

Identificación de algunos constituyentes químicos del extracto soluble en éter de petróleo del octocoral *Pseudopterogorgia acerosa* mediante CG/EM y su posible actividad biológica

Juan Hernández, Haydelba D'Armas*, Gabriel Ordaz y Ángel Camacho
Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente.
Cumaná, Venezuela.

Recibido: 28-05-08 Aceptado 09-12-09

Resumen

El extracto soluble en éter de petróleo (ESE) del octocoral caribeño *Pseudopterogorgia acerosa* exhibió actividad antifúngica contra el hongo *Candida* sp. La fracción B derivada de éste, mostró halos de inhibición frente a la bacteria Gram(+) *Staphylococcus aureus* y la Gram(-) *Escherichia coli*, mostrando un efecto antagónico. Asimismo, el ESE presentó toxicidad contra los nauplios del crustáceo *A. salina*, con una concentración letal media (CL₅₀) de 74 µg/mL a las 48 h de exposición. Mediante CG/EM, se analizaron una serie de muestras obtenidas por el fraccionamiento cromatográfico continuo realizado al ESE, lo cual permitió identificar a los ésteres lineales de cadena larga: tetradecanoato de hexadecilo, hexadecanoato de hexadecilo, octadecanoato de hexadecilo, eicosanoato de hexadecilo, hexadecanoato de octadecilo y octadecanoato de octadecilo; así como el éster alquil aromático 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxibenzo-propanoato de octadecilo y la cetona esteroideal colest-3,5-dien-7-ona.

Palabras clave: actividad biológica, CG/EM, *Pseudopterogorgia acerosa*.

Identification of some chemical constituents of petroleum ether soluble extract of *Pseudopterogorgia acerosa* by GC/MS and its possible biological activity

Abstract

The soluble petroleum ether extract (ESE) of the *Pseudopterogorgia acerosa* Caribbean octocoral showed antimicrobial activity against *Candida* sp. fungus. The fraction B derived from this extract, also showed inhibition against Gram(+) *Staphylococcus aureus* and the Gram(-) *Escherichia coli* bacteria, showing an antagonistic effect. The ESE presented toxicity against the *A. salina*, with lethal concentration average (LC₅₀) 74 µg/mL at 48 h. By GC/MS several samples from the continuous chromatographic study made to ESE, were analyzed, which let to identify the linear esters of long chain hexadecyl tetradecanoate, hexadecyl hexadecanoate, hexadecyl octadecanoate, hexadecyl eicosanoate, octadecyl hexadecanoate and octadecyl octadecanoate; also, the aromatic alkyl ester, octadecyl 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxybenzo-propanoate, and steroidal ketone cholesta-3,5-dien-7-one.

Key words: biological activity, GC/MS, *Pseudopterogorgia acerosa*.

* Autor para la correspondencia: haydelba@yahoo.com

Introducción

La gran diversidad química y biológica del medio ambiente marino representa una rica fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos, lo cual abre una amplia brecha dirigida a la búsqueda de productos naturales marinos (1). Esta diversidad química en el ambiente marino, se debe a la extrema competencia entre los organismos por el espacio y los recursos, los cuales logran biosintetizar metabolitos secundarios como herramienta de defensa (2). Las investigaciones de las propiedades farmacológicas de los productos naturales marinos, han permitido el descubrimiento de muchos agentes activos aptos de aplicación clínica, con actividades antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antiinflamatoria, etc. (1).

Entre los organismos marinos mayormente estudiados, los octocorales pertenecientes al orden Gorgonacea representan una fuente importante de sustancias bioactivas (3). Los octocorales del género *Pseudopterogorgia*, se encuentran ampliamente distribuidos en el Caribe y los metabolitos secundarios presentes en ellos han atraído mucho interés por su complejidad química y por su actividad biológica, algunos con potencial farmacológico como agentes antiinflamatorios o de valor citotóxico (4, 5).

Debido a que la producción de metabolitos secundarios con potencial biomédico depende del hábitat, corrientes marinas y muchos factores ambientales, se ha realizado esta investigación con la finalidad de identificar algunos constituyentes del octocoral *Pseudopterogorgia acerosa* recolectada en las costas sucrenses (Venezuela) y determinar su posible actividad biológica.

Materiales y métodos

Muestreo del octocoral

La recolección del octocoral *P. acerosa* se realizó en la localidad de Punta Arena, situada en la costa norte del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela (10°29'-10°31'N y

64°13'-64°15'W), a ~ 7 m de profundidad. La identificación de la especie se realizó en la Fundación Pro-Desarrollo de las Ciencias Marinas (FUNDEMAR) del Instituto Oceanográfico de Venezuela del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

Obtención de los extractos

El octocoral *P. acerosa* se cortó en trozos finos, se lavó con abundante agua destilada y se maceró en metanol, durante 48 h a temperatura ambiente. Luego de filtrado el solvente, se realizó una nueva extracción por espacio de 72 h. Los filtrados combinados se evaporaron y concentraron a presión reducida para la obtención del extracto crudo en metanol. Una suspensión del crudo en una solución acuosa de metanol al 90% en volumen, se extrajo sucesivamente con éter de petróleo; esta fase apolar se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida, obteniéndose la fracción soluble en éter (ESE).

Pruebas biológicas

Actividad antibacteriana. La presencia de principios antibacterianos se detectó utilizando una suspensión bacteriana (10^8 células/mL, McFarlan 0,5), de cepas certificadas Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Pseudomonas aeruginosa*), pertenecientes al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) existentes en el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, las cuales fueron inoculadas en agar Müller-Hinton. La aparición de halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con el extracto o fracción a probar (40mg/mL), fue indicativa de actividad antibacteriana (6).

Actividad antifúngica. La actividad antifúngica fue evaluada mediante la utilización de cepas de hongos oportunistas (*Candida albicans* y *Candida* sp.) y fitopató-

genos (*Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. y *Penicillium crustobum*), los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Fito-patología del Departamento de Biología y Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, inoculadas en agar papa dextrosa (PDA). La actividad fue detectada al medir el diámetro (mm) de los halos de inhibición que se observaron alrededor de los discos impregnados con el extracto o fracción a probar (40 mg/mL) (7).

Actividad tóxica. Para conocer el grado de toxicidad, se usaron 10 a 15 nauplios del crustáceo *Artemia salina* (eclosionados por 24 h en agua de mar bifiltrada) sobre soluciones de 1.000, 100, 10, 0,1 y 0,01 µg/mL del extracto. Se realizaron cuatro réplicas del bioensayo, para cada concentración y se contabilizó el número de organismos muertos a las 24 y 48 h de exposición. Con los datos obtenidos, se determinó la concentración letal media (CL₅₀) (8, 9).

Fraccionamiento de los extractos

El extracto en éter de petróleo (ESE; 2,77 g) del octocoral se fraccionó por cromatografía de columna (CC), utilizándose como fase estacionaria sílica gel 35-70 mesh (83,10 g) en una columna de 3,5 × 70 cm. Como fase móvil se utilizó hexano al 100%, posteriormente, mezclas de hexano-acetona y, finalmente, metanol al 100%. Los eluatos obtenidos se analizaron mediante cromatografía de capa fina (CCF), empleándose placas de vidrio (20×20 cm²) recubiertas con sílica gel 60 mesh, con un espesor de 0,5 mm y una solución de molibdato de amonio al 5% en H₂SO₄ al 5 % como revelador, con lo cual se obtuvieron 11 fracciones (2,31 g; 83,33%).

En el análisis por CCF las fracciones B, C y F presentaron manchas definidas y con valores de R_f separados, por lo que se decidió trabajar con ellas, empleándose sucesivas CC y cromatografía de capa fina preparativa (CCFP), la cual es similar a la CCF variando el espesor de la sílica a 1 mm.

Identificación estructural por CG/EM

La identificación estructural de los metabolitos secundarios se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM). Para el análisis se empleó un equipo de CG/EM VARIAN, modelo Saturno 2000, con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) de 70 eV, equipado con una columna CP-SIL-8CB-MS de 30 m × 0,25 D.I. y helio como gas de arrastre a una rapidez de 1 mL por minuto. La temperatura inicial del horno fue de 100°C con una rampa de 5°C por minuto hasta llegar a 295°C. La identificación de los componentes se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST.

Resultados y discusión

Pruebas biológicas

Actividad antimicrobiana. El ESE no mostró actividad frente a las cepas bacterianas empleadas y sólo presentó una actividad antifúngica marcada (halo de inhibición de 20 mm) frente a la especie *Candida* sp. Por otro lado, las fracciones B y C, obtenidas mediante el fraccionamiento cromatográfico, también inhibieron el crecimiento de esta misma cepa con halos de inhibición de 15 mm y además, la fracción B presentó halos de inhibición bacteriostáticos de 9 y 8 mm frente la bacteria Gram(+) *S. aureus* y la Gram(-) *E. coli*, respectivamente. Esta ganancia de actividad antibacteriana se debe a un fenómeno de antagonismo entre los constituyentes químicos presentes en el extracto del octocoral, es decir, éstos ejercen una mayor actividad antimicrobiana cuando han sido separados.

Del género *Pseudopterogorgia* se han reportado compuestos que muestran actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de patógenos bacterianos y fúngicos, como es el caso de las seco-pseudopterósinas. La seco-pseudopterósina A, por ejemplo, presenta una concentración mínima de

inhibición contra la bacteria Gram(+) *S. aureus* de 8 µg/mL (10).

Toxicidad. Los valores de concentración letal media (CL₅₀) que presentó el ESE, indica principios tóxicos a la *Artemia salina* (11). A 24 h de exposición el ESE presentó un valor de CL₅₀ de 1.000 µg/mL, aumentando su actividad tóxica a las 48 h con una CL₅₀ de 74 µg/mL. Valores similares de toxicidad tienen buena correlación con algunas líneas celulares anticancerígenas, por lo que los compuestos activos presentes en el extracto podrían exhibir un potencial citotóxico importante (8). Además, se han reportado metabolitos con actividades anticancerígenas y citotóxicas, aislados de especies del género *Pseudoptergorgia* (10, 12, 13).

Análisis de la fracción B

Una masa de 1,6452 g de esta fracción fueron cromatografiados por CC con sistemas de polaridad creciente hexano-acetona, obteniéndose 11 subfracciones (83,90%), de las cuales las subfracciones B₁, B₄, B₅ y B₇ presentaron una mejor separación de sus constituyentes en la CCF.

La subfracción B₁ (35,1 mg), fue particionada mediante CC con hexano-diclorometano (9:1), obteniéndose cinco subfracciones (33,8 mg; 96,30%). De éstas, la subfracción B_{1.1} (3,2 mg), se analizó por CG/EM. El análisis del cromatograma de gases (figura 1) de dicha subfracción mostró la presencia de dos picos mayoritarios. El pico en menor proporción (T_R = 31,10 min), presentó un espectro de masas con un ión molecular a m/z 452 [M]⁺, el cual corresponde a la fórmula molecular C₃₀H₆₀O₂ (calculado 452,77 g/mol) y los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a m/z 409 [M-C₃H₇]⁺, 353 [M-C₇H₁₅]⁺, 269 [M-C₁₃H₂₇]⁺, 229 [M-C₁₆H₃₁]⁺ (pico base), 83 [M-C₂₄H₄₉O₂]⁺ y 57 [M-C₂₆H₅₁O]⁺. El patrón de fragmentación del mismo y la base de datos permitieron identificar este compuesto como el tetradecanoato de hexadecilo (I). El segundo pico en mayor proporción (T_R = 35,14 min), corres-

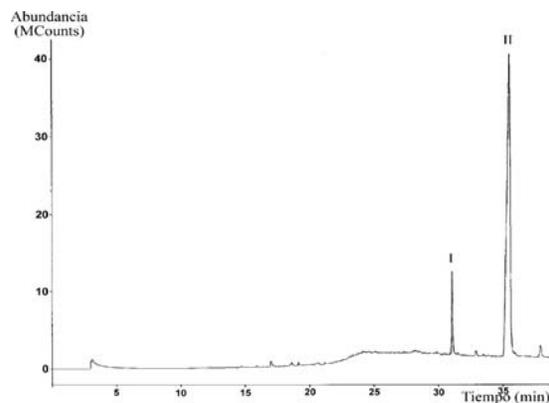


Figura 1. Cromatograma de gases obtenido de la subfracción B_{1.1}. (I = tetradecanoato de hexadecilo, II = hexadecanoato de hexadecilo).

ponde al éster hexadecanoato de hexadecilo (II), cuyo espectro de masas evidenció el ión molecular a un m/z 480 [M]⁺, correspondiente a la fórmula molecular C₃₂H₆₄O₂ (calculado 480,82 g/mol). Los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes aparecen a m/z 437 [M-C₃H₇]⁺, 352 [M-C₉H₂₀]⁺, 257 [M-C₁₆H₃₁]⁺ (pico base), 224 [M-C₁₇H₃₆O]⁺, 196 [M-C₁₉H₄₀O]⁺ y 57 [M-C₂₈H₅₅O₂]⁺. El tetradecanoato de hexadecilo y el hexadecanoato de hexadecilo, se obtienen de la mezcla de aceites procedentes de la cabeza y esperma bruta del cachalote, *Physeter macrocephalus* y del *Hyperoodon rostratus*. La esperma de ballena se emplea como componente de cremas y pomadas (14).

La subfracción B₄ (897,3 mg) fue particionada mediante CC con sistemas de polaridad creciente hexano-acetato de etilo, obteniéndose 10 nuevas subfracciones (762,5 mg; 88,32%). De las cuales, la subfracción B_{4.4} (79,8 mg), fue particionada mediante CC usando mezclas de hexano-acetato de etilo, obteniéndose cuatro nuevas subfracciones (70,3 mg; 88,10%), de las cuales se analizó la subfracción B_{4.4.3} (3,9 mg) por CG/EM. El cromatograma de gases de dicha subfracción (figura 2) exhibió la presencia, en menor proporción, del hexadecanoato de

octadecilo (III, $T_R = 23,72$ min), el cual mostró un ión molecular a m/z 508 $[M]^+$, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{34}H_{68}O_2$ (calculado 508,88 g/mol). Los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a m/z 480 $[M-C_2H_4]^+$, 424 $[M-C_6H_{12}]^+$, 381 $[M-C_9H_{19}]^+$, 297 $[M-C_{15}H_{31}]^+$, 257 $[M-C_{18}H_{35}]^+$ (pico base) y 57 $[M-C_{30}H_{59}O_2]^+$. El hexadecanoato de octadecilo se utiliza como aditivo para materiales plásticos, destinados a la elaboración de envases y equipamientos en contacto con alimentos (15). El segundo pico (IV, $T_R = 30,28$ min), no logró ser identificado por la base de datos.

Por su parte, la subfracción $B_{4.6}$ (54,0 mg), se particionó en CCFP con hexano-acetato de etilo (3:2), obteniéndose la subfracción $B_{4.6.1}$ (2,1 mg), la cual resultó ser una mezcla de dos componentes, como lo muestra el cromatograma de gases de la figura 3. El compuesto que apareció en mayor proporción, se identificó como el éster octadecanoato de octadecilo (V, $T_R = 30,47$ min), evidenciándose el ión molecular a m/z 536 $[M]^+$ en el respectivo espectro de masas, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{36}H_{72}O_2$ (calculado 536,93 g/mol). El análisis de su patrón de fragmentación mostró los fragmentos concernientes a los picos de los iones más abundantes, los cuales aparecieron a m/z 285 $[M-C_{18}H_{35}]^+$ (pico base), 252 $[M-C_{19}H_{40}O]^+$, 224 $[M-C_{21}H_{44}O]^+$, 185 $[M-C_{25}H_{51}]^+$ y 57 $[M-C_{32}H_{63}O_2]^+$. En el campo medicinal se ha reportado la utilización de este compuesto, ya que sirve para ablandar tumores (emoliente) y como lubricante (15). El otro compuesto en abundancia, fue identificado previamente en la fracción $B_{1.1}$ como el hexadecanoato de hexadecilo (II).

La subfracción B_5 (284,5 mg) fue fraccionada por CC con mezclas hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, obteniéndose diez nuevas subfracciones (258,0 mg; 90,69%), de las cuales, la subfracción $B_{5.8}$ fue separada mediante CCFP con hexano-acetato de etilo (1:1), obteniéndose la subfracción $B_{5.8.1}$ (7,1 mg). El cromatogra-

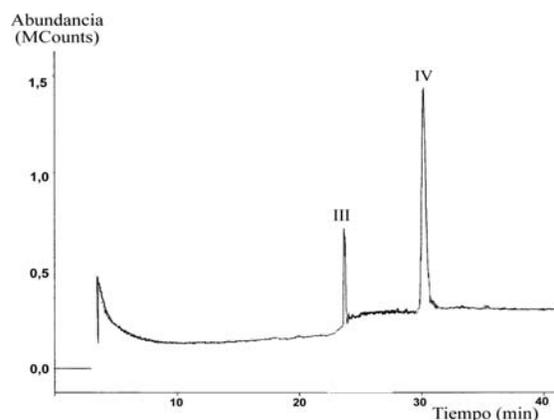


Figura 2. Cromatograma de gases de la subfracción $B_{4.4.3}$. (III = hexadecanoato de octadecilo, IV = no identificado).

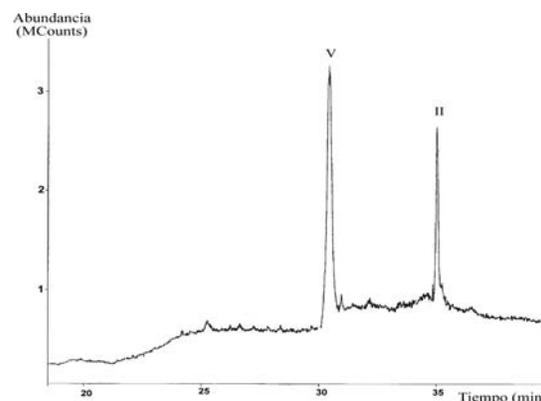


Figura 3. Cromatograma de gases de la subfracción $B_{4.6.1}$. (V = octadecanoato de octadecilo, II = hexadecanoato de hexadecilo).

ma de gases de esta subfracción (figura 4), evidenció que se trataba de una mezcla de ceras, identificados como el octadecanoato de hexadecilo (VI, componente en mayor proporción), el eicosanoato de hexadecilo (VII) y el hexadecanoato de hexadecilo (II). El espectro de masas de VI ($T_R = 24,13$ min), desplegó un ión molecular a m/z 508 $[M]^+$ y los fragmentos correspondientes a los picos de los iones más abundantes a m/z 340 $[M-C_{12}H_{16}]^+$, 285 $[M-C_{16}H_{31}]^+$ (pico base), 224 $[M-C_{19}H_{40}O]^+$, 196 $[M-C_{21}H_{44}O]^+$ y 57 $[M-C_{30}H_{59}O_2]^+$. Este compuesto es uno de

los ingredientes activos del Meleril que es un medicamento utilizado como sedante y neuroléptico en personas con múltiples síntomas de trastornos mentales psicóticos y algunos otros síntomas tales como tensión, depresión entre otros (16). El compuesto VII ($T_R = 33,25$ min), mostró ión molecular con un m/z de 536 $[M]^+$, el cual corresponde con la fórmula molecular $C_{36}H_{72}O_2$ (calculado 536,928 g/mol). Los fragmentos principales aparecen a m/z 424 $[M-C_8H_{16}]^+$, 368 $[M-C_{12}H_{24}]^+$, 313 $[M-C_{16}H_{31}]^+$, 224 $[M-C_{20}H_{40}O_2]^+$, 196 $[M-C_{22}H_{44}O_2]^+$ y 43 $[M-C_{33}H_{65}O_2]^+$ (pico base), siendo estos los picos correspondientes a los iones más estables. El compuesto II ($T_R = 35,16$ min) ya fue reportado en las subfracciones $B_{1,1}$ y $B_{4,6}$.

Análisis de la fracción C

Esta fracción de 311,4 mg se cromatógrafió por CC con mezclas hexano-acetona en diferentes proporciones, obteniéndose 11 subfracciones (267,8 mg; 85,99%). De éstas, la subfracción C_7 fue tratada mediante CC con mezclas de polaridad creciente hexano-acetato de etilo, obteniéndose 11 subfracciones (74,4 mg; 84,16%). Se seleccionó la subfracción $C_{7,8}$ para ser analizada por CG/EM. El patrón de fragmentación del componente mayoritario en el cromatograma de gases (figura 5), con un tiempo de retención de 21,33 minutos, permitió identificar al 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxibenzopropanoato de octadecilo (VIII). El espectro de masas de este compuesto mostró un ión molecular a m/z 530 $[M]^+$, que se corresponde con la fórmula molecular $C_{35}H_{62}O_3$ (calculado 530,834 g/mol). Los picos correspondientes a los iones más abundantes se observaron a m/z 474 $[M-C_4H_8]^+$, 431 $[M-C_7H_{15}]^+$, 278 $[M-C_{18}H_{36}]^+$, 219 $[M-C_{20}H_{39}O_2]^+$ (pico base), 147 $[M-C_{25}H_{51}O_2]^+$ y 57 $[M-C_{31}H_{53}O_3]^+$.

Análisis de la fracción F

Se le realizó una CC a 47,8 mg de esta subfracción con mezclas hexano-acetona en diversas proporciones, obteniéndose 11

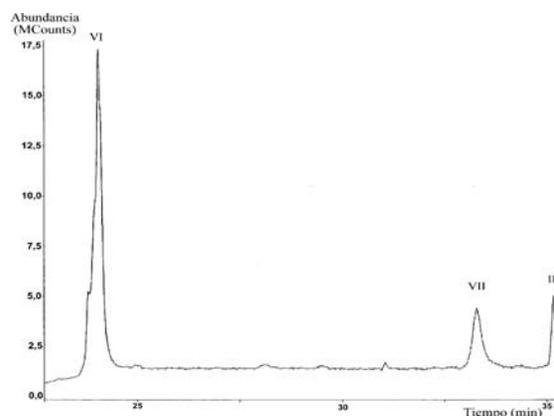


Figura 4. Cromatograma de gases de la subfracción $B_{5,8.1}$. (VI = octadecanoato de hexadecilo, VII = eicosanoato de hexadecilo, II = hexadecanoato de hexadecilo).

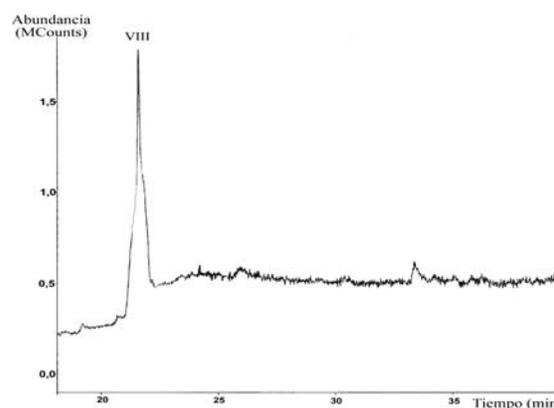


Figura 5. Cromatograma de gases de la subfracción $C_{7,8}$. (VIII = 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxibenzopropanoato de octadecilo).

subfracciones (44,4 mg; 92,88%), de las cuales sólo F_3 mostró una buena separación con valores de R_f no muy cercanos. Para tratar de purificar en lo posible la subfracción F_3 se realizó una micro-cromatografía de columna utilizándose una pipeta Pasteur como columna y como solventes mezclas de hexano-acetona en proporciones en volumen de polaridad creciente. Durante este proceso se obtuvieron 4 subfracciones (6,7 mg; 88,16%).

De este fraccionamiento sólo la subfracción F_{3,2} (5,0 mg) se decidió analizar por CG/EM. El cromatograma de gases (figura 6), mostró un componente mayoritario a un tiempo de retención de 32,85 minutos, el cual se identificó como el compuesto colest-3,5-dien-7-ona (IX). El espectro de masas de este metabolito secundario, mostró el ión molecular a m/z 382 [M]⁺, correspondiente a la fórmula molecular C₂₇H₄₂O (calculado 382,602 g/mol). Los picos correspondientes a algunos de los iones más abundantes se observaron a m/z 269 [M-C₈H₁₈]⁺, 174 [M-C₁₅H₂₉]⁺ (pico base), y 41 [M-C₂₅H₄₂]⁺. Este componente corresponde a una cetona esteroidea.

Conclusiones

En el ensayo de toxicidad, luego de 48 horas de exposición, el extracto en éter de petróleo mostró un valor de toxicidad de 74 µg/mL, lo que indica que los compuestos presentes en éste pueden exhibir un potencial tóxico importante.

El extracto en éter, totalmente inocuo frente a las bacterias ensayadas, presentó una actividad moderada contra el hongo *Candida* sp.; sin embargo, las fracciones B y C, derivadas de éste, presentaron una mayor actividad (mayor inhibición) frente a este mismo hongo y, la primera de ellas, exhibió además, halos de inhibición bacteriostáticos contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, lo que indica un efecto antagónico en su actividad antimicrobiana.

En el fraccionamiento realizado al extracto en éter de petróleo se lograron identificar, en algunas de las subfracciones obtenidas, una variedad de compuestos como: tetradecanoato de hexadecilo, hexadecanoato de hexadecilo, octadecanoato de hexadecilo, eicosanoato de hexadecilo, hexadecanoato de octadecilo, octadecanoato de octadecilo, 3,5-bis(1,1-dimetil)etil-4-hidroxibenzopropionato de octadecilo y colest-3,5-dien-7-ona.

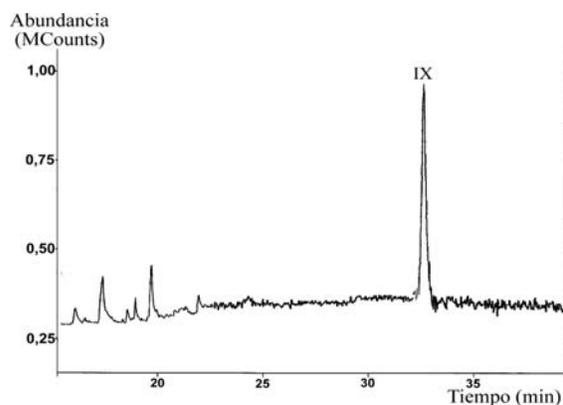


Figura 6. Cromatograma de gases de la subfracción F_{3,2}. (IX = colest-3,5-dien-7-ona).

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a Fundacite-Sucre, al Consejo de Investigación y al Departamento de Química del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, por el financiamiento parcial esta investigación. Al laboratorio de espectrometría de masas del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por la realización de los análisis de CG/EM.

Referencias bibliográficas

1. BAYER F. *The shallow water octocoral-
lia of the West Indian region*. Martinus Nijhoff. The Hague (Holanda). 373. 1961.
2. JEREZ J. *Revista de la Consejería del Medio Ambiente* 9. 1998.
3. FAULKNER D. *Nat Prod Rep* 1: 251-598. 1984.
4. RODRÍGUEZ A. *Tetrahedron* 51(16): 4571-4618. 1995.
5. BERMÚDEZ D. Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios presentes en el octocoral *Plexaura flexuosa* y su actividad biológica (Para obtener el título de Licenciado en Química). Escuela de Ciencias. Universidad de Oriente. Cumaná (Venezuela). 78 pp. 2004.

6. BAUERA., KIRBY A., SHERRIS J., TURK M. ***Am J Clin Pathol*** 45: 493-496. 1966.
7. MADUBUNYI L. ***Intern J Pharm*** 33(3): 232-237. 1995.
8. MEYER B., FERRIGNI N., PUTMAN J., JACOBSEN L., NICHOLS D., MCLAUGHING J. ***Planta Medica*** 45(1): 31-34. 1982.
9. STEPHAN C. ***Aquatic toxicology and hazard evaluation*** (Eds. Mayer F.E., Hamelink J.L.) American Society for Testing and Materials. Philadelphia (Pennsylvania). 65 pp. 1977.
10. GARCÍA G. Estudio sobre la síntesis del diterpeno de origen marino helioporina B (Para obtener el título de Doctor). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid (España). 160 pp. 1998.
11. CARABALLO J., HERNÁNDEZ Z., PÉREZ P., GARCÍA D. ***Biotechnology*** 2: 17-21. 2002.
12. WRIGHT A., BURREN N., SCHULTE G. ***Tet Lett*** 30(27): 3491-3494. 1989.
13. DONOVAN S., CLARDY J. ***J Am Chem Soc*** 104(23): 6463-6465. 1982.
14. <http://marenostrum.org/vidamarina/animalia/mamiferos/cetacea/masgrandes/>. Fecha de consulta: 17/09/2007.
15. http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_050_001_RTM_Lista%20Positiva_Mat-PI%C3%A1sticos_Acta%204_01.PDF. Fecha de consulta: 17/09/2007.
16. <http://www.valeant.com.ar/meleril/meleril.pdf>. Fecha de consulta: 17/09/2007.