

COMPONENTES DE LA FRACCIÓN ANTIMITÓTICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MACROALGA *Digenia simplex*

CHEMICAL COMPOUNDS OF ANTIMITOTIC FRACTION IN ETHANOL EXTRACT FROM SEAWEED *Digenia simplex*

Hernán VALLE Z.¹, Sandra OSPINA G.¹, Elkin GALEANO J.², Alejandro MARTÍNEZ M.²,
María E. MARQUEZ F.¹ y Juan B. LÓPEZ O.^{1*}

Recibido: Agosto 8 de 2007 Aceptado: Febrero de 2008

RESUMEN

En las últimas décadas, la búsqueda de sustancias antineoplásicas en organismos marinos y especialmente en algas marinas, muestra resultados promisorios en el desarrollo de fármacos antitumorales. Entre estas algas se encuentra *Digenia simplex*, la cual contiene una fracción química en su extracto etanólico con potente efecto antimitótico y citotóxico. Para dilucidar la estructura molecular de los compuestos constituyentes de ésta fracción bioactiva, se realiza un análisis por resonancia magnética nuclear (RMN), y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de los derivados trimetilsililéteres (derivados TMS). El análisis permite inferir la presencia de una mezcla de compuestos, tales como: azúcares libres, ácidos grasos, nitrilos alifáticos, aminas secundarias alifáticas y monoacilgliceroles.

Palabras clave: *Digenia simplex*, algas marinas, antitumorales.

ABSTRACT

In last decades, antineoplastic substances have been found in marine organisms and especially in marine seaweeds, showing promissory results in antitumor drug development. Among these organisms is the seaweed *Digenia simplex*, which bears a biologically active fraction with a powerful antimitotic and cytotoxic effect, contained in its ethanol extract. In order to elucidate molecular structure of constituent compounds from this bioactive fraction, nuclear magnetic resonance (NMR) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) analysis was conducted. A compounds mixture, such as: free sugars, fatty acids, aliphatic nitriles, aliphatic secondary amines and monoacylglycerols, were found from this analysis.

Key word: *Digenia simplex*, seaweed, antitumoral.

1 Grupo de Investigación Biotecnología Animal, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Calle 59A 63-020 Autopista Norte, teléfono: 4309072. Medellín, Colombia

2 Grupo de Investigación Productos Naturales Marinos, Universidad de Antioquia, Calle 67 53-108, Laboratorio 2-131, Medellín, Colombia

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: jblopez@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas son una fuente reconocida de agentes antibacterianos, antivirales, citotóxicos y especialmente, antitumorales. Al revisar la literatura científica de las algas rojas en particular, se encuentra que los componentes bioactivos comprenden básicamente compuestos terpenoides y polifenólicos con y sin halógenos (1, 2). Los extractos crudos o parcialmente purificados que contienen polisacáridos y/o glicoproteínas de ciertas algas marinas, son efectivos contra algunos tumores experimentales, lo que indica que estas sustancias o una combinación de varios componentes de los extractos ejerce dicha actividad biológica (3). También existen reportes de moléculas con actividad antitumoral procedentes de macroalgas rojas, tales como: thyriferil-23-acetato (*Laurencia obtusa*) y halomon (*Portieria hornemannii*) (4). En lo que concierne a la macroalga roja *Digenia simplex* se han identificado compuestos con estructuras variadas (ácidos grasos, esteroides, monoterpenoides, aminoácidos y polisacáridos coloidales), entre los que se destacan: el ácido kaínico (digénico) y el α -D-manopiranosil- α -D-glicerato de sodio, que presentan actividad antihelmíntica (5, 6); aunque no existen reportes de actividad antitumoral causada por alguno de los compuestos identificados en *Digenia simplex*, es importante resaltar que una fracción química de su extracto etanólico presenta actividad antimitótica sobre la línea celular Jurkat

(7); éste hallazgo condujo al planteamiento de una nueva investigación que permitiera determinar la estructura química de los componentes de dicha fracción. Para lograr este objetivo, una muestra de la fracción bioactiva fue analizada por resonancia magnética nuclear, luego se derivatizó obteniendo los derivados trimetilsililéteres, para ser y analizada mediante la técnica CG-EM. El análisis de los espectros de masas de los compuestos separados, sugiere la presencia de tres azúcares libres, tres ácidos grasos, dos nitrilos alifáticos, una amina secundaria alifática y cuatro monoacilglicérols.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de la Fracción Antimitótica

La macroalga *Digenia simplex* fue recolectada en el Parque Natural Tayrona (Santa Marta-Colombia), y clasificada taxonómicamente por la bióloga marina Sandra Ospina. Un ejemplar de la macroalga se registró en Invermar con el código RHD 441. Una vez recolectada la muestra, esta fue limpiada de la epibiosis, secada a temperatura ambiente y pulverizada con un molino eléctrico para someterla a extracción con etanol; a partir del extracto etanólico se aisló la fracción bioactiva mediante separación cromatográfica bidirigida (7). En el gráfico 1 se esquematiza el proceso de obtención de la fracción antimitótica.

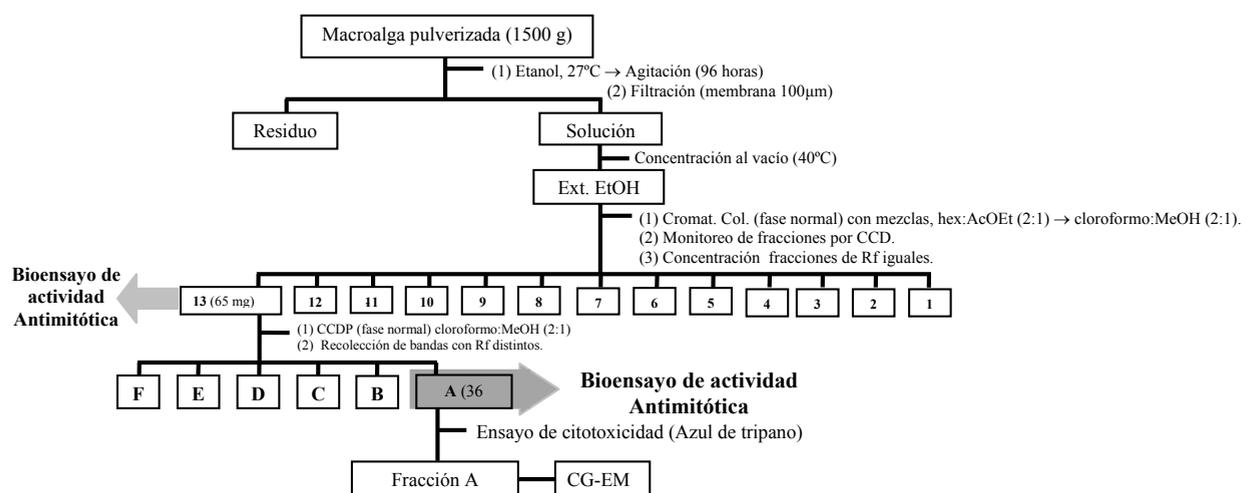


Gráfico 1. Diagrama del proceso de fraccionamiento bidirigido (mediante actividad antimitótica) del extracto etanólico de *Digenia simplex*

Análisis de la Fracción Antimitótica

La fracción bioactiva se analizó por RMN, con cloroformo deuterado y metanol deuterado, en un espectrómetro Bruker AMX-300. Los espectros RMN- ^1H se determinaron a 300 MHz, y los de RMN- ^{13}C a 75 MHz. Como referencia se utilizó tetrametilsilano.

Debido a la alta polaridad de la fracción, se sospechó la existencia de compuestos hidroxilados y se decidió obtener sus derivados TMS. Para esto se mezclaron con agitación 2 mg de muestra con 0.4 mL de piridina y 0.8 mL del agente sililante, trimetil-silil-acetamida a 40°C por una hora. La mezcla se inyectó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, lo cual permitió conocer el patrón de fragmentación de sus compuestos constituyentes y sus pesos moleculares. El análisis por CG-EM, se realizó en un equipo Agilent® modelo 6890N utilizando una columna capilar de sílica fundida HP-5 (30m x 0.25mm d.i.) y helio como gas de arrastre a 1.0 mL/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 150°C durante 2 minutos, subió a 200°C (a 10°C/min) y permaneció 15 min y por último subió

a 250°C (a 3°C/min) permaneciendo 20 min para un total de 60 minutos. La relación de split fue 1:10 y el volumen de inyección fue de 1 μL . El espectrómetro de masas utilizó una fuente de ionización de 70 eV, y un filamento de 60 μA mantenido a 250°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro RMN- ^1H en metanol de la fracción activa, muestra señales intensas a 1.3 ppm (multiplete) característico de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos, y una mezcla compleja de señales entre 3 y 4 ppm, características de protones de carbohidratos. Debido a este resultado y la alta polaridad de esta fracción (observada por CCD), se decidió analizarla en forma derivatizada por CG-EM. En el cromatograma obtenido por la técnica CG-EM, se puede observar una mezcla de 17 compuestos separados (véase figura 1), de los cuales 16 fueron identificados y solo faltó por identificar el compuesto 11. Para la identificación estructural de los compuestos, se analizaron sus espectros de masas (por impacto electrónico).

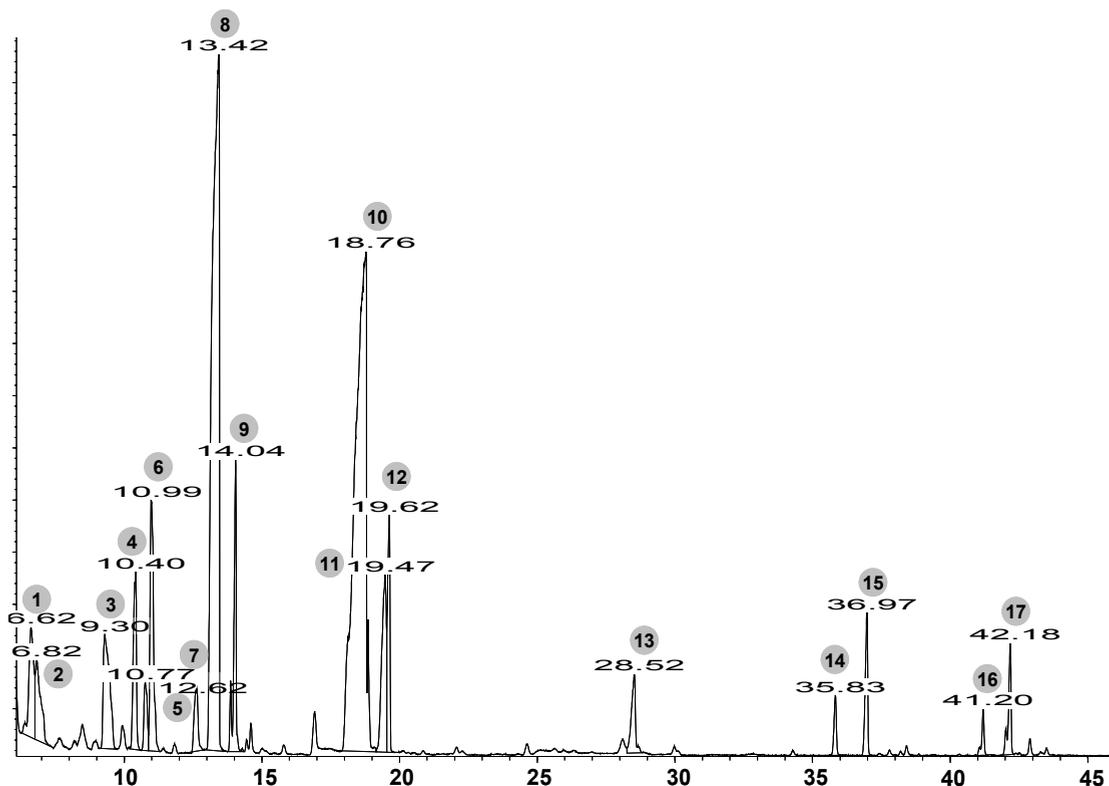


Figura 1. Cromatograma de gases de la fracción activa obtenida del extracto etanólico de la macroalga *Digenia simplex*.

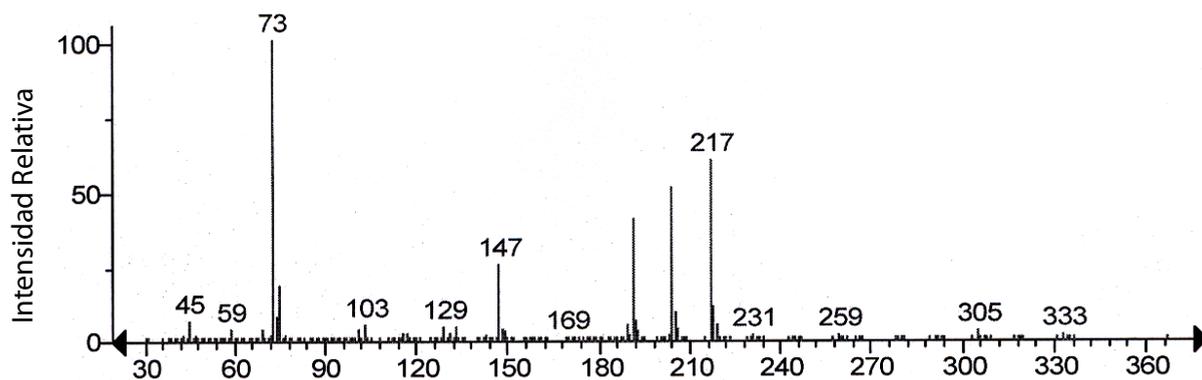


Figura 2. Espectro de masas del componente 1.

En el espectro de masas del componente 1 (que es muy similar para el componente 2) no es visible la señal del ión molecular, sin embargo se observa el ión generado por la pérdida de un radical metilo más una molécula de trimetilsilanol a partir del ión molecular, en un valor de m/z 333 ($M-CH_3-(CH_3)_3SiOH$); por lo anterior se deduce que el ión molecular corresponde a la señal de m/z 438 y que pertenece al compuesto de fórmula $C_{17}H_{42}O_5Si_4$. El fragmento con valor de m/z 259 se origina por la pérdida de un radical trimetilsililoxi más una molécula de trimetilsilanol a partir del ión molecular ($M-TMSiO^{\cdot}-TMSiOH$); éste fragmento pierde una molécula de trimetilsilanol para formar el ión con m/z 169 ($259-90$). El ión $M-118$ surge por la eliminación de la molécula neutra $O=CH-O-Si(CH_3)_3$ a partir del ión molecular y corresponde a la señal en m/z 320; el ión $M-(118+89)$ con valor de m/z 231 también está presente y se origina por la ruptura de un radical trimetilsililoxi a partir de la señal en m/z 320. La señal en m/z 129 corresponde al ión $[(CH_3)_3Si-O-CH-CH=CH_2]^+$, que fue eliminado del ión molecular.

La señal en m/z 305 se debe al fragmento, $[TMSiO-CH=C(OTMSi)-CH-OTMSi]^+$ que se generó por una doble ruptura del ión molecular más la pérdida de un átomo de hidrógeno. El fragmento anterior, sin la pérdida del átomo de hidrógeno (m/z 306), sufre la ruptura de un radical trimetilsililoxi formando el ión $[TMSi-O-CH=CH-CH-O-TMSi]^+$ con valor de m/z 217. Las señales en m/z 204 y 103 se originan por los fragmentos, $[TMSiO-CHCH-OTMSi]^+$ y $[CH_2=OSi(CH_3)_3]^+$ que son eliminados a partir del ión molecular. La eliminación de una molécula de formaldehído (CH_2O) en el fragmento de m/z 103, genera la señal en m/z 73. Las señales en m/z 191 y 147 se deben a la formación de los fragmentos: $[(CH_3)_3SiO-CH=OSi(CH_3)_3]^+$ y $[(CH_3)_3Si-O-Si(CH_3)_2]^+$, respectivamente, a partir del ión molecular. Las señales en m/z 305, 217, 204 y 147, son características de trimetilsilil éteres de carbohidratos y por ser el pico base la señal de valor en m/z 217, se asigna la forma furanosa al compuesto en cuestión (8). El análisis anterior permite proponer la estructura 1,2,3,5-tetra-O-trimetilsilil-ribofuranosa.

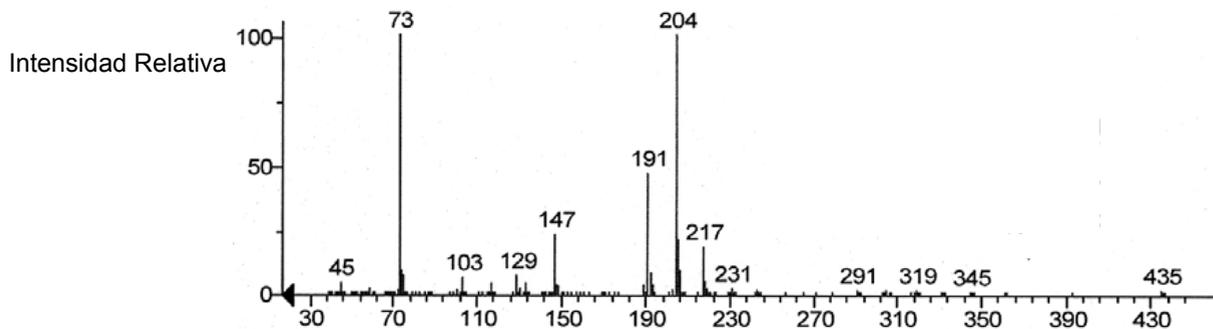


Figura 3. Espectro de masas del componente 3.

En el espectro de masas del componente 3 (que es muy similar para los de los componentes 5 y 7) no se observa el ión molecular y en su lugar aparece el ión $M-CH_3-TMSiOH$ en un valor de m/z 435; en consecuencia el ión molecular tiene un peso molecular de 540 u.m.a y pertenece al compuesto de fórmula $C_{21}H_{51}O_6Si_5$. El ión $M-CH_3-TMSiOH$ (m/z 435) pierde una molécula de trimetilsilanol para generar la señal en m/z 345. El ión molecular también se descompone perdiendo un radical trimetilsililoxi más una molécula de trimetilsilanol ($M-TMSiO\cdot-TMSiOH$) produciendo el fragmento con valor de m/z 361. La señal de m/z 319 se origina por la pérdida de un radical trimetilsililoxi más una molécula neutra $O=CH-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ a partir del ión molecular y la señal en m/z 305 se debe al fragmento: $[TMSiO-CH=C(OTMSi)-CH-OTMSi]^+$ que se generó por una doble escisión del ión molecular con pérdida de un átomo de hidrógeno. El fragmento anterior, sin la pérdida del átomo de hidrógeno ($305+1$), sufre dos tipos de rupturas; en la primera, pierde un radical metilo para generar la señal en m/z 291 y en la segunda, un radical trime-

tilsililoxi para formar el ión $[TMSi-O-CH=CH-CH-O-TMSi]^+$ con valor de m/z 217.

La señal en m/z 129 se debe a la pérdida de una molécula $(CH_3)_3Si-O-Si(CH_3)_3$ a partir del fragmento con m/z 291 y también al ión $[(CH_3)_3Si-O-CH-CH=CH_2]^+$, que fue eliminado del ión molecular. Los fragmentos $[TMSiO-CHCH-OTMSi]^+$ y $[CH_2=OSi(CH_3)_3]^+$ con valores de m/z 204 y 103, se desprenden del ión molecular. El ión en m/z 73 surge por la eliminación de una molécula de formaldehído (CH_2O) a partir del fragmento de m/z 103. La señal en m/z 191 se debe a la formación (vía rearrreglo) del fragmento $[(CH_3)_3SiO-CH=OSi(CH_3)_3]^+$, a partir del ión molecular; y por último, el ión con valor de m/z 147 de fórmula $[(CH_3)_3Si-O-Si(CH_3)_2]^+$, surge por ruptura del ión molecular. Las señales en m/z 305, 217, 204 y 147, son características de trimetilsilil éteres de carbohidratos y por ser pico base la señal de valor en m/z 204, se asigna la forma piranosa al compuesto en cuestión (8). El análisis anterior permite proponer la estructura 1,2,3,4,6-penta-O-trimetilsilil-glucopiranososa (véase figura 3).

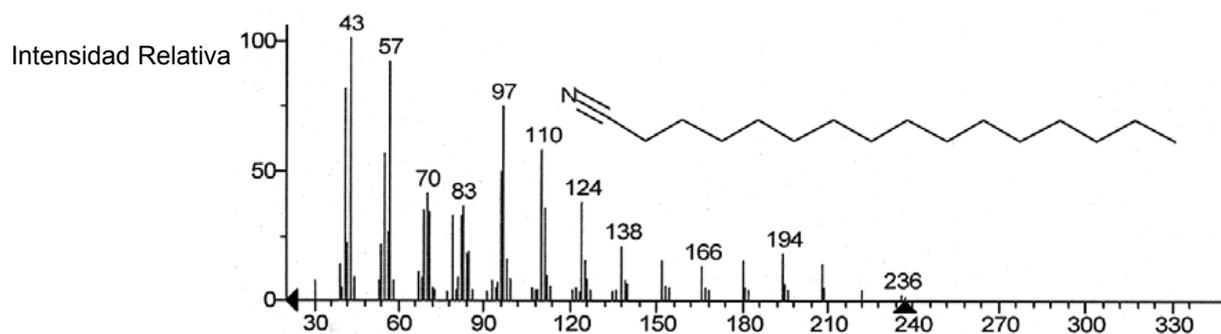


Figura 4. Espectro de masas del componente 4.

En este espectro de masas (Figura 4), el ión molecular está ausente, sin embargo se aprecia una señal m/z 236 correspondiente al ión $M-1$ formado por la pérdida de un hidrógeno a partir del compuesto de fórmula $C_{16}H_{31}N$ (Rompiendo enlaces sencillos $C-C$ (exceptuando el próximo al átomo de N) provenientes de una cadena alifática lineal generan una serie de señales homólogas de número de masa par correspondientes a los fragmentos $(CH_2)_n-C\equiv N^+$; éstas señales aparecen en los valores de m/z : 222, 208, 194, 180, 166, 152, 138, 124, 110, 96, 82, 68, 54,

40 (débil). Se aprecia una señal intensa m/z 97, la cuál es característica de nitrilos de cadena lineal con más de 8 átomos de carbono y que corresponde a un fragmento cíclico de 6 miembros generado por la pérdida del fragmento neutro $CH_2=CH-(CH_2)_7-CH_3$ a partir del ión molecular ($M-C_{10}H_{20}$).

También están presentes los iones m/z 43 y 57 correspondientes a la escisión simple de los fragmentos C_3H_7 y C_4H_9 . Toda esta información permite afirmar que el compuesto analizado corresponde al hexadecanonitrilo.

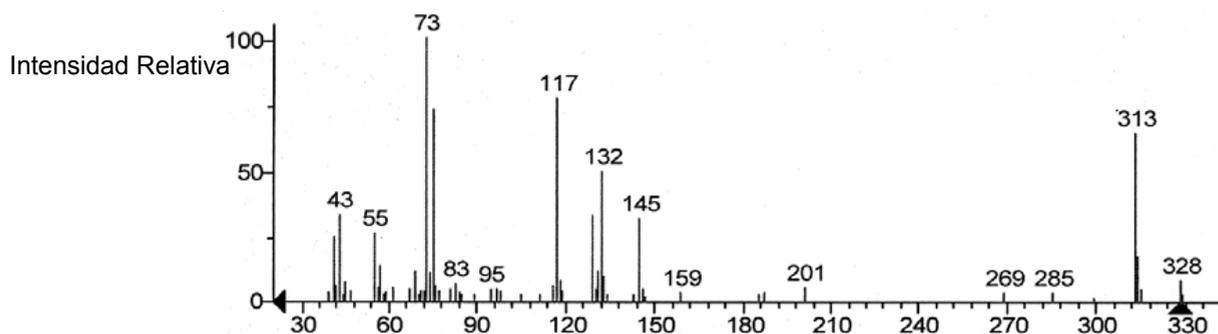


Figura 5. Espectro de masas del componente 8.

El espectro de masas del componente 8 (Figura 5), muestra el fragmento con valor m/z de 328 que corresponde al ión molecular de fórmula $C_{19}H_{40}O_2Si$ y la señal m/z 313 que resulta de la pérdida de un grupo metilo a partir del ión molecular ($M-CH_3$). Es notoria la señal en m/z 132 que indica la presencia de un trimetilsililéster alifático y que se debe a el fragmento $[CH_2=C(OH)-OSi(CH_3)_3]^+$ generado por la pérdida del fragmento neutro $CH_2=CH-(CH_2)_{11}-CH_3$ a partir del ión molecular ($M-C_{14}H_{28}$) mediante un Rearreglo de McLafferty que implica la transferencia de un hidrógeno al átomo de oxí-

geno del grupo carbonilo, desde el carbono γ del mismo. Se aprecian las señales en m/z : 285, 201, 187, 159, 145 y 117, producidas por los fragmentos $[(CH_2)_{12}-C(O)O-TMSi]^+$, $[(CH_2)_6-C(O)O-TMSi]^+$, $[(CH_2)_5-C(O)O-TMSi]^+$, $[(CH_2)_3-C(O)O-TMSi]^+$, $[(CH_2)_2-C(O)O-TMSi]^+$ y $[O\equiv CO-TMSi]^+$ (9). La señal en m/z 73 corresponde al radical trimetilsililo $[Si(CH_3)_3]^+$ y las que se observan en m/z 43 y 57 son causadas por los fragmentos $C_3H_7^+$ y $C_4H_9^+$ que surgieron por escisión simple. El anterior análisis del compuesto en cuestión sugiere la estructura del hexadecanoato de trimetilsililo.

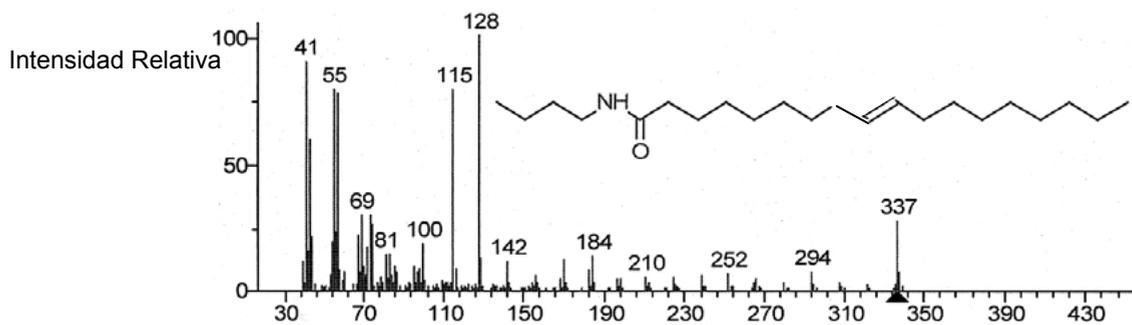


Figura 6. Espectro de masas del componente 13.

El espectro de masas del componente 13, muestra el fragmento en m/z 337 que corresponde al ión molecular de fórmula $C_{22}H_{43}NO$. El ión molecular pierde en forma sucesiva 14 unidades de masa atómica produciendo las siguientes señales con valores de m/z : 322, 308, 294, 280, 266, 252, 238, 224 y 210; la aparición de las señales 197 y 184 se explica por la pérdida sucesiva de 13 unidades de masa atómica a partir del fragmento con valor de m/z 210. Las señales en m/z : 170, 156, 142 y 128, también se deben a la pérdida sucesiva de 14 unidades de masa atómica a partir del ión con valor de m/z 184. La señal en m/z 115 $[CH_2=C(OH)-NH-(CH_2)_3-CH_3]^+$ se explica mediante un rearreglo de McLafferty que sufren las monoamidas de cadena lineal y que corresponde al

fragmento del ión molecular surgido por la escisión del enlace ubicado entre los carbonos α y β de la cadena acíclica con transferencia de un hidrógeno del carbono γ hacia el átomo de oxígeno carbonílico. El fragmento de m/z 115 pierde los radicales hidroxilo y metilo (de la cadena N-alquílica) para generar el ión con valor de m/z 83, a partir del cual surgen, por pérdida escalonada de tres radicales metilenos de la cadena N-alquílica, las siguientes señales con valores de m/z : 69, 55, y 41. El fragmento de m/z 100 corresponde al ión $[CH_3-(CH_2)_3-NH-C=O]^+$ el cual resulta de su separación del ión molecular por rompimiento del enlace $C\alpha-C$ carbonílico. La señal en m/z 73 corresponde a la molécula neutra $CH_3-(CH_2)_3-NH_2$ que se forma por ruptura del

ión molecular más la transferencia de un hidrógeno procedente de la cadena acídica. Por último, las señales en m/z : 43 y 57 se deben a la escisión

simple de los fragmentos C_3H_7 y C_4H_9 . El análisis anterior sugiere para el compuesto 13, el nombre de: N-butil-8-octadecenamida.

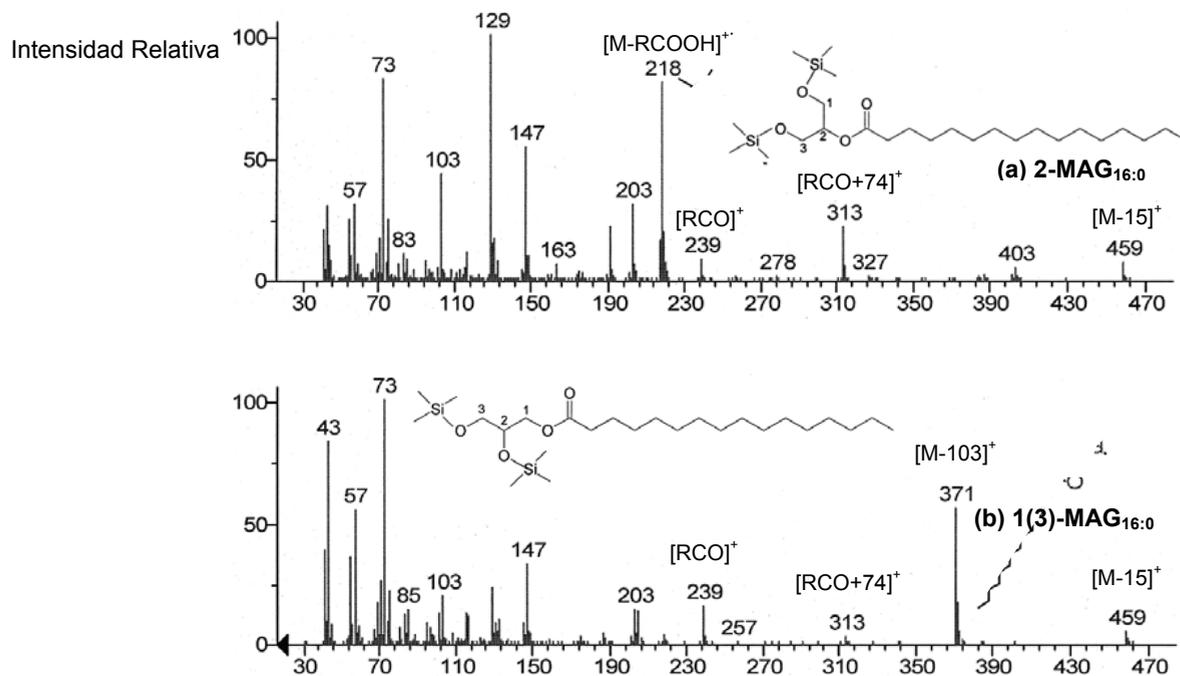


Figura 7. Espectro de masas y estructura propuesta para los compuestos 14 (a) y 15 (b) provenientes de la fracción activa.

Los componentes 14 al 17 (véase figura 1) pertenecen al grupo de compuestos denominados trimetilsilil éteres de monoacilglicerol (MAG-TMS éteres) y dos de ellos (14 y 15) son isómeros estructurales que pudieron diferenciarse por la intensidad de las señales generadas y por señales características para cada tipo de isómero. El ión $[M-103]^+$ es más abundante en todos los 1- o 3-MAG-TMS éteres (véase figura 7b) y corresponde a los iones $[M-(CH_3)_3SiOCH_2]^+$, generados por ruptura entre los carbonos 2 y 3, o 1 y 2. El ión en m/z 205 es característico para todos los sn-1(3)-isómeros y corresponde al fragmento $[(CH_3)_3SiO]_2C_2H_3^+$ formado por la parte del esqueleto de glicerol que incluye los grupos TMS de los sn-1(3)-isómeros. La señal en m/z 218 es característica de todos los sn-2-isómeros (véase figura 7a) y se debe al ión $[M-RCOOH]^+$ formado por el esqueleto de glicerol con sus grupos TMS (vía rearrreglo de McLafferty). Tanto los iones en m/z 73, 75, 129 y 147, como los iones $[M-15]^+$, RCO^+ y $[RCO+74]^+$ son comunes en todos los MAG-TMS éteres (10). En la tabla 1 se muestran los 16 compuestos identificados y su abundancia relativa.

Tabla 1. Compuestos identificados en la fracción antimitótica más activa (fracción A) de la macroalga *Digenia simplex* (los tiempos de retención corresponden a los derivados TMS).

Compuesto (Pico #)	Nombre	Tiempo Ret. (minutos)	Abundancia Relativa (%)
1	Ribofuranosa (isómero 1)	6.6	3.1
2	Ribofuranosa (isómero 2)	6.8	2.5
3	Glucopiranososa (isómero 1)	9.3	4.1
4	Hexadecanonitrilo	10.4	3.2
5	Glucopiranososa (isómero 2)	10.8	1.3
6	Talopiranososa	11.0	4.9
7	Glucopiranososa (isómero 3)	12.6	1.4
8	Ácido Hexadecanoico	13.4	27.5
9	7-Hexadecanonitrilo	14.0	3.9
10	Ácido 5-Octadecenoico	18.8	33.3
11	Sin Identificar	19.5	4.5
12	Ácido Octadecanoico	19.6	3.4
13	N-butil-8-octadecenamida	28.5	1.9
14	2-Monopalmitilglicerol	35.8	0.8
15	1(3)-Monopalmitilglicerol	37.0	2.0
16	2-Monoestearilglicerol	41.2	0.6
17	1(3)-Monooleoilglicerol	42.2	1.7

Los cuatro monoacilgliceroles identificados constituyen el 5.1% del total de la fracción y aunque no se reporta actividad antimetabólica ni anticancerígena en éstos, es importante señalar que un grupo de compuestos similares, denominados 1-O-acil-2-O-β-D-glucopiranosil-gliceroles (presentes en varias algas marinas), han sido objeto de estudio los últimos años por su interesante actividad antitumoral *in vitro* y se encontró que el 1(3)-O-hexadecanoil-2-O-β-D-glucopiranosil-glicerol y el 1(3)-O-oleoil-2-O-β-D-glucopiranosil-glicerol, muestran resultados positivos (11). Ésta información, más la presencia de los compuestos 3, 5 y 7 que corresponden glucopiranososa y sus isómeros de cadena y anillo (8), sugiere que los compuestos 15 y 17 que corresponden al 1(3)-O-hexadecanoil-glicerol y 1(3)-O-oleoil-glicerol, podrían ser productos de una posible eliminación de residuos glucopiranosil a partir de los dos glucosilgliceroles antitumorales mencionados, respectivamente. Otra información de relevancia afirma que la molécula de glicerol, la cual constituye la estructura base de los monoacilgliceroles identificados, es uno de los muchos agentes químicos que interfieren en la disociación y ensamblaje de los microtúbulos (12). Los compuestos 8, 10 y 12 corresponden a ácidos grasos que constituyen el 64.2% del total de la fracción, con los dos primeros como componentes mayoritarios. El único ácido graso insaturado presente es el ácido 5-octadecenoico y le siguen en orden decreciente de abundancia relativa, los ácidos grasos saturados hexadecanoico y octadecanoico. El ácido 5-octadecenoico difiere del ampliamente conocido ácido oléico (9-octadecenoico) solamente en la posición del doble enlace y es importante destacar que éste último presenta actividad antitumoral *in vitro* en carcinoma mamario TA3 y linfosarcoma 6C3HED de ratón, que puede ser atribuido a su función de surfactante de las membranas celulares o su efecto metabólico en la reducción de la respiración celular (13) y aunque no se conoce algún mecanismo de acción antimetabólico, es posible que el ácido 5-octadecenoico actúe de manera similar ayudando en la generación de un efecto antimetabólico sinérgico con los demás componentes de la fracción. Adicionalmente, el ácido hexadecanoico (ácido palmítico) aislado de otras algas marinas también se le ha atribuido actividad antitumoral (14), y está ligado a otros compuestos como en la inositol fosfoceramida aislada del alga

roja *Gracilaria verrucosa* (1). Es interesante anotar que se ha comprobado la actividad antileucémica de mezclas de ácidos grasos en células Jurkat (15), lo que muestra un posible efecto sinérgico de los ácidos grasos encontrados en la fracción activa de *D. simplex*.

Los compuestos 4 y 9 denominados hexadecanitrilo y 7-hexadecanitrilo, respectivamente, suman el 7.1% del total de la fracción y se ha encontrado evidencias de actividad antileucémica murina en sus respectivos nitrilos alifáticos homólogos de 10 átomos de carbono (decanitrilo y 2-decanitrilo) (16), lo que muestra indicios de una probable extensión de esta actividad biológica a éstos N-alquil-nitrilos de 16 átomos de carbono.

Por último, se recomienda sintetizar u obtener comercialmente cada uno de los compuestos identificados en la fracción activa, para evaluarlos por separado y como mezclas de distintas proporciones respecto a la actividad antimetabólica y citotoxicidad, de manera que se pueda establecer si actúan o no en forma sinérgica y optimizar el efecto antimetabólico con la intención de proponer su utilización en la terapia antineoplásica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este trabajo a la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín), Universidad de Antioquia y Colciencias (código 1115-12-16772). Al profesor Jair Gaviria (Grupo de Análisis Instrumental, Universidad Nacional de Colombia) por los análisis CG-EM, y al profesor Wiston Quiñones por los análisis RMN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blunt J, Copp B, Munro M, Northcote P, Prinsep M. Marine Natural Products. Nat. Prod. Rep. 2006; 23: 26-78.
- Blunt J, Copp B, Hu W, Munro M, Northcote P, Prinsep M. Marine Natural Products Nat. Prod. Rep. 2007; 24: 31-86.
- Harada H, Noro T, Kamei Y. Selective antitumor activity *in vitro* from marine algae from Japan coasts. Biol. Pharm. Bull. 1997; 20 (5): 541- 546.
- Faulkner DJ. Marine Natural Products. Nat. Prod. Rep. 2002; 19: 1-48.
- Murakami S, Takemoto T, Shimizu Z, Daigo K. The effective principles of *Digenia simplex*. III. Treatment of ascariasis by digenic acid. Yakugaku Zasshi. 1953; 73: 1055-7.
- Kawaguchi K, Yamada S, Miyama S. Chemical studies on algae. I. Sodium α-(α-D-mannosido)-D-glycerate obtained from *Digenia simplex*. Nippon Suisan Gakkaishi. 1953; 19: 481-6.

7. Valle-Zapata H. Análisis espectroscópico preliminar y evaluación citotóxica de una fracción antimitótica proveniente del extracto etanólico de la macroalga *Digenia simplex*. [Tesis de Maestría]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2007.
8. DeJongh DC, Radford T, Hribar JD, Hanessian S, Bieber M, Dawson G *et al.* Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 1969; 91 (7): 1728-1740.
9. Moldovan Z, Jover E, Bayona JM. Gas chromatographic and mass spectrometric methods for the characterisation of long-chain fatty acids. Application to wool wax extracts. *Anal. Chim. Acta.* 2002; 465: 359-378.
10. Liu QT, Kinderlerer JL. Preparative thin-layer chromatographic separation and subsequent gas chromatographic-mass spectrometric analysis of monoacylglycerols derived from butter oil by fungal degradation. *J. Chromatogr. A.* 1999; 855: 617-624.
11. Colombo D, Scala A, Taino IM, Toma L, Ronchetti F, Tozuda H *et al.* Inhibitory effects of fatty acid monoesters of 2-O- β -D-glucosylglycerol on Epstein-Barr virus activation. *Cancer Letters.* 1998; 123: 83-86.
12. Lopes NM, Miller HP, Young ND, Bhuyan BK. Assessment of microtubule stabilizers by semiautomated in vitro microtubule protein polymerization and mitotic block assays. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997; 41: 37-47.
13. Tolnai S, Morgan J. Studies on the *in vitro* antitumor activity of fatty acids. V. Unsaturated acids. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1962; 40: 869-875.
14. Huang HL, Wu SL, Liao HF, Jiang CM, Huang RL, Chen YY *et al.* Induction of apoptosis by three marine algae through generation of reactive oxygen species in human leukemic cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1776-1781.
15. Otton R, Curi R. Toxicity of a mixture of fatty acids on human blood lymphocytes and leukaemia cell lines. *Toxicology in vitro.* 2005; 19: 749-755.
16. Townsend GF, Brown WH, Felauer EE, Hazlett B. Studies on the *in vitro* antitumor activity of fatty acids. IV. The esters of acids closely related to 10-hidroxi-2-decenoic acid against transplantable mouse leukemia. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1961; 39: 1765-1770.