiente; la reacción se siguió por ccf y duró aproximadamente 3.5 horas, después de lo cual la mezcla de reacción se filtró sobre celita, lavando -- abundantemente la amalgama residual con acetato de etilo. La solución orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó a sequedad, obteniéndose un 50 % de rendimiento del producto crudo.

La PGE_2 cruda se purificó por ccf en placas de 1 m X 20 cm, empleando como eluyente la mezcla hexano - acetato de etilo (7:3). Como producto principal se obtuvo la PGE_2 y un 10 % de 11 α -epi- PGE_2 .

I.R. (Película): 3440 cm^{-1} i (ν -OH); $2910 - 2845\text{ cm}^{-1}$ f --- (ν C-Hsat.); 1740 cm^{-1} f (ν C=O de éster); 1710 cm^{-1} f (ν C=O de ciclopentanona); 1060 cm^{-1} m (ν C-O-).

R.M.N. (CDCl_3): 5.65 ppm (m, 2H); 5.32 ppm (m, 2H); 4.06 ppm (m, 1H); 3.64 ppm (s, 3H); 3.40 ppm (s, 1H); 2.68 - 0.70 ppm (m, 26H).

TRANSFORMACION DE PGA_2 A PGB_2

En un matraz de bola de 100 ml, se colocaron 75 mg de PGA_2 (2.18 mmoles) en 35 ml de solución de KOH 1N, en metanol; con agitación magnética y a 37 °C. La reacción se controló por ccf. Duró aproximadamente 45 minutos. La mezcla de reacción se aciduló con HCl 1N, hasta pH ácido. El producto se extrajo con acetato de etilo (3 X 20 ml). Se lavó con agua hasta pH neutro; se secó y evaporó. El rendimiento obtenido es del 90 %.

I.R. (Solución CHCl_3); 3400 cm^{-1} i (v-OH); 2925 - 2850 cm^{-1} m (v C-H sat.); 1710 cm^{-1} f (v C=O de ciclopentenona y ácido carboxílico); 1200 cm^{-1} d (v C-O-).

R.M.N. (CDCl_3): 6.86 ppm (d, 1H, $J=15.8$ Hz); 6.25 ppm (dd, 1H $J=15.8$ Hz, $J=5.5$ Hz); 5.35 ppm (m, 2H); 4.28 ppm (m, 1H); --- 3.02 - 0.70 ppm (m, 15H).

C O N C L U S I O N E S

En base a los estudios realizados, sobre el coral blando PLEXAURA homomalla de las costas del Caribe Mexicano, se pueden concluir los siguientes puntos de acuerdo con los resultados obtenidos.

1.- El contenido de Prostaglandina (5.8 en promedio), en las muestras de los corales colectados mensualmente durante un año en una misma zona del Caribe Mexicano (NIZUC), permanece constante y es superior a las cantidades informadas en la literatura (3 - 4%) para los corales de otras zonas del Caribe (Florida y Bahamas).

2.- Los corales estudiados en las diferentes zonas del Caribe Mexicano, desde Punta Nizuc hasta 12 kilómetros al sur de Tulum (120 km de litoral), presentan ciertas irregularidades en el contenido de Prostaglandinas (4.4 a 6.7%), sin embargo la cantidad sigue siendo superior a las informadas. Por otro lado se comprobó que el método de colecta es importante para obtener resultados óptimos en la extracción de la Prostaglandina.

Fueron desarrollados métodos para el análisis de Prostaglandinas en los corales, a diferentes escalas, siendo todos ellos muy precisos, destacando los métodos espectrofotométricos.

3.- El método original de extracción de las Prostaglandinas, con el cual se inició este estudio, sufrió una serie de transformaciones con el progreso de esta in

vestigación, que concluyó con el desarrollo de un nuevo método, de alta eficiencia, completamente diferente al descrito en la literatura.

4.- Se desarrollaron técnicas de identificación rápida de Prostaglandinas, a escala micro, directamente de los corales colectados, los cuales incluyen la identificación de $PGA_2-15(R)$, $PGA_2-15(S)$, PGB_2 y PGE_2 , así como de sus respectivos ésteres metílicos.

5.- Todas las técnicas de transformación de la Prostaglandina secundaria PGA_2 a la Prostaglandina primaria PGE_2 , han sido ensayadas en el laboratorio y se está determinando cuales son las condiciones óptimas para dicha transformación.

6.- Se estableció, sin lugar a dudas, que la PGA_2 , de los corales colectados en el Caribe Mexicano, contienen solamente $PGA_2-15(R)$, o sea, el carbono 15 tiene la configuración contraria a las Prostaglandinas obtenidas de los mamíferos y de los corales de Bahamas.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- R. Kurzrok and C. Lieb
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26, 268 (1930).
- 2.- M. W. Goldblatt
Biochem. J. 29, 1346-57 (1935).
J. Physiol. 84, 208-18 (1935).
- 3.- U. S. von Euler
J. Physiol (Lon.) 88, 213 (1936).
Naunyn - Schmiedengerg Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.
175, 78 (1936).
- 4.- S. Bergstom and J. Sjovall
Act. Chim. Scand. 11, 1086 (1957).
Act. Chim. Scand. 14, 1693 (1960).
- 5.- A. J. Weinheimer and R. L. Spraggins
Tetrahedron Letters 59, 5185 (1969).
G. L. Bundy, E. G. Daniels, F. H. Lincoln and J. E. Pike
J.A.C.S. 94, 2124 (1972).
- 6.- W. P. Schneider, R. D. Hamilton and L. E. Rhuland
J.A.C.S. 94, 2122 (1972).
- 7.- M. Hamberg and B. Samuelson
J. Biol. Chem. 241, 257 (1966).
- 8.- A. Prince, F. S. Alvarez and J. Young
Prost. 3, 531 (1973).
- 9.- G. L. Bundy, W. P. Schneider, F. H. Lincoln and J. E. Pike
J.A.C.S. 94, 2123 (1972).

- 10.- E. J. Corey and H. E. Ensley
J. Org. Chem. 38, 3187 (1973).
- 11.- F. Weitz and A. Scheffer
Chem. Ber. 54, 2327 (1921).
- 12.- W. P. Schneider, G. L. Bundy, F. H. Lincoln and J. E. Pike
Chem. Comm. 254 (1973).
- 13.- W. P. Schneider, G. L. Bundy, F. H. Lincoln,
E. G. Daniels and J. E. Pike.
J.A.C.S. 99, 1222 (1977).
- 14.- J. E. Pike, F. H. Lincoln and W. P. Schneider
J. Org. Chem. 34, 3552 (1969).